



[12] 发明专利说明书

[21] 专利号 ZL 85109132

[51]Int.Cl⁵

C12N 15/27

[45]授权公告日 1993年5月5日

[24]颁证日 93.2.14

[21]申请号 85109132.6

[22]申请日 85.11.18

[30]优先权

[32]84.11.20 [33]US [31]673,898

[73]专利权人 先灵生物技术公司

地 址 美国加利福尼亚州帕洛阿尔托加利福尼亚街 901 号

[72]发明人 横田崇 弗兰克·唐·李

唐娜·梅·伦尼克 新井贤一

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 曹恒兴

C12N 15/66 A61K 37/02

说明书页数: 附图页数:

[54]发明名称 编码表现有人粒性巨噬细胞和嗜伊红细胞生长因子活性之多肽的 cDNA 克隆

[57]摘要

提供了若干种质粒载体, 它们携带有编码人粒性细胞/巨噬细胞群落刺激因子活性, 其中包括嗜伊红细胞生长因子活性的多种多肽的互补 DNA (cDNA) 克隆。其中一种多肽长度大约为 144 个氨基酸, 可能包括有一段前导序列。cDNA 来源于由伴刀豆球蛋白 A 活化过的人细胞信息 RNA。cDNA 通过结合进入一种质粒载体而被克隆, 然后转化进入大肠杆菌。质粒载体也含有来自 SV40 病毒的 DNA 片段, 从而使得载体经过转染进入一种哺乳动物寄主细胞例如猴 COS-7 细胞后, 能够使 cDNA 得以表达。

权 利 要 求 书

1. 制备多肽的方法, 该方法是在液体培养基中培养由含有编码所述多肽的核苷酸序列的载体所转化的原核细胞或真核细胞, 其特征在于该多肽为具有粒性细胞/巨噬细胞群落刺激因子活性的人GM-CSF多肽, 其信号序列为以下氨基酸序列:

HET Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu

Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile Ser Ala Pro Ala Arg Ser Pro Ser Pro Ser Thr

Gln Pro Trp Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu

Ser Arg Asp Thr Ala Ala Glu Met Asn Glu Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met

Phe Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln

Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Pro Leu Thr Met Met Ala Ser

His Tyr Lys Gln His Cys Pro Pro Thr Pro Glu Thr Ser Cys Ala Thr Gln Ile

Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro

Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu

2. 制备能够表达多肽的原核宿主细胞或真核宿主细胞的方法, 该方法是通过含有编码所述多肽的核苷酸序列的载体转化所述细胞, 其特征在于所述核苷酸序列是编码具有粒性细胞/巨噬细胞群落刺激因子活性的多肽的核苷酸序列, 其信号序列系权利要求1所述氨基酸序列。

3. 按权利要求2的方法, 其特征在于核苷酸序列系下述DNA序列, 或是与所述序列的互补链杂交和编码所述多肽的序列,

ATG TGG CTG CAG AGC CTG

GGC ACT GTG GCC TGC AGC ATC TCT GCA CCC GCC CGC TCG CCC AGC

CAG CCC TGG GAG CAT GTG AAT GCC ATC CAG GAG GCC CCG CGT CTC CTG AAC CTG

AGT AGA GAC ACT GCT GCT GAG ATG AAT GAA ACA GTA GAA GTC ATC TCA GAA ATG

TTT GAC CTC CAG GAG CCG ACC TGC CTA CAG ACC CGC CTG GAG CTG TAC AAG CAG

GGC CTG CCG GGC AGC CTC ACC AAG CTC AAG GGC CCC TTG ACC ATG ATG GCC AGC

CAC TAC AAG CAG CAC TGC CCT CCA ACC CCG GAA ACT TCC TGT GCA ACC CAG ATT

ATC ACC TTT GAA AGT TTC AAA GAG AAC CTG AAG GAC TTT CTG CTT GTC ATC CCC

TTT GAC TGC TGG GAG CCA GTC CAG GAG TGA .

编码表现有人粒性巨噬细胞
和嗜伊红细胞生长因子活性
之多肽的 cDNA 克隆

本发明涉及应用重组 DNA 技术阐明哺乳类免疫反应控制机制，特别是阐明了编码具有人粒性细胞 / 巨噬细胞生长因子活性，其中包括嗜伊红细胞生长因子活性多肽的核酸克隆的分离。

重组 DNA 技术一般是从一种供体将遗传信息结合至载体然后再转入一种宿主内，从而使转移的遗传信息可以在新的条件下进行复制和 / 或表达。一般而言，遗传信息以互补 DNA (cDNA) 方式存在，这种 cDNA 来源于编码一种所需蛋白质产物的信息 RNA (mRNA)。载体通常是能够与 cDNA 结合并在一种宿主中可以进行复制的质粒。在某些情况下，实际上控制了 cDNA 的表达，从而导致编码产物在宿主中的直接合成。

近年来，这种技术发展十分迅速，多种外源蛋白质已经在不同宿主中得以表达，但是仍不能肯定得到任何预期的新的 cDNA 克隆。例如，采用重组 DNA 技术已得到了某些真核蛋白质，包括有：胰岛素原 (Naber, S.等, 基因 21: 95-104[1983]); 干扰素 (Simon, L.等, 美国科学院学报, 80: 2059-2062[1983]和 Derynck, R.等, 核酸研究 1: 1819-1837[1983]); 生长激素 (Goeddel, D., 等, 自然 281: 544-548[1979]); 以及肥大细胞生长因子 (Yokota, T.等, 美国科学院学报, 81: 1070-1074[1984])。 (后面引用的这些已发表的文章及其他参考资料包括了有关技术的进一

步详细情况，有些还包括了有关发明的实施。)

一些时期以来，哺乳类免疫反应被认为是由于初级的一系列复杂的细胞相互反应，此反应称之为“免疫网”。但有待弄清的是，事实上许多反应都围绕着淋巴细胞、巨噬细胞、粒性细胞和其他细胞的类网状相互作用，目前免疫学家普遍认为，可溶性蛋白（即所谓淋巴细胞活素）在控制这些细胞相互作用中起了一种关键性作用。

很明显，淋巴细胞活素以多种方式调节细胞的活性。业已表明，它们能够支持各种造血细胞的生长和增殖，实际上认为，它们在多种潜在的造血干细胞转变为大量的亲本细胞系的基本分化中起着关键的作用，而这些细胞系是与免疫反应有关的。在这种反应中，重要的细胞系有两类淋巴细胞：B细胞，它可以产生和分泌免疫球蛋白（能够识别和结合于外源物质并影响其转移的蛋白质），T细胞（有多种），它可以通过多种机制诱导或抑制B细胞及某些形成免疫网的其他细胞（包括其他T细胞）。

另一重要的白血细胞类型是吞噬细胞，尤其是多形核和单核白血球。这些细胞被认为专门进行清除作用，这是一种帮助清除入侵的病原体和排除死细胞及胞外废物的基本功能。

粒细胞属于这种白血细胞类型，其中包括嗜中性细胞和嗜伊红细胞。嗜中性细胞可以在外围血液中、多种组织及直接同外界接触的身体部分发现（如，口腔，支气管与气管分枝以及颈部小管）。通过有控制地释放各种抗菌剂（例如，氧基、过氧化氢，卤离子）进入泡液首先破坏摄入的病原体，深入地研究了嗜中性细胞对于入侵病原菌的吞噬作用。（Klebanoff, S. 和 Clark, R., 嗜中性细胞，功能和临床失调，Elsevier/北荷兰生物医学出版社，阿姆斯特丹〔1978〕）。尽管采用了十分特异的颗粒形成法进行验证，并且得到了与变态反应紊乱及某些寄生虫病，例如旋毛虫病有关的大量资料，

但是，关于嗜伊红细胞了解得还是较少。

巨噬细胞和粒性细胞的不同在于它们发展了依赖于外围组织的不同特性。因此，组织巨噬细胞包括结缔组织中的组织细胞、肝中的Kupffer细胞、肺中的肺泡巨噬细胞、骨骼中的破骨细胞、在神经系统中的微生物细胞、皮肤中的Langerhans细胞以及其他器官中的游离或固定细胞。除了吞噬能力之外，巨噬细胞能够分泌许多十分重要的生物活性物质，例如，溶菌酶、血纤维蛋白溶酶源激活因子、胶原酶、弹性蛋白酶、酸性羟化酶、补体组分、前列腺素、内热原、某些淋巴细胞活素以及氧代谢物。另外，据信，对于B和T淋巴细胞，巨噬细胞可以调节抗原的供给和导入。(Cline, M., 白细胞, 哈佛大学出版社, 剑桥, 马萨诸塞州 [1975])。

为了更好地了解(以及潜在的治疗处理)嗜中性白血球减少症, 血中淋巴球减少症, 单核血球减少症, 白血病或一种白血病状的反应以及其他免疫紊乱, 对巨噬细胞, 粒性细胞、T细胞和其他与免疫反应有关的细胞进行了研究, 由于在体外保存这些细胞存在着普遍的不稳定性, 因而影响了这种研究工作的进行。但是, 最近已有若干免疫学家发现许多这类细胞可以被分离, 在某些情况下, 可以使它们在其他细胞分泌液中培养生长, 例如, 脾淋巴细胞在特定培养基中可以被伴刀豆球蛋白A (Con A) 所激活。根据这项工作, 目前已经弄清, 细胞克隆的形成依赖于特定的因素, 例如淋巴因子。

很明显, 在成人脊椎骨髓中, 通过造血母细胞染色体级系的分化和生长, 几乎所有的血细胞可以连续地形成。染色体级系的顶部是多种干细胞, 这些干细胞可以使以致死剂量照射的动物重新形成不同类型的血细胞(如红细胞、血小板、淋巴细胞、多种粒性细胞以及单核细胞/巨噬细胞)。多种细胞不仅能够再生成不同的干细胞层(自我更新), 而且可以按照特定谱系的途径提高母细胞的发展。一种特殊的定型干细胞

子代，表明与亲代具有同样的谱系 (Metcalf, D., 造血群体, 斯普林格出版公司, 纽约, N. Y. [1977])。

在体外研究造血作用表明，多种可溶性因子可以调节各种亲代及定型细胞的生长和分化。某些这类因子已经进行了部分提纯，而且可以特异地影响属于一种特殊细胞谱系的干细胞。例如，肾脏产生的促红细胞生成素可以刺激更多的红色染色体级系的分化成员 (Miyake, T., 等, 生物化学杂志, 252, 5558 [1977])，而且T细胞和巨噬细胞产生的群体刺激活性，可以选择性地刺激在骨髓细胞半固体培养基中的粒性细胞和巨噬细胞的生长 (Stanley, E., 和Heard, P., 生物化学杂志, 252, 4305 [1977])。其他类型生长因子似乎能够刺激由单一细胞类型和混合细胞构成的造血群体。这些细胞的范围包括，前红细胞、巨核细胞和粒性细胞、肥大细胞和单核细胞/巨噬细胞。它们显然影响到第二种类型的一种因子，称之为复合谱系细胞生长因子 (Iscoe, N., 等, 细胞生理学杂志, 赠刊, 1, 65-78 [1982])，这种因子表明能够影响多种定型的亲代细胞以及有多种作用的干细胞。

已知，群体刺激活性以多种分子形式存在，总体称之为群体刺激因子 (CSF's)。CSF's 是一类糖蛋白，分子量范围大约为 20,000-70,000 道尔顿。存在于血和尿中。被称为“GM-CSF”的这一系列因子既能够刺激粒性细胞，也能刺激巨噬细胞群体在半固体培养基中的形成 (见Metcalf, D., 造血群体, 体外正常细胞和白血病细胞的克隆, 斯普林格出版公司, 纽约 [1977])。

老鼠和人的GM-CSF' 至少已经部分地被提纯，并进行了生物化学定性。无论是分子量还是种内活性谱都十分不同 (Metcalf, D., “造血群体刺激因子”药理实验手册, 57, 848-884, 斯普林格-弗拉格, 纽约 [1978])。编码一种鼠GM-

OSF活性的cDNA's的成功克隆,应该有助于回答围绕着鼠GM-CSF的不少问题,但是对于人类系统仍然存在着许多问题(Gough, N., 等, 自然309, 768-767 (1984))。至少有两组研究工作者已经报道了两种人的GM-CSF's (Das, S., 等, 血液58, 630-641 (1981)和Nicola, N., 等, 血液54, 614-627 (1979))。为了得到已报道的生物活性蛋白(Lusis, A., 等, 自然298, 75-77 (1982)), 实际上, 在体外甚至进行了编码人类GM-CSF的mRNA的转译(分离自T-淋巴细胞株, ATCC保藏号OBL 8066, 见美国专利4, 438, 032); 但是有关人类的OSF's仍然有许多问题不能肯定(见Burgess, A., 生长因子和干细胞, 第四章, 93-124页, 科学出版社, 纽约(1984))。

尽管分子量的不同大概可以用不同量的糖基化作用部分地加以解释, 但是, 要澄清这个问题以及一个分子所具有的活性谱, 则要求更多的结构资料, 即对所讨论的分子进行全长度序列分析。当然蛋白质序列分析对解决这种问题是一种可能的手段, 但这是一种十分困难的实验工作, 而且通常既不能提供足够的精确性, 也不能得到全长度的氨基酸序列。但是, 为了刺激细胞生长, 采用限制所需O₂条件的培养基, 可以大量得到具有人类GM-CSF活性的多肽, 这将大大有助于研究粒性细胞、巨噬细胞、和其他包括在免疫反应中的细胞的生物学。任何人类OSF的精确和完全的序列资料, 将会简化对于其他免疫因子的研究。最后, 关于任何淋巴因子的进一步资料将会有助于评价不同生长因子和免疫网细胞的作用, 因而可以提供对整个免疫系统及其相伴的治疗作用的认识。

因此, 十分需要编码具有人类GM-CSF活性蛋白质的DNAs的广泛的核苷酸和氨基酸序列的资料, 也非常需要用简单经济的方法制

造大量及必要纯度的这类物质，本发明能够满足这些需要。

本发明提供了编码具有人类GM-CSF活性的多肽的cDNA克隆。一种cDNA的核苷酸序列和一种相关多肽的推测的氨基酸序列表示在图1中。cDNA序列可以结合于多种载体，这些载体反过来又可指导相应多肽在不同宿主中的合成，包括在真核细胞例如培养的哺乳类细胞中的合成。

本发明专门提供了产生一种具有人类GM-CSF活性多肽的步骤，包括有下列几步：

- a) 提供一种载体，这种载体包括编码所述多肽的核苷酸序列，在那里，这种核苷酸序列可以被含有载体的宿主所表达。
- b) 载体进入宿主。
- c) 在适合于表达所述多肽的核苷酸序列的条件下保存含有载体的宿主。

cDNA序列最好来自于编码多肽的非转移人类T细胞mRNA，宿主则是一种生物，例如真核细胞，即哺乳类的由载体转染或转化的细胞。进而，载体最好也包含能够控制编码多肽核苷酸序列表达的第二核苷酸序列。这种第二编码序列包括有启动子序列、一个或多个基因内区序列和多聚腺苷酸酰化作用序列，以分别使得编码多肽的核苷酸序列进行转录、裂解和多聚腺苷酸酰化作用。尤其是当宿主是一种哺乳类细胞，例如，一种COS-7猴(肾)细胞时，载体包含猿病毒40(SV40)的早期启动子的启动子序列和SV40的晚期多聚腺苷酸酰化作用序列的多聚腺苷酸酰化作用序列。

图1(见下)的人cDNA序列能够和其他的DNA序列，例如编码来自一种cDNA或基因库的其他哺乳类生长因子的DNA进行杂交。值得注意的是所叙述的cDNA似乎包含有一个前导序列的信息。

本发明的多肽能够加强人嗜中性细胞，巨噬细胞和其他细胞(例如，

嗜伊红细胞) 的生长, 尤其在体外培养更是如此。将多肽 (制品必须不含有其他人类生长因子) 加至适合于治疗用的载体中, 则可以制备得到合适的药物组分。

根据下述列于本发明的附图以及举例的详尽描述, 可以清楚了解到本发明的其他性质及优越性。见下图:

图 1 描述了一种存在有人类 GM-CSF 活性的 cDNA 核苷酸序列以及推测的相应氨基酸序列。

图 2A 阐明了一种携带具有人类 GM-CSF 活性的 cDNA 克隆质粒, pcD-人类-GM-CSF。

图 2B 是图 2A 的 cDNA 限制性内切酶酶切图谱的插图。

图 3 显示推测的小鼠和人类 GM-CSF 氨基酸序列的比较。

根据本发明, cDNA 克隆提供了存在有人类 GM-CSF 活性的多肽密码。当 cDNA 序列结合至复制表达载体以及载体转染了适当宿主后 (例如, 一种哺乳类细胞), 则表达的一种多肽或多种多肽具有能够使嗜中性粒细胞、巨噬细胞和其他造血谱系细胞 (例如, 嗜伊红细胞) 发展的能力。

根据分离的核苷酸序列推测的氨基酸序列的实例表示在图 1 中, 人类的 GM-CSF cDNA 具有一个由 144 个密码组成单一开放的译读结构。推测的起始密码下行部分含有较多的疏水氨基酸。因此, 很有可能, 分泌的人类 GM-CSF 的成熟型是以一个丝氨基残基起始的, 23 种氨基酸构成了一个前导区域, 这一区域易于通过蛋白水解而消除。因此, 具体的一种人类 GM-CSF 可能由大约 121 种氨基酸组成, 经计算其分子量接近于 13, 500 道尔顿 (非糖苷化的)。有两种可能的 N-糖苷化位置 (门冬酰胺-丝氨酸-苏氨酸), (Neuberger, A.等, 糖蛋白 5: 450-490, 伊尔舍威尔 (Elsevier) 出版公司, 美国[1972]), 分别在 44-46 位和 54-56 位, 根据此计算得出的分子量与文献不符。

当转染进入猴 COS-7 细胞或其他的适合表达系统时, 本发明的

cDNA 克隆可以指导合成具有生物活性的人灰 GM-CSF。将这种表达的克隆基因产物加至培养的造血母细胞中，则可以使接受细胞发展和 / 或使它们在培养中得以维持。表达的多肽具有与一种人类 GM-CSF 相关的多种活性。

有多种方法可以用于制备本发明的 cDNAs。例如，总 mRNA 可以从产生具有人 GM-CSF 活性多肽的细胞提取（如来源于一种非转化的人类 T 细胞），（如 Berger, S. 等人，生物化学 18: 5143-5149[1979]）。来自这种总 mRNA 的双链 cDNAs 能够采用起始引物的逆转录作用首先构成（Verma, I., 生物化学与生物物理学杂志, 473: 1-38[1977]），先形成每一个 mRNA 序列的补体，然后再引导合成第二条链（Land, H. 等，核酸研究, 9: 2251-2266[1981]）。继而，把 cDNA 连接到适合的质粒或细菌噬菌体载体上（Rougeon, F. 等，核酸研究, 2: 2365-2378[1975] 或 Scherer, G. 等，发展生物学, 86: 438-447[1981]），通过互补同系物末端部（Efstratiadis, A. 等，细胞, 10: 571-585[1977]）或通过具有适当限制性内切酶位点的连接片段创造出粘性末端（Seeburg, P. 等，自然, 270: 486-494[1977] 或 Shine, J. 等，自然, 270: 494-499[1977]），来克隆 cDNAs，而后转移到一个适当的宿主。（主要参考 Efstratiadis, A., 和 Villakormaroff, L., “双链 cDNA 的克隆”，Sstlow, J. 和 Hollaender, A. (主编) 遗传工程, 第 1 卷, 普勒那姆 (Plenum) 出版公司, 纽约, 美国

(1982)。

要得到足够长度的本发明克隆cDNAs，一种可取的方法是由H. Okayama和P. Berg所发展的步骤（分子和细胞生物学，2：161-170〔1982〕）。这个方法的优点是，cDNA插入一种细菌克隆载体的位置，这种位置使cDNA也能够在哺乳动物细胞中直接转译和发展。简而言之，第一条cDNA链是由共价连接于一种线性质粒载体DNA一个末端的多聚脱氧胸苷酸所引导形成的。然后，质粒载体再用一种连接DNA片段进行环化，这种连接物将质粒的一个末端与cDNA编码序列的5'—末端相连接。采用一种包括有猿病毒（SV40）早期启动子的DNA片段和包括有一段改造过的SV40晚期基因内区的连接物，cDNA能够在COS-7鼠（肾）细胞中表达，不发生进一步修饰。（主要见Okayama, H. 和Berg, P., 分子和细胞生物学，3：280-289〔1983〕和Jolly, D. 等，美国科学院学报，80：477-481〔1983〕。）

一旦用Okayama/Berg质粒载体完成cDNA库，则可以挑选cDNA克隆，采用杂交选择转移和检定可以随机检查存在的所需cDNAs（例如，测定培养细胞的人类GM-CSF活性，测定存在的抗原或其他生物活性）。采用这些标准得到的阳性库，然后能够用一种适当物质的探针，例如，B细胞系和/或非诱导T细胞系的cDNA，来进行探针检查。而后把探针检查阳性的库分为单个克隆，通过转染到一个适合的宿主对它们进行检验，并对宿主细胞上清液进行所需活性的检定。对阳性克隆进行序列分析。

所希望的cDNA克隆也可以采用适当的mRNA样品（Heindell H. 等，细胞，15：48-54〔1978〕）进行杂交筛选来检测和分离。换言之，cDNA库可以采用杂交选样（Harbold, M. 等，核酸研究，5：2039-2053〔1978〕或Parnes,

J. 等, 美国科学院学报, 78: 2253-2257 (1981) 或用南非有爪蟾卵母细胞来进行筛选 (Aurdon, J., 自然, 233: 177-182 (1971))。 (主要参考 Villal-Kemaroff, L. 等, 美国科学院学报, 75: 3727-3731 (1978))。

在进一步阐明关于制备本发明 cDNA 克隆的有关步骤时, 要首先考虑到细胞来源及其他细胞系, 然后再一般说明分离编码一种具有人 GM-CSF 活性蛋白质的 mRNA 的步骤, 构建包括有 cDNA 序列的 cDNA 库, 在一种质粒载体中分离全长度的 cDNA 克隆以及随后在一种哺乳动物细胞中的表达, 在细菌和酵母中的次级克隆和表达, 纯化制造。全部实验过程的更详细的描述将在后边讨论。

T 细胞和其他细胞系

大量不同细胞的任何一种都可能作为人类 GM-CSF 活性来源并进行实验 (例如, 参考 Burgess, A., 生长因子和干细胞, 科学出版社第 43-124 页, 纽约 (1984))。一种可选择的来源是 T 细胞辅助系, 但是人的外围血 (Verma, D. 等, 英国血液学杂志, 57: 505-520 (1984)) 和 Hasketh, P. 等, 血液 63: 1141-1146 (1984)), 巨噬细胞或其他产生人类 GM-CSF 活性的细胞 (Bodaker, B. 等, 免疫学 166: 12-23 (1984)) 也是可以采用的。这当中包括杂交瘤和转化细胞系 (Gasson, J. 等, “淋巴因子和造血作用”, 正常和新生的造血作用, Alan R. Liss 公司, 纽约, (1983))。

一种可以进行人类 GM-CSF 活性实验的材料来自未得血液病的提供者的骨髓组织。但是脐带血和脾脏也可以作为来源, 它们必须在取

出后 12 - 48 小时内进行实验。

为了确定 OSF 活性，将造血细胞制备成单细胞悬浮液。单个细胞可以固相化于含有营养物质，并且通常是小牛胎血清的一种半固体（琼脂）或粘的介质（甲基纤维素）中。当存在有适当的刺激因子时，单个细胞将会增殖和分化。由于细胞一开始便被固相化，因此当细胞增生和成熟时集落则发展。7 - 14 天后可以收集细胞集落。（Burgess, A., 生长因子和干细胞，第 52 - 55 页，科学出版社，纽约〔1984〕。）（专门用于粒性细胞和巨噬细胞的生长，见 Bradley, T. 和 Metcalf, D., 澳大利亚实验生物医学协会杂志，44 : 287 - 300〔1966〕和参考 Metcalf, D., 造血集群，斯普林格，柏林〔1977〕。正如所希望的那样，单个集群可以被提取，置于显微镜载片上固定，并用 Wright / Geimsa 染色（Todd - Sanford, 用实验方法进行临床诊断，第 15 版，Davidson 和 Henry 编，〔1974〕）。然后每个单集落细胞的形态分析便能够确定了。

mRNA 的分离和 cDNA 库的组建

利用已知的多种方法可以分离全部细胞 mRNA（例如，Przybilla A. 等，生物化学杂志，254 : 2154 - 2158〔1979〕），但最可取的是 Ohirgwin 等人的硫氰酸提取步骤（生物化学，18 : 5294 - 5299〔1979〕）。如果采用这种方法，选择老寡（dT）纤维素柱层可以从 $1 - 2 \times 10^8$ 活化的人类辅助 T 细胞中得到将近 10 微克多聚腺核苷酸 mRNA。

按照能够大量产生 mRNA 转录所需全长度的拷贝步骤，（例如，Okayama, H. 和 Berg, P., 分子细胞生物学，2 : 161 - 170〔1982〕和分子细胞生物学，3 : 280 - 289

[1988])，用p.o.DV1载体—引物和p.L1片段连接物能够从多聚腺核苷酸最好地构成c.DNA库(从P-L生物化学公司可以得到Milwaukee, WI)。包括有SV40早期启动子和SV40加工信号的质粒载体可以用于促进克隆c.DNA片段在哺乳动物细胞中的表达。

采用Okagama和Berg的步骤，环化的载体-DNA产物可以被转化进入一种细菌细胞，例如，用氯化钙处理过的感受态大肠杆菌MC1061(Casadaban, M. 和Cohen, S., 分子生物学杂志188:179-207[1980])，(Cohen, S. 等，美国科学院学报，69:2110-2114[1972])。用伴刀豆球蛋白刺激过的T细胞得到的5微克多聚腺核苷酸RNA，可以得到大约 1.5×10^6 独立的转化子，通常可以分别挑出 10^4 个克隆，并转种于含有200微升L-培养基，50微克/毫升氨苄青霉素和7%二甲基亚砷的微量滴度报孔中(Flow实验公司，(McLean, 弗吉尼亚)。如果比较理想，根据插入c.DNA的大小可以从总c.DNA库得到次级库，这和Okagama, H. 和Berg, P. 所叙相同(分子细胞生物学，3:280-289[1988])。简言之，质粒DNA用SalI, ClaI, 和HindIII分别酶切，再进行1%琼脂糖凝胶电泳。用溴化乙锭染色后，凝胶被切成相应于插入c.DNA大小的0-1, 1-2, 2-3, 3-4, 4-5, 5-6以及大于6千碱基对(Kb)的7个部分，从每一部分凝胶中提取DNA，用T₄-DNA连接酶重新环化，再转化MC1061。按照Maxam, A. 和Gilbert, W. 的步骤，(酶学方法，65:499-560[1980])分析全部核苷酸序列。

DNA转染进入猴细胞

在转染前一天，将近 1×10^6 COS-7猴肾细胞接种到60毫

米平板上。转染作用最好用15微克质粒DNA，在1.5毫升含有50毫摩尔盐酸三羟甲基氨基甲烷，pH 7.4和400微克/毫升0-二乙胺基乙基(DEAE)葡聚糖的DMEM中进行(Pharmacia Fine化学公司，Uppsala，瑞典)。4个小时后去掉溶液，加入2毫升DMEM和4%胎牛血清。72小时后收集培养液，并按上述方法实验人类GM-CSF IL-2活性。DNA可能在L-细胞以及多种其他来源细胞中进行转染(见下)。

相关基因的分离

本发明的cDNA克隆能够用于确定和分离编码相关基因的核酸序列。由于同种基因间同源程度十分低，因此杂交条件必须严格，以调整至能够使仅同源70-80%的序列间可以进行交叉杂交。

为了定位相关基因，可以采用若干种实验方法。例如，利用相应的鼠Ok基因作探针(Heiter, P.等，细胞，22:197-207〔1981〕)，可以分离出人的Ok免疫球蛋白轻链基因，通过编码它们的人相对应的DNA克隆杂交也可以分离出鼠的移植抗原基因(Steinmetz, P.等，细胞24:125-134〔1981〕)。

对于基因组DNA，一种可选择的方法是将来自包括有同源基因(Maniatis, P.等，分子克隆，实验室操作手册，冷泉港实验室，美国，〔1982〕)的DNA库的噬菌体克隆，以每150mm平板 $2 \times 10^4 - 5 \times 10^4$ 空斑密度植入合适的宿主菌，例如大肠杆菌LE392中。一般10-20块平板已够用。

在37℃保温10-12小时后，将平板冷藏2小时，然后将一种132毫米的硝化纤维素滤膜铺在每块平板表面。滤膜同平板保持接触至少5分钟，在此期间利用一种灌满墨水的22号针头针刺调整滤膜。

然后从平板上撕去滤膜，首先在250毫升0.1N氢氧化钠，0.5M氯化钠，然后在250毫升0.5M盐酸三羟甲基氨基甲烷PH7.5，1.5M氯化钠中依次保温至少2分钟。将滤纸置于纸巾上干燥，然后在80℃烘干4-8小时。

为了进行杂交，用1×SET (0.15M氯化钠，30mM盐酸三羟甲基氨基甲烷PH8.0，1mM乙二胺四乙酸钠) 浸湿滤膜，然后在3×SET，5×Denhardt's 溶液 (Denhardt, D. T., B. B. R. O. 23:641-646 [1966])，10%葡聚糖硫酸盐，0.1%十二烷基磺酸钠 (SDS) 以及浓度分度为50微克/毫升的多聚核糖腺苷 (rA)，多聚核糖胞苷 (rC) 和多聚核糖鸟苷 (rG) 的溶液中，恒定搅拌下于65℃保温2小时 (1.5-2毫升/滤膜)。然后倒掉溶液，在体积为1.5毫升-2毫升/滤膜的同样溶液中 (新鲜)，将滤膜同来自GM-CSF cDNA的0.5微克 [$\geq 10^8$ 每分钟记数率 (CPM)] 缺刻编译探针进行杂交，于65℃1小时，然后置于55℃12-20小时。滤膜再用3×SET，1×Denhardt's，0.1%十二烷基磺酸钠，和1×SET，0.1%十二烷基磺酸钠 (10-15毫升/滤膜) 在缓慢搅拌下，于55℃充分洗涤1小时。在纸巾上干燥滤膜，再用适当的胶片和增感屏进行放射自显影12-24小时。从琼脂板上，用消毒的巴斯德管取出杂交的空斑，每一空斑加至1毫升0.1M氯化钠，0.01M盐酸三羟甲基氨基甲烷，PH7.5，10mM氯化镁，100微克/毫升白明胶溶液中，并加入50微升氯仿，在低温条件下，至少放置4-8小时后，再利用前述步骤将每一空斑的噬菌体在低密度下重新筛选 (2000-4000空斑/150毫米平板)。

在大肠杆菌，酵母和培养细胞中表达

原核细胞，例如大肠杆菌，特别适用于表达本发明的多肽 (见例证，

美国专利号4, 338, 397和4, 411, 994), 但提供的糖苷化作用不是所要求的。

为了达到高表达水平, 需要利用启动子, 例如, β -内酰胺酶(青霉素酶)和乳糖启动子系统(Chang, 等, 自然, 275:615 [1978]; Itakura, 等, 科学, 198:1056 [1977]; Goeddel, 等, 自然, 281:544 [1979])或和Shine-Delgarno序列连接的色氨酸(trp)启动子系统(Goeddel, 等, 核酸研究, 8:4057 [1980])。

这些技术表明, 不仅原核细胞而且真核微生物, 例如酵母也能用来生产蛋白质。啤酒酵母是一种可利用的真核微生物。酵母载体的适合启动序列包括3-磷酸甘油激酶启动子(Hitzeman等, 生物化学杂志, 255:12073-12080 [1980])或其他糖解酶(Hess等, 酶调节进展, 7:149-167 [1969]; Holland等, 生物化学, 17:4900-4907 [1978])。其他受生长条件控制转录的具有额外优点的启动子也可以利用。基本上任何包括一种酵母相容性启动子, 一个复制起点和末端序列的质粒载体都是合适的。

采用本发明cDNA's制造人GM-CSF的可选择方法是利用酵母结合信息素 α -因子分泌途径(Julius, D. 等, 细胞32:839-852 [1983])。啤酒酵母分泌接合型特异的寡肽信息素。MAT α 细胞分泌能够诱导MAT α 细胞在细胞G1周期生长受阻的 α -因子(Thornier, J., 酵母菌的分子生物学, 冷泉港实验室, 纽约, [1981], 特别参看第143-180页)。 α -因子起初合成大约20种氨基酸的氨基末端信息序列组成的大分子。然后加入60个氨基酸的前导序列, 而以4种相同的上下排列重复的成熟 α -因子序列结束。重复部分可以用6种或8种氨基酸间隔来彼此分开

(赖氨酸-精氨酸-谷氨酸-丙氨酸-谷氨酸-丙氨酸和赖氨酸-精氨酸-谷氨酸-丙氨酸-谷氨酸-[或门冬氨酸-]-丙氨酸-谷氨酸-丙氨酸)。这种予 α -因子可以在若干特定位点裂解。第一步加工是由 KEX2 产物 (Julius 等, 细胞, 37: 1075-1089[1984]) 催化间隔序列的赖氨酸-精氨酸的末端羧基位置裂解。一种类似羧肽酶-B 的酶在赖氨酸-精氨酸对的末端氨基位点裂解。最后一步是由 STE13 编码的二氨基肽酶去掉谷氨酸-丙氨酸或门冬氨酸-丙氨酸对, Brake, J.等 (美国科学院学报, 81: 4642-4646[1984]) 已经证明了编码成熟人蛋白质的序列同允许这种蛋白分泌的加工位点发生融合。

一种包括有与其他因素结合的 α 因子启动子和下游先导序列的通用酵母表达载体(定名为 PMF- α -8) 已在 ATCC 保存 (保藏号为 40140)。它可以以下列方式组建:

一种 1.7KbEcoRI 片段将带有 MF2I 基因 (Kurjan, J.和 Hershowitz, I, 细胞, 30: 933-943[1982]) 克隆至 M13mp8 (Viera, J.和 Messing, J., 基因 19: 259-268[1982]) 的 EcoRI 限制性内切酶位点。为了将 HindIII 酶切点引至第一个间隔区赖氨酸密码的后面, 将合成的寡核苷酸 TCTTTTATCCAAAGATACCC 同单链 M13-MF α 1DNA 杂交, 并寡核苷酸前导物可以被 DNA 多聚酶 IKlenow 片段所增长。用 S₁ 核酸酶处理后, 用 EcoRI 酶切 DNA, 将带有 MF α 1 启动子和前导序列的片段克隆至 EcoRI 酶切位点, 再用 pUC8 的 HindIII 限制性内切酶位点补齐 (Viera, J. 和 Messing, J.见前)。一种具有所需结构的质粒已被分离出来 (定名为 pMF α 4 Δ 1)。pMF α 4 Δ 1 可以被 HindIII 裂解, 在存在有脱氧三磷酸腺苷 (dATP) 和

脱氧三磷酸鸟苷的条件下，可以用DNA多聚酶I Klenow 片段填补。用绿豆核酸酶处理DNA，再加入寡核苷酸连接物G₀CTCGAGGC。得到的质粒（定名为pMF α 5）在精氨酸密码子后面随即将有一个Stu I 酶切位点，随后是Xho I限制性内切酶位点。一种啤酒酵母和大肠杆菌间的穿梭载体（pTRP584）可以按如下方法构成：将带有2 μ m质粒复制起始区的Pst I-Xba I片段（Broach, J. 见前）克隆至pTRP56的Cla I限制性内切酶位点（Miyajima等，分子细胞生物学，4：407-414（1984））并且通过连接物Pvu II的插在TRP1-ARS1片段中Stu I限制性内切酶位点形成一个Pvu II限制性内切酶位点。通过连接物Xho I的插入，可以使原在pTRP56中的Kpn I限制性内切酶的位点转变为Xho I位点。将pMF α 5的Bgl II-Xho I片段插入pTRP584的BamHI-Xho I限制内切酶位点，可以得到一般的分泌载体pMF α 8。

这种技术将会表明，编码人类GM-CSF的cDNA克隆可能很快地插入pMF α 8载体，然后转化至酵母，产生人的GM-CSF。例如，带有全部人GM-CSF cDNA的一个1.0千碱基（Kb）BamHI片段被克隆至M13mp8的BamHI限制性内切酶位点（Viera, J. 和Messing, J., 基因19：259-268（1982））。为了得到一种具有成熟蛋白质编码序列的双链片段，组建了一种寡核苷酸前导物AGCCCCAGCAAGCA G CCTGGGAGCAT。将这个前导物同带有人GM-CSF cDNA的单链M13mp8进行杂交，并用DNA多聚酶I Klenow片段进行扩散用BamHI酶切双链DNA，接着用绿豆核酸酶去掉单链区。然后便可分离带有人GM-CSF成熟蛋白质编码序列的双链片段，并克隆至一般分泌载体pMF α 8的Stu I限制性内切酶位点。这种质粒DNA（带有TRP1基因）可以采用

醋酸锂方法进入酵母细胞 (I t o , H. 等, 细菌学杂志 153 :163-168 [1983]), 并且用缺少色氨酸的合成培养基挑选转化子。然后转化子生长在补充有 0.5% 酪蛋白水解物的普通培养基中。收集酵母, 重新悬浮于含有 1 mM PMSF 的冷酸盐缓冲液中 (P B S), 然后用酸洗过的玻璃球剧烈振荡而破碎。以 10,000 转/分离心 15 分钟得到上清液。

除了微生物以外, 多细胞生物 (特别是哺乳类细胞) 也可以作为宿主。这种有用宿主细胞系的例子是海拉 (H e l a) 细胞, 中国仓鼠卵细胞系以及幼仓鼠肾细胞系。如果需要的话, 载体要在这种细胞中表达, 一般包括一个复制起始区, 一个位于和任何所需核糖体结合点一起表达的基因前面的启动子, R N A 片段结合点, 多聚腺酰化作用位点和转移终止序列。当采用哺乳动物细胞时, 载体表达经常具有病毒物质提供的控制功能。一般应用的是多形瘤, 腺病毒 2 启动子, 更多的是 S V - 40 的启动子 (见美国专利号 4, 399, 216 和 G h e y s e n , D. 和 F i e r s , W. , 分子和应用遗传学 1 : 385 - 394 [1982]))

纯化和配制

按照标准的步骤, 包括硫酸铵沉淀、分配柱层析 (如离子交换、凝胶过滤, 电泳, 亲和层离等) 以及最后的结晶作用 (通常参考“酶的提纯和有关技术”, 酶学方法, 22 : 288 - 577 [1977] 和 S c o p e s , R. , 蛋白质纯化, 原则和实践, S p r i n g e r - V e r l a g , 纽约 [1982])。可以纯化在大肠杆菌、酵母或其他细胞中表达的人 G M - C S F 多肽, 一旦部分或完全提纯, 本发明的多肽则可能用于研究目的, 例如, 可以补充到细胞生长培养基中 (例如, 最低必须培养基 E a g l e , I s c o v e 的改良 D u l b e c c o 培

培养基或BPMI 1640, 可以从Sigma化学公司购买, St. Louis, MO和GIBCO Division, Chagrin Falls, OH) 也可以在产生用作免疫检定、免疫荧光染色等的特异免疫球蛋白过程中, 作为一个抗原物质(主要参考, 免疫学方法, 卷I和卷II, Lefkovits, I. 和Pernis, B. 编, 科学出版社, 纽约, N. Y. [1979和1981]; 及实验免疫学手册, Weir, D. 主编, Blackwell科学出版社, St. Louis, MO [1978].)

本发明的多肽也可能作为药物的组分, 例如, 可用于增强对多种新生和感染疾病的天然防御能力, 或对骨髓抑制进行化疗时作为辅助药(见Gasson, J. 等。“淋巴因子和造血作用”, 正常和新生造血作用, 第129-139页, Alan R. Liss公司, 纽约 [1983])。

为了制备含有本发明所述多肽的药物组分, 将这些多肽与适当的无活性宜于制成药物的载体相混合形成化合物。适合的载体和它们的制备方法已众所周知(例如, 见Remington的药物科学和美国药典, 国家处方集, Mack出版公司, Easton, PA [1980])。不经消化道服用和采用机械传送系统是适合的。

最好, 药物组分是单位剂量的形式。按照这种形式, 制品可以再分为包括适量活性组分的单位剂量。在制品的一个单位剂量中, 活性化合物的量可能是变化的或从1微克到100毫克进行调节, 这可以根据特殊的应用和有效组分的效力而定, 如果需要, 该药物组分也可以包含其他治疗剂。

剂量的变化取决于病人的要求, 治疗情况的严重性以及所采用的特殊药物。对于特殊情况的合理剂量得靠熟练的技术来决定了。一般而言, 治疗是从低于化合物最适剂量的较小剂量开始的。进而, 剂量逐步缓慢增加, 直至在这种条件下达到最适效用。为了方便起见, 总的日剂量可

以分成几份，全天按份次服用。

下面通过实例，提供实验资料和信息，但也不限此而已。

实施例

A. 克隆人辅助T细胞

1) 按照Fathman, C. 和Fitch, F., 编辑, 科学出版, 纽约(1982). 36章和37章所叙述的方法分离了定名为T-7的人T细胞一个克隆。在有10%热无活胎牛血清, 5×10^{-5} M 2-ME, 2mM谷氨酰胺, 非必须氨基酸和必须维生素的Dulbecco's Modified Eagle (DME) 培养基中, 当加入30%植物血球凝集素(PHA)刺激的人外周淋巴细胞上清液时, 细胞系可以连续保持在大约 0.5×10^5 细胞/毫升。

2) 植物血球凝集素(PHA)活化T-7细胞

在加有4%热无活胎牛血清, 5×10^{-5} M 2-ME, 2mM谷氨酰胺, 非必须氨基酸, 必须维生素和4微克/毫升伴刀豆球蛋白的DME培养基中将细胞培养至 5×10^5 /毫升。于10%二氧化碳中, 37℃保温4-6小时后, 以1500转/分离心细胞悬液10分钟。收集细胞立即于-70℃进行冷冻。过滤上清液(Nalgene-0.22微米), 于-80℃作为生长因子来源保存。测定每部分上清液的OSF活性(见下)以证实植物血球凝集素处理细胞系的诱导作用。

B. 骨髓组织和脐带血实验

从非造血疾病的病人收集得到骨髓细胞, 并铺在聚蔗糖上(Ficoll)(400型, Sigma化学公司, St. Louis MO), 离心(2000转/分, 20分钟), 除去界面的细胞。用含10%胎牛血

清 (FCS) 的 Iscove's Modified Dulbecco's 培养基洗涤细胞两次, 再悬浮于同样培养基中, 通过粘附于北特利平板去掉附着细胞。将 10^5 细胞/ml 非粘着细胞加至含有 20% FCS (胎牛血清), $50 \mu\text{M}$ 2-巯基乙醇, 0.9% 甲基纤维素的 Iscove's 培养基中, 并且既改变已知含有群落刺激活性的上清又改变实验上清液的浓度。按每份 1 ml 将样品加至 35 毫米北特利平板上, 在含 6% 二氧化碳十分潮湿的空气中 37°C 进行培养。培养 8 天以后, 每块平板加入 1 单位促红细胞生长素 (Eaves, A. 英国哥伦比亚肿瘤研究中心, 温哥华 B. C.), 在 10-14 天用倒置显微镜观察取出的粒性细胞-巨噬细胞群落和红黑释放物。2000 转/分离心 6 分钟, 收集加有肝素的脐带血细胞。取出血浆和红血细胞之间的白细胞, 加至装有 0.17 N 氯化铵和 6% 胎牛血清的试管中去。在冰中放置 5 分钟, 向上清加入 4 毫升胎牛血清, 2000 转/分离心 6 分钟。细胞碎片用 Dulbecco's 磷酸盐缓冲盐水洗涤, 加至聚蔗糖中, 并按前述骨髓细胞粘附塑料板步骤进行。收集低密度的非粘附细胞, 按前述方法, 将 10^5 细胞/培养液加至半固体琼脂系统中。

实验结束时, 将单个群落涂至吸片上, 用赖特氏-吉姆萨氏染色确定细胞组分。用 Luxol Fast blue (Johnson, G. 和 Metcalf, D., 实验血液学, 8:549-561 [1980]) 染色可以确定嗜伊红细胞。

O. 从人细胞中分离 mRNA

1) 采用 Ohirgwin, J. 等 (生物化学, 18:5294-5299 [1979]) 的异硫氰酸胍盐步骤从细胞中分离全部 RNA。

冰冻的刀豆球蛋白诱导或非诱导的人辅助细胞 (活化后 4 小时) 悬浮于异硫氰酸胍溶胞液中。 1.5×10^6 细胞要用 20 毫升溶胞液。

再用吸量管悬浮细胞碎片，然后使DNA通过注射器16号针头4次从而被切剪。将溶胞液加至装有20毫升5.7M氯化铯，10mM乙二胺四乙酸的40毫升晶形塑料管顶部，用一种Beckman SW28离心头(Beckman仪器公司，Palo Alto, CA)25000转/分15℃离心溶液40小时。用吸量管从顶部取出含有DNA的异硫氰酸胍相，直至液面。管壁及液面均用2-3毫升异硫氰酸胍溶胞液洗涤。用刀子低于液面部将管子切掉，缓慢倒出氯化铯溶液。用冷70%乙醇洗涤RNA沉淀两次。然后将沉淀悬浮于500微升10mM三羟甲基氨基甲烷·盐酸pH7.4，1mM乙二胺四乙酸，0.05%十二烷基磺酸钠溶液中。加入50微升3M醋酸钠溶液，用1毫升乙醇沉淀RNA。离心可以得到大约0.30毫克总RNA，再用冷乙醇洗涤沉淀一次。

2) 多聚腺苷酸PolyA⁺mRNA的分离;

将洗涤和干燥过的总RNA沉淀悬浮于900微升寡(脱氧胸腺核苷酸)Oligo-dT洗脱缓冲液中(10mM三羟甲基氨基甲烷盐酸pH7.4，1mM乙二胺四乙酸，0.5%十二烷基磺酸钠)。68℃加热RNA3分钟，然后在冰中致冷。加入100微升5M氯化钠。将RNA样品加至一根1毫升寡(脱氧胸腺核苷酸)Oligo-dT纤维素柱(8型，合作研究，Waltham, MA)。纤维素已由吸附缓冲液(10mM三羟甲基氨基甲烷·盐酸pH7.4，1mM乙二胺四乙酸，0.5M氯化钠，0.5%十二烷基磺酸钠)进行过平衡。样品流经柱子两次以上。再用20毫升吸附缓冲液洗涤。用洗脱液洗涤，收集得到多聚腺苷酸PolyA⁺mRNA。一般而言，RNA通常收集在前2毫升洗脱液中。用0.1体积3M醋酸钠(pH6)和2倍体积乙醇沉淀RNA。离心收集RNA沉淀，用冷乙醇洗涤两次并干燥。然后将沉淀再悬浮于水中。将每部分进行稀释，并在260nm

吸收波长进行测定。

D. ○DNA库的构建:

1) 制备载体前导物和寡脱氧鸟核苷酸Oligo-dG末端连接物
采用略加修改的Okayama和Berg(分子和细胞生物学, 2:161-170[1982])方法, 并利用Okayama和Berg(分子和细胞生物学, 8:380-389[1983])所叙述的质粒PCDV₁和PL₁。

在450微升含有6mM三羟甲基氨基甲烷盐酸(PH7.5), 6mM氯化镁, 6mM氯化钠, 6mM巯基乙醇和每毫升0.1毫克牛血清清蛋白的反应液中, 80微克PCDV₁ DNA用20单位Kpn I限制性内切酶在30℃酶切。16个小时后, 加入40微升0.25M乙二胺四乙酸(PH8.0)和20微升10%十二烷基磺酸钠以终止反应。用水饱和的酚-氯仿(1:1)(可参考用酚-氯仿)提取DNA, 再用乙醇沉淀来回收DNA。同一多聚物尾部平均为60, 但不会多于80。在加有小牛胸腺末端转移酶的情况下, 将每一脱氧胸腺核苷酸(dT)残基末端按下列方法加到Kpn I限制性内切酶所生成的尾部: 38微升反应液含有卡可盐酸盐-30mM三羟甲基氨基甲烷·盐酸PH6.8作为缓冲液, 并加有1mM氯化钴, 0.1mM二硫苏糖醇, 0.25mM脱氧胸腺三磷酸, Kpn I限制性内切酶酶切的DNA, 以及68单位末端脱氧核苷酸转移酶(P-L生物化学公司, Milwaukee, WI)。37℃, 30分钟后, 加入20微升0.25M乙二胺四乙酸(PH8.0)和10微升10%十二烷基磺酸钠以终止反应。经过多次用酚-氯仿提取, 酒精沉淀后得到DNA。在50微升含有10mM三羟甲基氨基甲烷·盐酸PH7.4, 10mM氯化镁, 1mM二硫苏糖醇和每毫升0.1毫克牛血清清蛋白的溶液中, 用15单位EcoRI限制性内切酶37℃酶切DNA5小时。将包括

有 SV40, 多聚腺苷酰化作用位点, PBR₃₂₂ 复制起点和抗氨苄青霉素基因的大片段用琼脂糖凝胶电泳 (1%) 提纯, 采用一种修改过的玻璃粉方法从凝胶上回收 DNA. (Vogelstein, B.和 Gillespie, D., 美国科学院学报, 76: 615-619[1979]). 按照下列方法用寡 (脱氧腺苷酸) Oligo-dA 纤维素柱层吸附, 洗脱可以进一步纯化以脱氧胸腺核苷酸 (dT) 为末端的 DNA: 将 DNA 溶于 1 毫升 10mM 三羟甲基氨基甲烷。盐酸 pH7.3, 含有 1mM 乙二胺四乙酸和 1M 氯化钠的缓冲液中, 冷却至 0℃. 过 Oligo-dA 纤维素柱层析分离 (0.6×2.5 厘米), 纤维素已用同样缓冲液在 0℃ 进行过平衡。用同样缓冲液在 0℃ 洗涤柱子, 室温下用水洗脱。洗脱的 DNA 用乙醇进行沉淀, 并溶于 10mM 三羟甲基氨基甲烷。盐酸 pH7.3 和 1mM 乙二胺四乙酸溶液中。

在含有 6mM 三羟甲基氨基甲烷。盐酸 pH7.4, 6mM 氯化镁, 6mM 二巯基乙醇, 50mM 氯化钠和每毫升含 0.01 毫克牛血清清蛋白的 450 微升溶液中, 用 20 单位 PstI 限制性内切酶酶切 75 微克 PL₁DNA 以制备寡 (脱氧鸟苷酸) (dG) DNA 的连接物。30℃, 16 小时后, 用酚-氯仿提取反应液, 用乙醇沉淀 DNA。除了用 0.1mM 脱氧鸟苷三磷酸 dGTP 代替脱氧胸腺三磷酸 dTTP 外, 在与上述同样的反应液中 (38 微升) 加入 46 单位末端脱氧核苷酸转移酶。然后, 每个末端加入 10-15 个脱氧鸟苷 dG 残基尾部。37℃, 20 分钟后, 用酚-氯仿提取混合液。当乙醇沉淀 DNA 后, 在 50 微升含有 20mM 三羟甲基氨基甲烷。盐酸 pH7.4, 7mM 氯化镁, 60mM 氯化钠和 0.1 毫克牛血清清蛋白的溶液中, 37℃, 用 35 单位 HindIII 限制性内切酶酶切 4 小时。用琼脂糖凝胶电泳 (1.8%) 纯化小的寡 (脱氧鸟苷酸) (dG) 末端 DNA 连接物,

并按前述方法回收。

2) \circ DNA库的制备

步骤1: 合成 \circ DNA。反应液中含有50 mM三羟甲基氨基甲烷盐酸PH 8.3, 8 mM氯化镁, 80 mM氯化钾, 0.3 mM二硫苏糖醇, 脱氧三磷酸腺苷 dATP, 脱氧胸腺三磷酸 dTTP, 脱氧三磷酸鸟苷 dGTP和脱氧胞苷三磷酸 dCTP每种浓度均为2 mM, 20 微居里磷³²-脱氧胞苷三磷酸 P³²-dCTP (3000 居里/mmM), 8 微克伴刀豆球蛋白诱导T细胞的多聚腺核苷酸 Poly A⁺, 60 单位单链RNA (生物技术公司, Madison, WI), 2 微克载体-引导物DNA (15 Pmol 引物末端)和45 单位逆转录酶。反应在42℃进行60分钟, 加入1 微升0.25 M 乙二胺四乙酸 (PH 8.0)和0.5 微升10%十二烷基磺酸钠以终止反应, 加入40 微升酚-氯仿, 用混合器充分混合溶液, 然后离心。将40 微升4 M 醋酸铵和160 微升乙醇加至水相中, 用于冰冷却溶液15分钟, 再缓慢振荡至室温以溶解在冷却过程中沉淀出来未反应的脱氧核苷酸三磷酸盐, 并用Eppendorf微量离心管离心10分钟。将沉淀溶于10 微升10 mM三羟甲基氨基甲烷·盐酸PH 7.3和1 mM乙二胺四乙酸中, 加入10 微升4 M 醋酸铵, 并加入40 微升乙醇再沉淀。这个步骤去掉99%以上未反应的脱氧核苷酸三磷酸盐, 再用乙醇洗沉淀。

步骤2: 加入寡脱氧胞苷酸 [Oligo (dC)]。将含有质粒, \circ DNA: mRNA的沉淀溶于20 微升140 mM卡可盐酸盐-80 mM三羟甲基氨基甲烷·盐酸PH 6.8缓冲液中, 其中含有1 mM氯化钴, 0.1 mM二硫苏糖醇, 0.2 微克多聚腺苷酸 Poly A, 70 μ M脱氧胞苷三磷酸 dCTP, 5 微居里磷³²-脱氧胞苷三磷酸 dCTP, 3000 居里/mmM和60 单位末端脱氧核苷酸转移酶。反应在37℃进行5分钟后, 每个末端加入10-15个脱氧胞苷-磷酸

残基 d O M P , 再加入 2 微升 0 . 2 5 M 乙二胺四乙酸 (P H 8 . 0) 和 1 微升 1 0 % 十二烷基磺酸钠以终止反应。用 2 0 微升酚 - 氯仿抽提后, 水相和 2 0 微升 4 M 醋酸铵混合, 沉淀 D N A , 用 8 0 微升乙醇再沉淀 D N A , 最后得到的沉淀用乙醇洗涤之。

步骤 3, H i n d III 限制性内切酶酶切。将沉淀溶于含有 2 0 m M 三羟甲基氨基甲烷·盐酸 P H 7 . 4 , 7 m M 氯化镁, 6 0 m M 氯化钠和每毫升 0 . 1 毫克牛血清清蛋白的 8 0 微升缓冲液中, 然后用 1 0 单位 H i n d III 限制性内切酶酶切, 3 7 C , 2 小时。加入 8 微升 0 . 2 5 M 乙二胺四乙酸 (P H 8 . 0) 和 1 . 5 微升 1 0 % 十二烷基磺酸钠以终止反应, 用酚 - 氯仿抽提后, 再加入 8 0 微升 4 M 醋酸铵, 用 1 2 0 微升乙醇沉淀 D N A 。用乙醇洗涤沉淀, 再溶于 1 0 微升 1 0 m M 三羟甲基氨基甲烷·盐酸 (P H 7 . 8) 和 1 m M 乙二胺四乙酸的溶液中, 加入 8 微升乙醇以防止在 - 2 0 C 低温保存时冻结。

步骤 4: 利用寡 (脱氧鸟苷酸) O l i g o - (d C) 末端 D N A 连接物进行环化作用。在含有 1 0 m M 三羟甲基氨基甲烷·盐酸 P H 7 . 5 , 1 m M 乙二胺四乙酸, 0 . 1 M 氯化钠和 1 . 8 p m a l 寡 (脱氧鸟苷) O l i g o - (d G) 末端 D N A 连接物的反应液中 (9 0 微升), 9 微升 H i n d III 限制性内切酶酶切的寡 (脱氧胞苷) O l i g o - (d C) - 末端 c D N A : m B N A 质粒 (大约为样品的 9 0 %) 在 6 5 C , 保温 5 分钟, 再改变温度至 4 2 C , 6 0 分钟, 最后冷却至 0 C 。将 9 0 微升反应液体积调节至 9 0 0 微升, 其中含有 2 0 m M 三羟甲基氨基甲烷·盐酸 P H 7 . 5 , 4 m M 氯化镁, 1 0 m M 硫酸铵, 0 . 1 M 氯化钾, 每毫升 5 0 微克牛血清清蛋白和 0 . 1 m M β - 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 β - N A D , 加入 6 微克大肠杆菌 D N A 连接酶, 在 1 2 C 保温过夜。

步骤 5: 用 D N A 取代 B N A 链。为了取代插入的 B N A 链, 调节

连接反应液使其包含有四种脱氧核苷三磷酸，每种浓度为 $40\ \mu\text{M}$ ， $0.15\ \text{mM}$ b-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸，并加入4微克大肠杆菌DNA连接酶，16单位大肠杆菌DNA多聚酶I (P_o1I)，和9单位大肠杆菌核糖核酸酶II。这种反应液(960微升)在12℃充分保温再在室温保温1小时以充分促进每一种最适的修复合成和多聚酶I的缺口翻译作用。

步骤6：转化大肠杆菌，采用略加修改的Cohen等人方法(美国科学院院报，69:2110-2114 [1972])进行转化。大肠杆菌k-12菌种MC1061 (Casadaban, M. 和Cohen, S., 分子生物学, 138:179-207 [1980]) 37℃在20毫升L-培养基中生长至 $600\ \text{nm}$ 吸收值为0.5。离心收集细胞，悬浮于含有50 mM氯化钙的10毫升10 mM三羟甲基氨基甲烷·盐酸PH 7.3的缓冲液中，0℃，离心5分钟。细胞再悬浮于2毫升上述缓冲液中，再在0℃保温5分钟，然后0.2毫升细胞悬浮液同0.1毫升DNA溶液相混合(步骤5)，在0℃保温15分钟。然后将细胞保存于37℃2分钟，再置于室温10分钟，加入0.5毫升L-培养基，培养液于37℃保温30分钟，在42℃同2.5毫升L-培养基软琼脂混合，铺在含有50微克/毫升氨苄青霉素的L-琼脂培养基上。37℃保温12-24小时，用消过毒的牙签挑出单个菌落。一般而言可以得到 5×10^4 单个cDNA克隆。

E. 用DNA转染作用筛选人T细胞cDNA库

从T细胞cDNA库随机挑选 10^4 单个的克隆。在加有含50微克/毫升氨苄青霉素和7%二甲亚砜的200微升L-培养基的微滴平板小孔中单个进行培养。从微滴平板培养液中可以得到有48个cDNA克隆的库。将40个这种库生长于1升含有100微克/毫升氨苄青霉素的L

培养基中，从每一种培养液中分离质粒，采用两次氯化铯密度梯度离心进行提纯。将每个库的代表DNA按下列方法转染至COS-7猴细胞中。

转染前一天，将 10^6 COS-7猴细胞种至加有10%胎牛血清和2M谷氨酰胺DME培养基的单个60毫米平板上。为了进行转染，从每一平板吸出培养基，换上1.5毫升含有50 mM三羟甲基氨基甲烷·盐酸PH7.4，400微克/毫升。-二乙胺基乙基DEAE-巧聚糖和15微克进行实验的质粒DNA的DME培养基。将平板于37℃保温4小时，然后去掉含有DNA的培养基。用2毫升没有血清的DME洗涤平板两次。再将含150 μ M氯喹的DME加至平板，于37℃保温3小时。用DME洗涤平板一次，再加入含有4%胎牛血清，2mM谷氨酰胺，青霉素和链霉素的DME。在37℃保温培养细胞72小时。收集生长培养基，按前述方法实验GM-CSF的活性。

4个库（组别1A，3B，7A和14A）产生人GM-CSF活性（见下列表1）。每一组再分为6个库，每个含有原来克隆库中的8个。每一个原来库的一个次级库在转染实验中为阳性，只有7A例外，它有2个阳性的次级库。在5个次级库中的4个，每种质粒均分别地转染至COS-7细胞。有4个单独克隆各为3-8a，7-1a，7-4d和14-1。具有产生GM-CSF的活性。限制性内切酶分析表明所有这些克隆都有本质上相同的结构。

表I代表了在重复的脐带血实验中，每种转染样品刺激红细胞的群落数目。一群代表20-50个细胞，小群落有51-150细胞，一个群落细胞数目多于150个。

表 I

质粒DNA转染对群落刺激的活性实验

第一筛 48个克隆中40个库(1-20, A+B)

Mock-感染Cos-7; 7+12群

库1A; 29+25群

库3B; 38+20群

库7A 22+19群

库14A 26+32群

所有其他库; 少于20群

第二筛 8个克隆的次级库

Mock-感染Cos-7; 9+15群

次级库 1-5; 56+54群

次级库 3-8; 98+52小群落

次级库 7-1; 29+41小群落

次级库 7-4; 100+98小群落

次级库 14-1; 40+78小群落

所有其他次级库; 少于20群

第三筛 单个克隆

克隆3-8a; 120+127群落

克隆7-1a; 198+164群落

克隆7-4a; 176+160群落

克隆14-1e; 62+67群落

所有其他克隆; 少于20群

一个带有足够长度cDNA插入子的质粒(PCD-人-GM-

CSF) 见图 2。一种含有质粒的大肠杆菌 (M01061) 已由美国菌种保藏中心 ATCC 保存 (保存号 39923)。在图 2 中, 包括在来自 SV40 早期启动子的 P_{CD} 表达载体中的 776 碱基对。DNA 的转录已由箭头表示。供体与受体的结合点定位也已说明。来自 SV40 的一种多聚腺苷酰作用信号位于 cDNA 插入子的 3' - 末端。在 cDNA 插入子中的 GM-CSF 编码区是深色影部, 而非编码区是浅影部。载体的其他序列来自于 PBR³²², 其中包括 β -内酰胺酶基因 (抗氨基青霉素) 和复制起始区。

无论采用 M13 双去氧链末端法 (Sanger, F. 等美国科学院学报, 74: 5463-5467 [1977]) 还是修改的 Maxam/Gilbert 技术 (Rubin, C. 和 Schmid, C., 核酸研究, 8: 4613-4619 [1981]) 都可以测定 3-8a 序列。cDNA 插入子具有一个开放译读结构。第一个 ATG 发现于 5' - 末端的 33-35 核苷酸, 在三联体 (TGA) 末端前 465-467 核苷酸处接着 144 个密码。

表 II 表明, 在单个克隆 3-8a, 7-1a, 7-4d 和 14-1e 影响下, 大约 60 个人骨髓和脐带血生长群落细胞组分破坏的百分数。其中有嗜伊红细胞和其他型细胞的混合群落存在, 这是由于群落生长在一起的原故。

表 II 人骨髓群落细胞组分

| 嗜中性 细胞 (Neu) | 巨噬 细胞 (M θ) | 嗜伊红 细胞 (Eos) | 嗜中性 细胞 巨噬细胞 (Neu/ M θ) | 巨噬细胞 嗜伊红 细胞 (M θ / EOS) | 嗜中性 巨噬 嗜伊红 细胞 (Neu/M θ / EOS) |
|--------------------|---------------------------|--------------------|--|--|---|
| 15% | 30% | 7% | 37% | 2% | 9% |

一种编码小鼠 GM-CSF 活性的足够长 cDNA 已被分离出来。具有小鼠 cDNA 的质粒 PCD 存在于大肠杆菌 (MC1061) 中。这种菌已由美国菌种保藏中心 ATCC 保藏 (编号 39924)。磷 32 标记的 PStI / AlaIII 鼠 cDNA 片段, 在不严格的条件下, (42℃) 和本发明的一种人 GM-CSF cDNA's 进行杂交。(见 Maniatis, T.等。分子克隆, 一种实验室操作, 冷泉港实验室[1982])。

图 3 是推测的鼠和人 GM-CSF 蛋白质结构间的比较。同样的残基已划线标出 (排列成行后), 在人蛋白质中减少, 而在鼠蛋白中存在的残基已由星号标明, 只在鼠中存在的残基 (例如 57-58 位丝氨酸+天门冬酰胺和 65 位赖氨酸-赖氨酸) 已用短垂直线标出。鼠和人 GM-CSF cDNA 之间的同源性是十分令人惊讶的。这两种 GM-CSF 序列间总共有 70% 同源性 (Brutlag, D. 等核酸研究, 10 : 279-294[1981])。但是本发明的人 GM-CSF 在体外并不显著刺激鼠造血干细胞的生长。

PCD 表达载体克隆库能够通过 在哺乳动物细胞中的直接表达来确定全部 cDNA 克隆。尤其是通过随机挑选 cDNA 克隆和测定分泌呈细胞上清液的 GM-CSF 活性, 全部人 GM-CSF cDNA 克隆可以直接通过 COS-7 细胞转染而确定。这些结果可以肯定, 在确定一种真核细胞功能多肽的基础上, 唯一可以实现的是确定淋巴因子或激素的足够长度 cDNA 克隆。

根据上述事实, 可以认为本发明的 cDNA 克隆提供了一种人 GM-CSF 完整和精确的序列资料。本发明也提供了可以产生大量在体外改进嗜中性细胞, 粒细胞, 巨噬细胞以及其他造血细胞 (例如嗜伊红细胞) 维持的因子 (实际上没有其他造血因子) 的艺术性技巧。进一步, 从 cDNA 克隆所得到的资料, 可以增加对哺乳类免疫反应的了解, 加强

实验研究能力。

人GM-CSF

10 20 30 47
 ACACAGAGAG AAAGGCTAAA GTTCTCTGGA GG ATG TGG CTG CAG ACC CTG CTG CTC TTC
 MET Trp Leu Gln Ser Leu Leu Leu Leu

 62 77 92 107
 GGC ACT GTG GCC TGC AGC ATC TCT GCA CCC GCC CGC TCG CCC AGC CCC AGC ACC
 Gly Thr Val Ala Cys Ser Ile Ser Ala Phe Ala Arg Ser Pro Ser Phe Ser Thr

 122 137 152 167
 CAG CCC TGG CAG CAT GTG AAT GCC ATC CAG GAG GCC CGG CGT CTC CTG AAC CTC
 Gln Pro Trp Glu His Val Asn Ala Ile Gln Glu Ala Arg Arg Leu Leu Asn Leu

 182 197 212
 AGT AGA GAC ACT GCT GCT GAG ATG AAT GAA ACA GTA GAA GTC ATC TCA GAA ATG
 Ser Arg Asp Thr Ala Ala Glu Met Asn Gln Thr Val Glu Val Ile Ser Glu Met

 227 242 257 272
 TTT GAC CTC CAG GAG CCG ACC TGC CTA CAG ACC CGC CTC GAG CTC TAC AAG CAG
 Phe Asp Leu Gln Glu Pro Thr Cys Leu Gln Thr Arg Leu Glu Leu Tyr Lys Gln

 287 302 317
 GGC CTC CGG GCC ACC CTC ACC AAG CTC AAG GCC CCC TTG ACC ATG ATG GCC ACC
 Gly Leu Arg Gly Ser Leu Thr Lys Leu Lys Gly Phe Leu Thr Met Met Ala Ser

 332 347 362 377
 CAC TAC AAG CAG CAC TGC CCT CCA ACC CCG GAA ACT TCC TCT GCA ACC CAG ATT
 His Tyr Lys Gln His Cys Pro Phe Thr Pro Glu Thr Ser Cys Ala Thr Gln Ile

 392 407 422 437
 ATC ACC TTT GAA AGT TTC AAA CAG AAC CTG AAG GAC TTT CTC CTT CTC ATC CCC
 Ile Thr Phe Glu Ser Phe Lys Glu Asn Leu Lys Asp Phe Leu Leu Val Ile Pro

 452 467 477 487 497
 TTT GAC TGC TGG CAG CCA GTC CAG GAG TCA GACCGGCCAG ATGAGGCTGG CCAAGCCCGG
 Phe Asp Cys Trp Glu Pro Val Gln Glu .

 507 517 527 537 547 557 567
 GAGCTGCTCT CTCATGAAAC AAGAGCTAGA AACTCAGGAT GGTCTATCTTG GAGGCACCAA GGGGTGGCCC

 577 587 597 607 617 627 637
 ACAGCCATGG TGGGAGTGGC CAGGACCTGC CCTGGGCACA CTGACCCTGA TACAGGCATG GCAGAAGAAT

 647 657 667 677 687 697 707
 GGGAAATATT TATACTGACA GAAATCAGTA ATATTTATAT ATTTATATTT TTAATAATATT TATTTATTTA

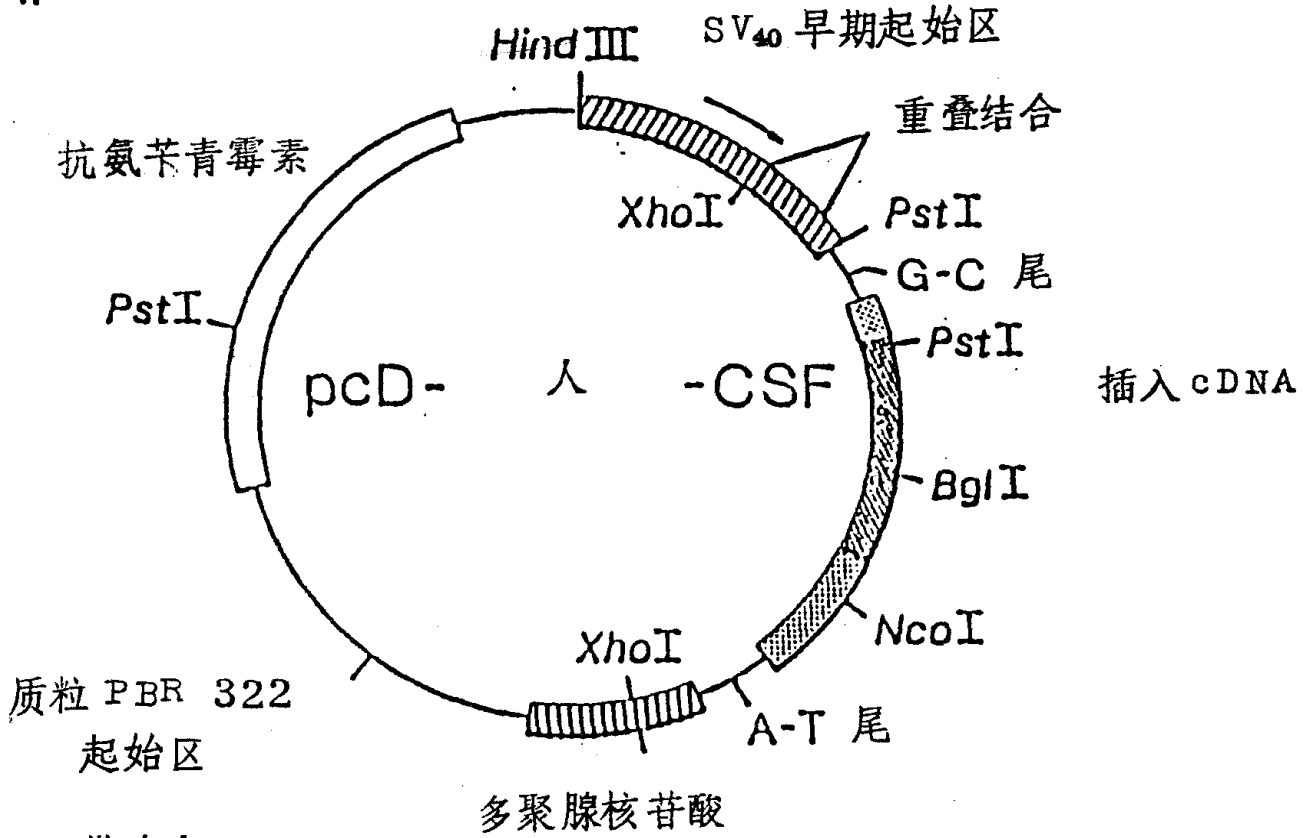
 717 727 737 747 757 767 777
 TTTATTTAAG TTCATATTCC ATATTTATTC AAGATGTTTT ACCGTAATAA TTATTATTTA AATATGCTT

 787
 CTAATAAATAA

图 1

图 2

A.



多聚腺核苷酸
带有人
B. GM-CSF
cDNA 片段的质粒 P^{CD} 限制性内切酶图谱

