[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl[6]
A61K 38/22
A61K 38/27 C12Q 1/00
C07H 21/02 C07H 21/04
C07K 14/61 C12N 1/00
C12N 5/10 C12N 15/18

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95191875.3

[43]公开日 1997 年 2 月 5 日

[11] 公开号 CN 1142188A

[22]申请日 95.1.27

[30]优先权

[32]94.1.27 [33]US[31]08/187,756

[86]国际申请 PCT/US95/01130 95.1.27

[87]国际公布 WO95/20398 英 95.8.3

[85]进入国家阶段日期 96.8.29

[71]申请人 人体基因组科学有限公司

地址 美国马里兰州

[72]发明人 克雷格·A·罗森 蒂莫西·A·科尔曼
马克·D·亚当斯
詹尼恩·D·戈凯恩

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 刘国平

权利要求书 3 页 说明书 24 页 附图页数 9 页

[54]发明名称 人生长激素

[57]摘要

本发明提供了编码天然存在的人生长激素剪接变异体 hGHV-2(88)和 hGHV-3(53)及其类似物和衍生物的 DNA(或 RNA)多核苷酸序列,所述的多核苷酸缺少正常存在于编码野生型人生长激素的基因中的核苷酸序列。本发明的生长激素变异体是人源的并在诊断、预防和治疗某些人类疾病中是有用的。本发明还涉及通过重组 DNA 技术生产人生长激素变异体的方法,还提供了生产抗野生型生长激素抗体并因此抑制其活性的方法。

权　利　要　求　书

1、一种分离出的多核苷酸，选自

(a)编码具有SEQ ID No.5 的推导的氨基酸序列的多肽或者所述多肽的片段、类似物或衍生物的多核苷酸;

(b)编码具有由ATCC保藏号75600所含的cDNA 编码的氨基酸序列的多肽或者所述多肽的片段、类似物或衍生物的多核苷酸。

(a)编码具有SEQ ID No.6 的推导的氨基酸序列的多肽或者所述多肽的片段、类似物或衍生物的多核苷酸；以及

(b)编码具有由ATCC保藏号75601所含的cDNA 编码的氨基酸序列的多肽或者所述多肽的片段、类似物或衍生物的多核苷酸。

2、如权利要求1所述的多核苷酸，其中该多核苷酸是DNA。

3、如权利要求1所述的多核苷酸，其中该多核苷酸是RNA。

4、如权利要求1所述的多核苷酸，其中该多核苷酸是基因组DNA。

5、如权利要求2所述的多核苷酸，其中所述的多核苷酸编码具有SEQ ID No.5的推导的氨基酸序列的多肽。

6、如权利要求2所述的多核苷酸，其中所述的多核苷酸编码具有SEQ ID No.6的推导的氨基酸序列的多肽。

7、如权利要求2所述的多核苷酸，其中所述的多核苷酸编码由 ATCC 保藏号75600的cDNA编码的多肽。

8、如权利要求2所述的多核苷酸，其中所述的多核苷酸编码由 ATCC 保藏号75601的cDNA编码的多肽。

9、权利要求1的多核苷酸，具有SEQ ID No.2所示的编码序列。

10、权利要求1的多核苷酸，具有SEQ ID No.3所示的编码序列。

11、权利要求2的多核苷酸，具有ATCC保藏号75600所保藏的编码序列。

12、权利要求2的多核苷酸，具有ATCC保藏号75601所保藏的编码序列。

13、含有权利要求2的DNA的载体。

14、用权利要求13的载体遗传工程化的宿主细胞。

15、生产多肽的方法，包括：用权利要求14的宿主细胞表达由所述DNA 编码的多肽。

16、生产能表达多肽的细胞的方法，包括用权利要求13的载体遗传工程化细胞。

17、可与权利要求2的DNA杂交的、并编码具有hGHV-2(88)活性的多肽的分离出的DNA。

18、可与权利要求2的DNA杂交的、并编码具有hGHV-3(53)活性的多肽的分离出的DNA。

19、一种多肽，选自：(i)具有SEQ ID No.5的推导的氨基酸序列的多肽及其片段、类似物和衍生物；(ii)由ATCC保藏号75600的cDNA 编码的多肽及所述多肽的片段、类似物和衍生物；(iii)具有SEQ ID No.6的推导的氨基酸序列的多肽及其片段、类似物和衍生物；以及(iv)由ATCC保藏号75601的cDNA 编码的多肽及所述多肽的片段、类似物和衍生物。

20、权利要求19的多肽，其中该多肽具有SEQ ID No.5的推导的氨基酸序列。

21、权利要求19的多肽，其中该多肽具有SEQ ID No.6的推导的氨基酸序列。

22、权利要求19的多肽的抗体。

23、治疗需要人生长激素活性的患者的方法，包括给予患者药物有效量的权利要求20的多肽。

24、治疗需要抑制人生长激素活性的患者的方法，包括给予患者药物有效量的权利要求21的拮抗剂。

25、权利要求23的方法，其中通过提供给患者编码所述多肽的DNA 并在体内表达所述多肽而给予所述的药物有效量的多肽。

26、权利要求24的方法，其中通过提供给患者编码所述多肽的DNA 并在体内表达所述多肽而给予所述的药物有效量的多肽。

说　　明　　书

人生长激素

本发明涉及新鉴定的多核苷酸、由该多核苷酸编码的多肽、这些多核苷酸和多肽的应用，以及这些多核苷酸和多肽的生产。更具体地，本发明的多肽是天然存在的人生长激素的剪接变异体h GHV－2 (88) 和h GHV－3 (53)。本发明还涉及抑制这些多肽的作用。

人生长激素是由脑下垂体产生并释放的，h GHwt 是具有多种有用功能的肽激素。人生长激素的一个独特活性是其介导线性骨骼生长。人生长激素还具有催乳活性并已证明其参与如脂类、氮和碳水化合物的代谢过程，最近对人生长激素的研究开始提示该分子的不同区域可能参与控制上述活性。人生长激素的其它应用包括其治疗老年人髋骨折、慢性肾功能不全、Turner's 综合症，癌症以及HIV 感染及其后续影响。

已付出了很大的努力研究人生长激素分子及其与人体其它细胞和器官能的相互作用，以尝试调节人生长激素对人体中这些靶子的作用。例如，野生型人生长激素 (h GHwt) 目前用于治疗人生长激素天然不足的垂体机能减退症。因此，刺激垂体机能减退症病人的人生长激素的天然产生或竞争人生长激素的受体位点的方法将很有价值，特别是对于某些生长异常能够产前诊断这一事实更有价值。

1987 年6 月2 日授予Seeburg 的USP4，670，393 披露了使用重组DNA 技术生产人生长激素变异体蛋白及确定DNA 序列和191 个氨基酸的氨基酸序列的方法，然而在本发明的之前，没有公开过人生长激素多肽2 个天然存在的剪接变异体。

本发明的多肽被推定为人生长激素剪接变异体，这一鉴定是根据与野生型人生长激素 (h HGwt) 氨基酸序列的同源性结果而做出的。

根据本发明的一个方面，提供了新的成熟多肽，该多肽为天然发生的人生长激素剪接变异体h GHV－2 (88) 和h GHV－3 (53)，及其具生长活性的和诊断用或药用片段、类似物和衍生物。本发明的多肽是人源的。

根据本发明的另一个方面，提供了编码h GHV－22 (88) 和h GHV－

3 (5 3) 的分离出的核酸分子，包括mRNA、DNA、cDNA、基因组DNA及类似物和具生物活性的和诊断用或药用片段。

根据本发明的再一方面，提供了通过重组技术生产这类多肽的方法，包括在促进所述蛋白质表达的条件下培养含hGHV-2 (8 8) 或hGHV-3 (5 3) 核酸序列的重组原核和/ 或真核宿主细胞，随后回收所述蛋白。

根据本发明的又一方面，提供了使用这类多肽或编码这类多肽的多核苷酸用于治疗目的的方法，例如，刺激野生型hGH的作用以及用于抑制野生型hGH的作用。

根据本发明的另一方面，提供了包含足够长度的核酸分子以特异地与人hGHV-2 (8 8) 和hGIIV-3 (5 3) 序列杂交的探针。

根据本发明的再一方面，提供了抗这类多肽的抗体。

根据本发明的又一方面，提供了抗这类多肽的拮抗剂，其在例如治疗垂体机能减退症中可用于抑制这类多肽的作用。

根据本文的教导，本发明的这些及其它方面对本领域熟练技术人员将是显而易见的。

下述附图示出了本发明的实施方案并非限制由权利要求书限定的本发明的范围。

图1 是野生型人生长激素、变异体hGHV-2 (8 8) 和变异体hGHV-3 (5 3) 的多肽的示意图。

图2 (a) 示出野生型hGH的cDNA及相应推导出的氨基酸序列；图2 b) 示出hGHV-2 (8 8) 的cDNA及相应推导出的氨基酸序列；图2 (c) 示出hGHV-3 (5 3) 的cDNA及相应推导出的氨基酸序列。使用了氨基酸的标准单字母缩写。使用373 Automated DNA测序仪 (Applied Biosystems, Inc.) 测序，测序精确度预期超过97 %。

图3 示出含野生型hGH、hGHV-2 (8 8) 和hGHV-3 (5 3) 编码序列的克隆经细菌表达和纯化后的凝胶。

图4 示出图3 所示的纯化蛋白质结合到正常存在于I M－9 细胞上的h G H受体的能力。

根据本发明的一个方面，提供了编码具有图2 的推导的氨基酸序列（S E Q I D NO．5 和6 ）的成熟多肽或编码由1 9 9 3 年1 1 月3 日保藏的h G H V－2 （8 8 ）和h G H V－3 （5 3 ）克隆，保藏号分别为A T C C 7 5 6 0 0 和A T C C 7 5 6 0 1 的c D N A编码的成熟多肽的分离出的核酸（多核苷酸）。

编码本发明的多肽的多核苷酸可以从脑下垂体组织得到，它们在结构上与h G H w t 相关并含有编码1 7 2 和1 5 1 个氨基酸的成熟多肽的开放读框。它们与h G H w t 完全同源，只是由于另外的m R N A剪接结果缺失了一些氨基酸。变异体h G H V－2 （8 8 ）和变异体h G H V－3 （5 3 ）是由前m R N A经另外的剪接而产生，该前m R N A的外显子－2 的剪接供体位点融合成两个另外的位于外显子－3 中的位点。这种剪接的结果是分别去掉了5 7 和1 2 0 个核苷酸。

本发明的多核苷酸可以是R N A形式和D N A形式，D N A包括c D N A、基因组D N A和合成D N A，D N A可以是双链或单链，并且如果是单链的，则可以是编码链或非编码（反义）链。编码成熟多肽的编码序列可以与图2 所示的编码序列（S E Q I D NO．5 和6 ）或保藏的克隆的编码序列相同，或者其可以是是不同的编码序列，该编码序列由于遗传密码的丰余性或简并性的结果编码与图2 的D N A （S E Q I D NO．2 和3 ）或保藏的c D N A编码的成熟多肽相同的成熟多肽。

编码图2 的成熟多肽（S E Q I D NO．5 和6 ）或者编码由保藏的c D N A编码的成熟多肽的多核苷酸包括但不限于：仅仅是成熟多肽的编码序列：成熟多肽的编码序列和附加的编码序列如前导序列或分泌序列或前蛋白序列；成熟多肽的编码序列（和选择性的附加的编码序列）和非编码序列如内含子或成熟多肽的编码序列的5 ’和/ 或3 ’非编码序列。

因此，术语“编码多肽的多核苷酸”覆盖了仅包括多肽的编码序列的多核苷酸，以及包括附加的编码和/ 或非编码序列的多核苷酸。

本发明还涉及上述多核苷酸的变异体，这些变异体编码具有图2 所示的推导出的氨基酸序列（S E Q I D NO．5 和6 ）的多肽或由保藏的克隆的c D N A编码的多肽的片段、类似物和衍生物。多核苷酸的变异体可以是天然发生的多核苷酸的等位变异体，或是非天然发生的多核苷酸的变异体。

因此，本发明包括编码与图2 所示（SEQ ID NO. 5 和6 ）相同的成熟多肽、或者与保藏克隆的c DNA编码的相同的成熟多肽的多核苷酸，以及这些多核苷酸的变异体，这些变异体编码图2 的多肽（SEQ ID NO. 5 和6 ）或保藏的克隆的c DNA编码的多肽的片段、衍生物或类似物。这些核苷酸的变异体包括缺失变异体、置换变异体以及增加或缺失变异体。

如上所述，多核苷酸可以具有一编码序列，该序列是图2 所示的编码序列（SEQ ID NO. 2 和3 ）或者保藏克隆的编码序列的天然发生的等位变异体。如本领域公知的，等位变异体是多核苷酸序列的另外的形式，其可以具有一式多个核苷酸的取代、缺失或增加，基本上不影响所编码的多肽的功能。

本发明还包括多核苷酸，其中成熟多肽的编码序列可以在相同的读框中与有助于多肽从宿主细胞表达或分泌的多核苷酸序列如前导序列融合，所述的前导序列的功能是作为控制多肽从细胞中输送的分泌序列。具有前导序列的多肽是前蛋白，其中的前导序列可被宿主细胞切掉以形成成熟的多肽。多核苷酸还可以编码蛋白原（proprotein），其为成熟蛋白加上附加的5 ’ 端氨基酸残基。具有序列原（prosequence）的成熟蛋白是蛋白原并是蛋白质的非活性形式。当切除序列原后，留下的是有活性的成熟蛋白。

因此，例如本发明的多核苷酸可以编码成熟蛋白，或者编码具有序列原的蛋白质，或者编码具有序列原和前序列（前导序列）的蛋白质。

本发明的多核苷酸还可以具有在读框内与标记序列融合的编码序列，该标记序列可以用于本发明的多肽的纯化。在细菌宿主中标记序列可以是由pQE-9 载体提供的六组氨酸标记物，用以纯化与标记物融合的成熟多肽，或者，例如在使用哺乳动物宿主如COS-7 细胞时，标记序列则可以是血凝素（HA）标记物。HA标记物对应于由流感病毒血凝素蛋白衍生的抗原决定簇（Wilson, I., et al., Cell, 37: 767 (1984)）。

本发明还涉及与上述序列杂交的多核苷酸，条件是在所述的序列间具有至少50 %、优选70 %的同一性。本发明尤其涉及在严格条件下与上述多核苷酸杂交的多核苷酸，如本文中所使用的，术语“严格条件”是指杂交仅在有至少95 %、优选至少97 %同一性时发生。在一优选的实施方案中，与上述多核苷酸杂交的多核苷酸所编码的多肽基本上保持与图2 的c DNA（SEQ ID NO. 2 和3 ）或保藏的c DNA编码的成熟多肽相同的功能或活性。

本文所指的保藏物将根据国际承认的用于专利程序的微生物保藏的布达佩斯条约规定的期限予以保存。这些保藏物仅为本领域熟练技术人员的方便而提供，并且不是对根据 35 U.S.C. 112 所需保藏物的许可。保藏物中所含的多核苷酸序列以及由该多核苷酸编码的氨基酸序列引入本文作参考，并且当与本文序列的描述有矛盾时，其是决定性的。制造、使用或销售保藏物均需得到许可，这种许可现在不授予。

本发明还涉及具有图2 的推导的氨基酸序列（SEQ ID NO. 5 和6 ）或者具有保藏的c DNA 编码的氨基酸序列的多肽，以及这种多肽的片段、类似物和衍生物。

术语“片段”、“衍生物”和“类似物”当指图2 的多肽（SEQ ID NO. 5 和6 ）或指由保藏的c DNA 编码的多肽时，意味着基本上保持着这种多肽的相同的生物学功能或活性的多肽。因此，类似物包括蛋白原，该蛋白原应可以通过切除蛋白原部分而得以活化以产生有活性的成熟多肽。

本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽或合成多肽，优选为重组多肽。

图2 的多肽（SEQ ID NO. 5 和6 ）的片段、衍生物或类似物或者保藏的c DNA 编码的多肽的片段、衍生物或类似物可以是（i ）其中一或多个氨基酸残基被保守的或非保守的氨基酸残基（优选保守的氨基酸残基）取代，并且这种被取代的氨基酸残基可以是或可以不是由遗传密码所编码，或者（i i ）其中的一或多个氨基酸残基包括一取代基，或者（i i i ）其中的成熟多肽与另一化合物融合，该化合物可以是增加多肽的半寿期的化合物（例如聚乙二醇）；或者（i v ）其中的成熟多肽融合了附加的氨基酸，如前导序列或分泌序列或者用于纯化成熟多肽的序列或蛋白原序列。这类片段、衍生物或类似物被认为包括在本领域熟练技术人员从本文的教导得出的范围内。

本发明的多肽和多核苷酸优选以分离出的形式提供，并优选是纯化至均一性。

术语“分离出的”是指所述的物质离开了其原始环境（例如若其为天然发生的，则是天然环境）。例如，存在于活体动物中的天然发生的多核苷酸或多肽不是分离出的，然而从天然系统中的一些或所有共存物质中分离的同样的多核苷酸或多肽则是分离出的。这种多核苷酸可以是载体的一部分和/ 或这种多核苷酸或多肽可以是组合物的一部分，并且这种载体或组合物不是其天然环境的一部分。

本发明还涉及包括本发明的多核苷酸的载体，用本发明的载体进行遗传工程操作的宿主细胞，以及用重组技术生产本发明的多肽。

宿主细胞用本发明的载体进行遗传工程操作（转导或转化或转染），本发明的载体例如可以是克隆载体或表达载体，载体可以例如是质粒、病毒颗粒、噬菌体等。工程宿主细胞可以在改进的传统营养培养基中培养，改进的培养基是使之适用于激活启动子、选择转化子或扩增h G H V －2 （8 8 ）和h G H V －3 （5 3 ）基因。培养条件如温度、p H 等是先前选择用于宿主细胞的表达的条件，并对本领域普通技术人员是显而易见的。

可以通过重组技术使用本发明的多核苷酸生产多肽。因此，例如，所述的多核苷酸可以包括在任一种表达载体中用于表达多肽，这种载体包括染色体、非染色体和合成D N A 序列，例如，S V 4 0 衍生物、细菌质粒、噬菌体D N A 、杆状病毒、酵母质粒、质粒和噬菌体D N A 结合衍生的载体、病毒D N A 如痘苗病毒、腺病毒、禽痘病毒、假狂犬病毒。然而，也可使用其它载体，只要其能在宿主中复制和生存即可。

可通过多种程序将合适的D N A 序列插入载体，通常，可通过本领域公知的程序将D N A 序列插入合适的限制性内切酶位点，这些程序及其它程序被视为属于本领域熟练技术人员的范畴。

表达载体中的D N A 序列可以与合适的表达控制序列（启动子）连接以指导m R N A 合成。作为这些启动子的代表性例子，可以提及的有：L T R 或S V 4 0 启动子，E . c o l i l a c 或t r p 启动子，λ噬菌体P L 启动子和其它公知的控制原核或真核细胞或其病毒的基因表达的启动子。表达载体还可以含有用于翻译起始的核糖体结合位点以及转录终止子，载体还可以包括用于扩增表达的合适序列。

另外，表达载体优选含有一或多个选择性标记基因以提供表型特征用于选择转化的宿主细胞，例如真核细胞培养物中的二氢叶酸还原酶或新霉素抗性，或者E . c o l i 中的四环素或氨苄青霉素抗性。

含有上述合适的D N A 序列以及合适的启动子或控制序列的载体可以用来转化合适的宿主以使得宿主表达蛋白质。

作为合适宿主的代表性例子，可以提及的有：细菌细胞如E . c o l i ，链霉菌，鼠伤寒沙门氏杆菌；真菌细胞如酵母；昆虫细胞如果蝇S 2 和粘虫S f 9 ：动

物细胞如CHO，COS 或Bowes 黑素瘤；腺病毒；植物细胞等。选择合适的宿主由本领域熟练技术人员根据本文的教导而能作出。

更具体地，本发明还包括一或多个上述序列的重组构建物，该构建物包括一载体，如质粒或病毒载体，载体中以正向或反向插入本发明的序列。在这一实施方案的优选方面，构建物还包括调节序列，如与所述序列连接的启动子。本领域熟练技术人员已知许多合适的载体和启动子并且这些载体和启动子是可商购的。举例提供下述载体；细菌：pQE70，pQE60，pQE-9 (Qiagen)，pBS，pD10，phagescript，psiX174，pbluescript SK，pbsks，pNH8A，pNH16a，pNH18A，pNH46A (Stratagene)；ptrc99a，pKK223-3，pKK233-3，pDR540，pRIT5 (Pharmacia)；真核：pWLNEO，pSV2CAT，pOG44，pXT1，pSG (Stratagene)，pSVK3，pBPV，pMSG，pSVL (Pharmacia)。然而，可以使用其它质粒或载体，只要其能在宿主中复制和生存即可。

启动子区可以使用CAT (氯霉素转移酶) 载体或其它带选择标记的载体选自任何希望的基因。两个合适的载体为pKK232-8 和pCM7。特别指出的细菌启动子包括lacI、lacZ、T3、T7、gpt、λP_R、P_L、和trp。真核启动子包括CMV 立即早期、HSV 胸腺嘧啶激酶、早和晚SV40，反转录病毒的LTRs，以及鼠金属硫蛋白-I。选择合适的载体和启动子属于本领域普通技术人员的水平。

在另一实施方案中，本发明涉及含上述构建物的宿主细胞。该宿主细胞可以是高等真核细胞如哺乳动物细胞，或是低等真核细胞，如酵母细胞，或者宿主细胞可以是原核细胞如细菌细胞。将构建物导入宿主细胞可以通过磷酸钙转染、DEAE-DEXTRAN介导的转染或电穿孔实现 (Davis，L.，Dibner，M.，Battey.，I.，Basic Methods in Molecular Biology，(1986))。

可以以传统的方式使用宿主细胞中的构建物以生产由重组序列编码的基因产物，或者，本发明的多肽可以由传统的肽合成仪合成生产。

成熟蛋白可以在合适的启动子的控制下在哺乳细胞、酵母、细菌或其它细胞中表达，也可采用无细胞翻译系统使用由本发明的DNA 构建物衍生的RNA 生产这种蛋白。原核和真核宿主使用的合适的克隆和表达载体的描述见Sambrook，

et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbour, N.Y., (1989)，该书引入本文作参考。

编码本发明的多肽的DNA在高等真核生物中的转录可通过将增强子序列插入载体中而得以提高。增强子是顺式作用的DNA因子，通常约10-300bp，其作用于启动子以增加其转录。可举例的有位于复制起点晚期一侧100-270bp处的SV40增强子，巨细胞病毒早期启动子增强子，位于复制起点晚期一侧的多瘤病毒增强子，以及腺病毒增强子。

通常，重组表达载体包括复制起点和允许宿主细胞转化的选择标记，例如E.coli的氨苄青要素抗性基因和酿酒酵母的TRP1基因，以及由高表达基因衍生的指导下游结构序列转录的启动子。这些启动子可以衍生自编码糖酵解酶如3-磷酸甘油酸激酶（PGK）、α-因子、酸性磷酸酶或热休克蛋白等的操纵子。杂合的结构序列在合适的阶段与翻译起始和终止序列装配，并优选与能指导翻译的蛋白质分泌至周质空间或胞外培养基中的前导序列装配在一起。任选地，杂合序列可以编码-融合蛋白，该融合蛋白包括-N端鉴别肽，赋予所需的性质，例如表达的重组产物的稳定性或纯化的简化性。

适用细菌的表达载体的构建是将编码所需蛋白质的结构DNA序列与合适的翻译起始和终止信号一起插入带有功能的启动子的可操纵的阅读框中。载体包括一或多个表型选择标记以及一个复制起点以保证载体保持在宿主中，以及如果需要，提供在宿主中的扩增。用于转化的合适的原核宿主包括E.coli，枯草芽孢杆菌，鼠伤寒沙门氏杆菌以及属于假单胞菌属、链霉菌属、葡萄球菌属的各菌种，当然也可选择其它菌。

作为代表性但非限制性的例子，细菌用的表达载体可以包括由商购质粒如熟知的克隆载体pBR322（ATCC 37017）的遗传因子衍生的选择标记和细菌的复制起点。这些商购载体包括，例如，pKK223-3（Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden）和GEM1（Promega Biotec, Madison, WI, USA）。这些pBR322“骨架”部分与合适的启动子和待表达的结构基因结合在一起。

随着转化合适的宿主菌以及宿主菌生长至合适的细胞密度，用合适的方式（例如温度变换或化学诱导）诱导选择的启动子，并再培养细胞一段时间。

细胞典型由离心收集，由物理或化学方法破碎，保留得到的粗提物以进一步纯化。

用于表达蛋白质的微生物细胞可用任何传统的方法破碎，如冻融法、超声破碎、机械破碎或使用细胞裂解剂，这些方法是本领域熟练技术人员公知的。

也可采用各种哺乳细胞培养系统表达重组蛋白质，哺乳细胞表达系统包括Gluzman，Cell，23：175（1981）所述的猴肾成纤维细胞COS-7细胞系，以及其它能表达相容载体的细胞系如C127，3T3，CHO，Hela和BHK细胞系。哺乳类表达载体包括复制起点，合适启动子和增强子，以及任何必需的核糖体结合位点，聚腺苷酸化位点，剪接供体和受体位点，转录终止序列，5'旁侧非转录序列。可以使用由SV40剪接衍生的DNA序列和聚腺苷酸化位点以提供所需的非转录遗传因子。

本发明的多肽可以用下述方法从重组细胞培养物中回收并纯化，所述的方法包括硫酸铵或乙醇沉淀，酸抽提，阳离子成阴离子交换层析，磷酸纤维素层析，疏水作用层析，亲和层析，羟基磷灰石层析和凝集素层析。需要时可以使用蛋白重折叠步骤以完成成熟蛋白的构型。最后，采用高效液相层析进行最终的纯化步骤。

本发明的多肽可以是天然纯化的产物，或是化学合成程序的产物，或者由重组技术从原核或真核宿主（例如，由细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳细胞培养）生产。根据重组生产程序中使用的宿主，本发明的多肽可以是糖基化的，或是非糖基化的。本发明的多肽还可以包括一起始的甲硫氨酸残基。

hGHwt指导线性骨骼生长，具有催乳活性并已被证明参与代谢过程，如脂类、氮和碳水化合物代谢，并已被用于治疗老年性髋骨折、慢性肾功能不足、Turner's综合症、癌症和AIDS。

最近对野生型人生长激素的研究提示该分子的不同区域可能参与介导这些不同的活性。

hGHV-2（88）与生长激素受体结合并产生与hGHwt类似的下游反应，在这一方面hGHV-2（88）是hGHwt的拮抗剂。反之，hGHV-3（53）也与该受体结合，但不产生下游反应，以这种方式，hGHV-3（53）占据受体位点阻止hGHwt正常相关的活性，因此，hGHV-3（53）也是hGHwt的拮抗剂。

因此，通过特异性刺激产生h GHwt 并随后介导线性骨骼生长，h GHV－2 (88) 可被用来治疗垂体机能不足，因为垂体机能不足的特征是异常缓慢生长并导致发育矮小。以相同的方式，可通过刺激催乳活性用h GHV－2 (88) 增加奶牛产乳。h GHV－2 (88) 还可用来治疗肥胖，因为其可能具有脂解活性以降解脂肪细胞中的脂类。以相同的方式，可使用h GHV－2 (88) 达到h GHwt 的其它功能，即碳水化合物代谢以产生肌肉，治疗老年人髋骨折，治疗慢性肾功能不足，Turner's 综合症、癌症和AIDS。

本发明的人生长激素剪接变异体比h GHwt 少一些氨基酸，因此，人生长激素变异体可以保留h GHwt 的某些特征活性而失去其它活性。因此可使用人生长激素变异体增加h GHwt 的一个功能而不增加其它功能。所以，鉴定并生产具有h GHwt 的特异功能而不具有其它功能的另外剪接的人生长激素变异体也属于本发明范围。

可采用h GHV－3 (53) 治疗垂体机能亢进，因为h GHV－3 (53) 与h GHwt 竞争正常的h GHwt 受体位点，通过这一作用，h GHwt 的正常功能被减慢或完全阻止。因此h GHV－3 (53) 在治疗由亢进的垂体导致的巨人症和肢端巨大症是有用的。

全长h GHV－2 (88) 和h GHV－3 (53) 基因的片段可用作cDNA文库的杂交探针以分离全长h GHV－2 (88) 和h GHV－3 (53) 基因，并分离与h GHV－2 (88) 和h GHV－3 基因具有高度序列相似性或相似生物学活性的其它基因。这种类型的探针通常具有至少20个碱基，然而优选的是探针具有至少30个碱基并通常不超过50个碱基，当然探针也可具有更多个碱基。探针还可用来鉴别对应于全长转录物的cDNA克隆和基因组克隆或者含有包括调节和启动子区、外显子和内含子的完整h GHV－2 (88) 和h GHV－3 (53) 基团的克隆。一种筛选的例子包括用公知的DNA序列合成一寡核苷酸探针分离h GHV－2 (88) 和h GHV－3 (53) 基因的编码区。具有互补于本发明的基因序列的标记寡核苷酸被用于筛选人cDNA、基因组DNA或mRNA文库以确定探针所杂交的文库的成员。

本发明的多核苷酸和多肽可用作研究试剂和材料以发现对人类疾疾的诊断和治疗方法。

本发明提供了一种用于鉴别h GHV－2 (88) 和h GHV－3 (53) 的

受体的方法。编码受体的基因可用本领域熟练技术人员公知的各种方法加以鉴别，例如，配位体淘选和FACS分选（Coligan，et al.，Current Protocols，in Immun.，1（2），Chapter 5，（1991））。优选地，采用表达克隆法，其中聚腺苷酸化RNA由应答hGHV-2（88）和hGHV-3（53）配位体的细胞制备，由此RNA产生的cDNA文库分成集合体（pool）并用于转染COS细胞或不与其反应的其它细胞。将生长在玻片上的转染细胞暴露于标记的hGHV-2（88）和hGHV-3（53）。hGHV-2（88）和hGHV-3（53）可通过各种方法标记，这些方法包括碘化作用或引入位点特异性蛋白激酶的识别位点。固定和温育后，将玻片进行放射自显影分析。阳性集合体被鉴别出并用重复亚集合（sub-pooling）和再筛选方法制备亚集合体并再转染，最终产生编码推断的受体的单克隆。

作为受体鉴别的另一个途径是，标记的hGHV-2（88）和hGHV-3（53）可与细胞膜或表达受体分子的抽提制备物光亲和连接，用PAGE分离交联的物质并照X光。含有配位体-受体的标记复合体可以被切断，分离成肽片段，并进行蛋白质微量测序。由微量测序得到的氨基酸序列可以用来设计一套简并的寡核苷酸探针以筛选cDNA文库鉴定编码推定的受体的基因。

本发明的多肽可与合适的药物学载体结合使用。这类组合物包括药物有效量的多肽，和药物学可接受载体或赋形刻。这种载体包括但不限于盐水、缓冲的盐水、葡萄糖、水、甘油、乙醇、和其结合物。该配制物应适合给药的方式。

本发明还提供了一种药物包装盒或药盒，其包括一或多个填充有本发明的药物组合物成分的容器。与这些容器一起可带有一通知书，该通知书应由调节药物或生物制品的生产、使用或销售的政府机构出具，并反映出该机构同意用于人的该药物或生物制品的生产、使用或销售。另外，本发明的多肽可与其它药物化合物结合使用。

该药物组合物可通过方便的方式给药，如口服、局部用药、静脉、腹内、肌内、皮下、鼻内或皮内途径给药。该药物组合物的给药量应足以治疗和/或预防具体的适应症。通常，给药量至少约10μg/kg体重，在大多数情况下给药量不超过约8mg/kg体重/天。在大多数情况下，考虑到给药方式、症状等，剂量为每天约10μg/kg-1mg/kg体重。

根据本发明，也可通过在体内表达hGHV-2（88）和hGHV-3（5

3）多肽而使用这些多肽，这种用法通常称为“基因疗法”。

因此，例如，可用编码多肽的多核苷酸（DNA或RNA）对患者的细胞进行工程化，随后将工程化的细胞输回患者以对其用多肽进行治疗。这些方法是本领域公知的并由本文的教导更显而易见。例如，可使用含编码本发明的多肽的RNA的反转录病毒质粒载体对细胞进行工程化。

类似地，可利用本领域公知的程序在体内对细胞进行工程化以用于在体内表达多肽。例如，用含编码本发明的多肽的RNA的反转录病毒质粒载体转导包装细胞，以便包装细胞能生产含所需基因的侵染性病毒颗粒，可将这些生产者细胞给予患者以用于在体内对细胞进行工程化并在体内表达多肽。给予本发明的多肽的这些方法根据本发明的教导对本领域熟练技术人员是显而易见的。

本发明还涉及hGHV-2（88）和hGHV-3（53）基因作为诊断的使用。对这些基因的突变型的检测使得能够诊断由hGHV-2（88）和hGHV-3（53）的表达不足而引起的疾病或疾病易感性。

可通过各种技术在DNA水平检测携带人hGHV-2（88）和hGHV-3（53）突变的个体。诊断用核酸可以得自患者的细胞如得自血液、尿液、唾液、组织生物活检和尸检材料。基因组DNA可直接用于诊断或者可在分析前用PCR（Saiki et al., Nature, 324: 163-166 (1986)）进行酶扩增，RNA或cDNA也可用于相同目的。例如，可使用互补于编码hGHV-2（88）和hGHV-3（53）的核酸的PCR引物鉴别并分析突变。缺失和插入的检测可通过与正常基因型相比扩增产物大小的改变而做出，点突变可通过将扩增的DNA与放射标记的RNA或放射标记的反义DNA序列杂交而鉴别。可通过RNase A消化或解链温度的差异将完全正确配对的序列与错配的双螺旋区分开。

可通过直接DNA测序方法揭示对比基因和有突变的基因之间的序列差异。另外，可用克隆的DNA区段作为探针检测特异性的DNA区段，当与PCR结合时，这一方法的灵敏性可大大提高。例如，测序引物可与双链PCR产物或改进PCR产生的单链模板分子一起使用。序列的确定是通过传统程序用放射标记的核苷酸进行或用荧光标记通过自动测序程序进行。

基于DNA序列差异的遗传测试可通过在用变性剂或不用变性剂的凝胶中检测DNA片段的电泳迁移率的改变而完成。小序列缺失和插入可用高分辨凝胶电泳观

察到。不同序列的ＤＮＡ片段可在变性甲酰胺梯度凝胶中区分开来，其中不同ＤＮＡ片段根据其特定的解链温度或部分解链温度而迁移停留在凝胶的不同位置（例如，见Ｍｙｅｒｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｓｃｉｅｎｃｅ，　２３０：１２４２　（１９８５））。

在不同位置的序列变化也可通过核酸酶保护检测，如ＲＮａｓｅ　和Ｓ１保护或化学裂解方法而揭示（例如，Ｃｏｔｔｏｎ　ｅｔ　ａｌ．，ＰＮＡＳ，ＵＳＡ，８５：４３９７－４４０１　（１９８５））。

因此，特定ＤＮＡ序列的检测可通过如杂交、ＲＮａｓｅ保护、化学裂解、直接ＤＮＡ测序或使用限制性内切酶（如限制性片段长度多态性（ＲＦＬＰ））和基因组ＤＮＡ的ｓｏｕｔｈｅｒｎ印迹分析等方法进行。

除更传统的凝胶电泳和ＤＮＡ测序之外，还可用原位分析检测突变。

本发明还涉及用于检测各种组织中的ｈＧＨＶ－２　（８８）和ｈＧＨＶ－３　（５３）蛋白的变化水平的诊断分析，因为与正常对照组织样品相比这些蛋白的过量表达可以检测这些蛋白质的存在。用于检测宿主样品中的ｈＧＨＶ－２　（８８）和ｈＧＨＶ－３　（５３）蛋白水平的方法是本领域熟练技术人员公知的，包括放射免疫分析，竞争结合分析、蛋白质印迹分析及优选的ＥＬＩＳＡ分析。ＥＬＩＳＡ分析最初包括制备特异于ｈＧＨＶ－２　（８８）和ｈＧＨＶ－３　（５３）抗原的抗体，优选为单克隆抗体，另外制备抗该单克隆抗体的报道者抗体，报道者抗体上附着一可检测试剂如放射活性、荧光物或本实施例中为辣根过氧化物酶。从宿主中取样并在结合样品中的蛋白质的固体支持物如聚苯乙烯皿上温育样品，随后与非特异性蛋白质如ＢＳＡ温育以覆盖皿上的任何自由蛋白质结合位点，接着将单克隆抗体在皿中温育，在这一过程中单克隆抗体吸附于附着在聚苯乙烯皿上的任何ｈＧＨＶ－２　（８８）和ｈＧＨＶ－３　（５３）蛋白质上。用缓冲液洗去所有未结合的单克隆抗体，然后将连接有辣根过氧化物酶的报道者抗体放于皿中，结果使报道者抗体与任何结合于ｈＨＧＶ－２　（８８）和ｈＧＨＶ－３　（５３）的单克隆抗体结合，随后洗去未吸附的报道者抗体。接着向皿中加入过氧化物酶底物，当与标准曲线相比时，在给定时间内的显色量就代表存在于给定体积的患者样品中的ｈＧＨＶ－２　（８８）和ｈＧＨＶ－３　（５３）蛋白量。

竞争分析也可被采用，其中特异于ｈＧＨＶ－２　（８８）和ｈＧＨＶ－３　（５３）的抗体，吸附于固相支持物上，将标记的ｈＧＨＶ－２　（８８）和ｈＧＨＶ－３　（５３）以及宿主样品通过该固相支持物，所检测到的吸附于固相支持物上的标

记量可以用来计算样品中的h G H V －2 （8 8 ）和h G H V －3 （5 3 ）的量。

本发明的序列还可用于染色体鉴定，所述的序列特异地定位于人染色体的特定位置并可与之杂交。另外，目前需要鉴定染色体上的特定位点。现在仅有少数基于实际序列资料（重复多样性）的染色体标记试剂可用于标记染色体位置。根据本发明的染色体的D N A 作图是将这些序列与基因相关疾病联系起来的重要的第一步。

简而言之，可以通过由c D N A 制备P C R 引物（优选1 5 －2 5 b p ）而将序列定位于染色体。使用对基因的3 ' 非翻译区的计算机分析以快速选择跨度不超过基因组D N A 一个外显子的引物，从而不使扩增过程复杂化，这些引物随后用于P C R 筛选含人染色体的体细胞杂合子。只有那些含相应于引物的人基因的杂合子才产生扩增片段。

体细胞杂合子的P C R 作图是将特定的D N A 定位于特定的染色体的快速方法。使用本发明相同的寡核苷酸引物，可以通过类似的方式将来源于特定染色体的一系列片段或大基因组克隆的聚集体进行亚定位。可以使用的染色体作图的其它作图策略包括原位杂交、将标记的流式分选染色体进行预筛选以及通过与结构染色体特异性c D N A 文库进行杂交而预选。

c D N A 克隆与中期染色体涂片的荧光原位杂交（F I S H）可以用来进行一步法染色体精确定位。这一技术可以使用短至5 0 0 或6 0 0 个碱基的c D N A；然而，大于2 0 0 0 b p 的克隆更易于结合于独特的染色体位置并具有足够的信号强度以便于检测。F I S H 需要使用衍生表达序列标记（E S T）的克隆，越长越好，例如，2 0 0 0 b p 是好的，4 0 0 0 b p 更好，而超过4 0 0 0 b p 可能不是得到好结果所必需的，这一技术的综述见V e r m a e t a l . , H u m a n C h r o m o s o m e s : a M a n u a l o f B a s i c T e c h n i q u e s , P e r g a m o n P r e s s , N e w Y o r k (1 9 8 8) 。

一旦某一序列已被定位于染色体的精确位置，可以将该序列在染色体上的物理位置与遗传图谱资料相比较，这类资料例如见于V . M c K u s i c k , M e n d e l i a n I n h e r i t a n c e i n M a n （可在线从J o h n s H o p k i n s U n i v e r s i t y W e l c h M e d i c a l L i b r a r y 获得）。随后通过连锁分析（物理相邻基因的共遗传性）鉴定基因与已被定位于相同染色体区的疾病间的关系。

随后，需要确定感染个体和未感染个体间c DNA或基因组序列的差异，如果在某些或全部感染个体中观察到某一突变而未在任何正常个体中观察到，则该突变很可能是该疾病的病因。

使用物理作图和遗传作图技术目前的分辨率，精确定位于疾病相关染色体区的c DNA可以是50-500个潜在致病基因中的一个。（这假定1兆碱基大范围作图分辨率和每20kb为1个基因）。

所述的多肽，其片段或其它衍生物、或其类似物，或表达其的细胞可被用作产生其抗体的免疫原，这些抗体可以是多克隆或单克隆抗体。本发明还包括嵌合、单链以及人源化抗体，以及Fab片段，或者Fab表达文库的产物，本领域公知的各种技术可用来生产这些抗体和片段。

对应于本发明序列的多肽的抗体可通过将该多肽直接注射到动物体内或通过将该多肽给予动物，优选非人，而得到，如此得到的抗体随后与多肽结合。以这种方式，即使仅编码多肽片段的序列也可用来产生与天然完全多肽结合的抗体，这些抗体随后可用于从表达该多肽的组织中分离该多肽。

可使用任何从连续细胞系培养生产抗体的技术制备单克隆抗体，例如杂交瘤技术（Kohler and Milstein，1975，Nature，256：495-497），三瘤（trioma）技术，人B细胞杂交瘤技术（Kozbor et al.，1983，Immunology Today 4：72），以及EBV-杂交瘤技术以生产人单克隆抗体（Cole，et al.，1985，in Monoclonal antibodies and Cancer Therapy，Alan R. Liss，Inc.，pp.77-96）。

用于生产单链抗体的技术（USP4，946，778）可适用于生产本发明的免疫原性多肽产物的单链抗体，另外，也可使用转基因小鼠表达本发明的免疫原性多肽产物的人源化抗体。

本发明将参照以下实施例加以描述，然而应理解的是本发明不限于这些实施例。除另有说明，所有的份或量均指重量份或重量。

为增加对下述实施例的理解，以下描述一些目前经常使用的方法和/或术语。

“质粒”用小写字母p 打头和/ 或后跟大写字母和/ 或数字。本文的起始质粒可以是商购的，可不加限制地公用的，或可根据公开的程序从能得到的质粒构建的。另外，与所描述的质粒等同的质粒是本领域公知的并对于本领域普通技术人员是显而易见的。

DNA的“消化”是指用仅作用于DNA的特定序列的限制性酶对DNA进行的催化裂解。本文所用的各种限制性酶是可商购的，并且其反应条件，辅因子和其它要求是本领域普通技术人员公知的。为分析目的，典型地1 μg 质粒或DNA片段使用溶于20 μl 缓冲液中的约2 单位酶，为分离DNA片段用于构建质粒的目的，典型地，在相对较大体积中用20 -250 单位酶消化5 -50 μg DNA。特定限制性酶的合适的缓冲液和底物量由厂商限定。通常采用37 ℃约1 小时的温育时间，但可根据厂商指导而变化。消化后，反应物直接进行聚丙烯酰胺凝胶电泳以分离所需片段。

使用Goeddel，D. et al.，Nucleic Acids Res.， 8：4057 (1980) 所述的8 %聚丙烯酰胺凝胶分离裂解片段。

“寡核苷酸”是指可化学合成的单链聚脱氧核苷酸或两条互补的聚脱氧核苷酸链。这些合成的寡核苷酸没有5 ’ 磷酸，因此如果不在激酶存在下用ATP 加上磷酸，这些寡核苷酸不会与另一个寡核苷酸连接。合成的寡核苷酸将与未脱磷酸的片段连接。

“连接”是指在两个双链核酸片段之间形成磷酸二酯键的方法 (Maniatis， T.， et al. 见前述) 。除非另有建议，连接可以使用公知的缓冲液和条件，以每0.5 μg 约等摩尔量的待连接DNA片段使用10 单位T4 DNA连接酶 (“连接酶”) 而完成。

除非另有说明，转化方法使用Graham，F. and Van der Eb，A.，Virology， 52：456-457 (1973) 所述的方法。

实施例1 hGHV-2 (88) 和hGHV-3 (53) 的细菌表达和纯化

编码hGHV-2 (88) 和hGHV-3 (53) 的DNA序列 (分别为ATCC No.75600 和75601) 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以合成插入片段。5 ’ 寡核苷酸引物序列为5 ’ AGAGGATCCGCCATGGCTACAGGCTCCCGG 3 ’ (SEQ

ＩＤ　Ｎｏ．７），其含有ＢａｍＨＩ 限制性酶，接之是由起始密码子开始的ｈＧＨＶ－２　（８８）和ｈＧＨＶ－３　（５３）编码序列的２１个核苷酸；３’序列含有与ｃＤＮＡ克隆载体的Ｔ７启动子/序列互补的序列、一个翻译终止子和ｈＧＨＶ－２　（８８）和ｈＧＨＶ－３　（５３）编码序列。限制性酶位点对应于细菌表达载体ｐＱＥ－９　（Ｑｉａｇｅｎ　Ｉｎｃ．，Ｃｈａｔｓｗｏｒｔｈ，ＣＡ）上的限制性酶位点，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）以及限制性酶克隆位点。用ＢａｍＨＩ 和Ｓａｌ Ｉ 消化ｐＱＥ－９载体，随后将插入片段连接到ｐＱＥ－９载体并保持阅读框在细菌ＲＢＳ起始，图５示出了这一安排。随后用连接混合物转化购自Ｑｉａｇｅｎ，商标为ｍ１５／ｒｅｐ４的Ｅ．ｃｏｌｉ 菌株，Ｍ１５／ｒｅｐ４含有多拷贝的质粒ｐＲＥＰ４，其表达ｌａｃＩ 阻抑物并携带卡那霉素抗性（Ｋａｎ^{r}）。在含Ａｍｐ 和Ｋａｎ 的ＬＢ培养皿上筛选转化子，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）含所需构建物的克隆。过夜（Ｏ／Ｎ）培养物以１：１００－１：２５０稀释率接种到大体积培养基中，培养细胞至６００光密度（ＯＤ$_{600}$）为０．４－０．６，随后加入ＩＰＴＧ（“异丙基－Ｂ－Ｄ－硫代半乳糖吡喃糖苷”）至终浓度为１ｍＭ。通过使ｌａｃＩ 阻抑物失活，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（６０００ｘｇ，２０分钟）收集细胞，将细胞沉淀溶于离液剂６Ｍ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ｈＧＨ变异体（Ｈｏｃｈｕｌｉ，Ｅ．ｅｔ　ａｌ．，Ｇｅｎｅｔｉｃ　Ｅｎｇｉｎｅｅｒｉｎｇ，Ｐｒｉｎｃｉｐｌｅ　＆　Ｍｅｔｈｏｄｓ，１２：８７－９８．（１９９０））。用６Ｍ盐酸胍（ＰＨ５．０）从柱中洗脱ｈＧＨＶ－２　（８８）和ｈＨＧＶ－３　（５３）　（９５％纯）。可用几种方式从盐酸胍中变性沉淀蛋白（Ｊａｅｎｉｃｋｅ，Ｒ．ａｎｄ　Ｒｕｄｏｌｐｈ，Ｒ．，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ－Ａ　Ｐｒａｃｔｉｃａｌ　Ａｐｐｒｏａｃｈ　ＩＲＬ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ　（１９９０））。首先，使用透析步骤除去盐酸胍，或者从Ｎｉ－螯合柱中分离出的纯化蛋白质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。在结合到该柱时使蛋白质变性，随后用盐酸胍ＰＨ５．０洗脱。最后，将可溶的蛋白质对含１４０ｍＭ　ＮａＣｌ／２０ｍＭ　ＮａＰＯ$_4$和１０％（ｗ／ｖ）　Ｇｌｙｃｏｎｏｌ　的贮存液透析。

根据上文教导，本发明可有各种改进和变动，因此，在所附权利要求范围内，本发明可以与具体所述不同的方式实施。

序列表

(1) 一般信息

(i) 申请人: ROSEN, ET AL.

(ii) 发明名称: 人生长激素

(iii) 序列数: 7

(iv) 联系地址:

(A) 收信人: CARELLA, BYRNE, BAIN, GILFILLAN, CECCHI, STEWART & OLSTEIN

(B) 街道: 6 BECKER FARM ROAD

(C) 城市: ROSELAND

(D) 州: 新泽西州

(E) 国家: USA

(F) 邮编: 07068

(v) 计算机可读形式:

(A) 媒介类型: 3.5 寸软盘

(B) 计算机: IBM PS/2

(C) 操作系统: MS-DOS

(D) 软件: WORD PERFECT 5.1

(vi) 本申请资料:

(A) 申请号:

(B) 申请日:

(C) 分类:

(vii) 在先申请资料:

(A) 申请号: 08/187,756

(B) 申请日: 1994年1月27日

(viii) 律师/代理人信息:

(A) 姓名: FERRARO, GREGORY D.

(B) 注册号: 36,134

(C) 案号/文档号: 325800-55

(ix) 通讯信息:

(A) 电话: 201-994-1700

(B) 传真: 201-994-1744

(2) SEQ ID NO: 1 的信息:

(i) 序列特征

(A) 长度: 654 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链性: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 1:

```
ATGGCTGCAG GCTCCCGGAC GTCCCTGCTC CTGGCTTTTG GCCTGCTCTG CCTGTCCTGG   60
CTTCAAGAGG GCAGTGCCTT CCCAACCATT CCCTTATCCA GGCTTTTTGA CAACGCTATG  120
CTCCGCGCCC GTCGCCTGTA CCAGCTGGCA TATGACACCT ATCAGGAGTT TGAAGAAGCC  180
TATATCCTGA AGGAGCAGAA GTATTCATTC CTGCAGAACC CCCAGACCTC CCTCTGCTTC  240
TCAGAGTCTA TTCCAACACC TTCCAACAGG GTGAAAACGC AGCAGAAATC TAACCTAGAG  300
CTGCTCCGCA TCTCCCTGCT GCTCACTCAG TCATGGCTGG AGCCCGTGCA GCTCCTCAGG  360
AGCGTCTTCG CCAACAGCCT GGTGTATGGC GCCTCGGAGA GCAACGTCTA TCGCCACCTG  420
AAGGACCTAG ACGAAGGCAT CCAAACGCTG ATGTGGAGGC TGGAAGATGG CAGCCCCCGG  480
ACTGGGCAGA TCTTCAATCA GTCCTACAGC AAGTTTGACA CAAAATCGCA CAACGATGAC  540
GCACTGCTCA AGAACTACGG GCTGCTCTAC TGCTTCAGGA AGGACATGGA CAAGGTCGAG  600
ACATTCCTGC GCATCGTGCA GTGCCGCTCT GTGGAGGGCA GCTGTGGCTT CTAG         654
```

(2) SEQ ID NO: 2 的信息:

(i) 序列特征

(A) 长度: 597 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链性: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 2:

```
ATGGCTGCAG GCTCCCGGAC GTCCCTGTCT CTGGCTTTTG GCTCGCTCTG CCTGTCCTGG   60
CTTCAAGAGG GCAGTGCCTT CCCAACCATT CCCTTATCCA GGCTTTTTGA CAACGCTATG  120
CTCCGCGCCC GTCGCCTGTA CCAGCTGGCA TATGACACCT ATCAGGAGTT TTCCCTCTGC  180
TTCTCAGAGT CTATTCCAAC ACCTTCCAAC AGGGTGAAAA CGCAGCAGAA ATCTAACCTA  240
GAGCTGCTCC GCATCTCCCT GCTGCTCACT CAGTCATGGC TGGAGCCCGT GCAGCTCCTC  300
AGGAGCGTCT TCGCCAACAG CCTGGTGTAT GGCGCCTCGG AGAGCAACGT CTATCGCCAC  360
CTGAAGGACC TAGAGGAAGG CATCCAAAGC CTGATGTGGA GGCTGGAAGA TGGCAGCCCC  420
CGGACTGGGC AGATCTTCAA TCAGTCCTAC AGCAAGTTTG ACACAAAATC GCACAACGAT  480
GACGCACTGC TCAAGAACTA CGGGCTGCTC TACTGCTTCA GGAAGGACAT GGACAAGGTC  540
GAGACATTCC TGCGCATCGT GCAGTGCCGC TCTGTCGAGG GCAGCTGTGG CTTCTAG     597
```

(2) SEQ ID NO: 3 的信息:

(i) 序列特征

(A) 长度: 534 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链性: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子型: cDNA

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3:

```
ATGGCTGCAG GCTCCCGGAC GTCCCTGCTC CTGGCTTTTG GCCTGCTCTG CCTGTCCTGG   60
CTTCAAGAGG GCAGTGCCTT CCCAACCATT CCCTTATCCA GGCTTTTTGA CAACGCTATG  120
CTCCGCGCCC GTCGCCTGTA CCAGCTGGCA TATGACACCT ATCAGGAGTT TAACCTAGAG  180
CTGCTCCGCA TCTCCCTGCT GCTCACTCAG TCATGGCTGG AGCCCGTGCA GCTCCTCAGG  240
AGCGTCTTCG CCAACAGCCT GGTGTATGGC GCCTCGGACA GCAACGTCTA TCGCCACCTG  300
AAGGACCTAG AGGAAGGCAT CCAAACGCTG ATGTGGAGGC TGGAAGATGG CAGCCCCCGG  360
ACTGGGCAGA TCTTCAATCA GTCCTACAGC AAGTTTGACA CAAAATCGCA CAACGATGAC  420
GCACTGCTCA AGAACTACGG GCTGCTCTAC TGCTTCAGGA AGGACATGGA CAAGGTCGAG  480
ACATTCCTGC GCATCGTGCA GTGCCGCTCT GTGGAGGGCA GCTGTGGCTT CTAG        534
```

(2) SEQ ID NO: 4 的信息:

(i) 序列特征

(A) 长度: 217 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链性:

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 4:

```
Met Ala Ala Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu
   -25                 -20                 -15
Leu Cys Leu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile
  -10                  -5                   1
Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Ser Leu Arg Ala His Arg
5                     10                  15
Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Glu Glu Ala
20                    25                  30
Tyr Ile Pro Lys Glu Gln Lys Tyr Ser Phe Leu Gln Asn Pro Gln
35                    40                  45
Thr Ser Leu Cys Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg
50                    55                  60
Glu Glu Thr Gln Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser
65                    70                  75
Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg
80                    85                  90
Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn
95                   100                 105
Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu
110                  115                 120
Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe
125                  130                 135
Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp
140                  145                 150
Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp
155                  160                 165
Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser
170                  175                 180
Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
185                  190
```

(2) SEQ ID NO: 5 的信息:

(i) 序列特征

(A) 长度: 198 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链性:

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 5:

```
Met Ala Ala Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu
   -25                 -20                 -15
Leu Cys Leu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile
   -10                 -5                  1
Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Ser Leu Arg Ala His Arg
 5                   10                  15
Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Ser Leu Cys
20                   25                  30
Phe Ser Glu Ser Ile Pro Thr Pro Ser Asn Arg Glu Glu Thr Gln
35                   40                  45
Gln Lys Ser Asn Leu Glu Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile
50                   55                  60
Gln Ser Trp Leu Glu Pro Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala
65                   70                  75
Asn Ser Leu Val Tyr Gly Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu
80                   85                  90
Leu Lys Asp Leu Glu Glu Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu
95                  100                 105
Glu Asp Gly Ser Pro Arg Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr
110                 115                 120
Ser Lys Phe Asp Thr Asn Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys
125                 130                 135
Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val
140                 145                 150
Glu Thr Phe Leu Arg Ile Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser
155                 160                 165
Cys Gly Phe
170
```

(2) SEQ ID NO: 6 的信息:

(i) 序列特征

(A) 长度: 177 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(C) 链性:

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子型: 蛋白质

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 6:

```
Met Ala Ala Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu
   -25                 -20                 -15
Leu Cys Leu Ser Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala Phe Pro Thr Ile
  -10                  -5                   1
Pro Leu Ser Arg Leu Phe Asp Asn Ala Ser Leu Arg Ala His Arg
5                      10                  15
Leu His Gln Leu Ala Phe Asp Thr Tyr Gln Glu Phe Asn Leu Glu
20                     25                  30
Leu Leu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Trp Leu Glu Pro
35                     40                  45
Val Gln Phe Leu Arg Ser Val Phe Ala Asn Ser Leu Val Tyr Gly
50                     55                  60
Ala Ser Asp Ser Asn Val Tyr Asp Leu Leu Lys Asp Leu Glu Glu
65                     70                  75
Gly Ile Gln Thr Leu Met Gly Arg Leu Glu Asp Gly Ser Pro Arg
80                     85                  90
Thr Gly Gln Ile Phe Lys Gln Thr Tyr Ser Lys Phe Asp Thr Asn
95                     100                 105
Ser His Asn Asp Asp Ala Leu Leu Lys Asn Tyr Gly Leu Leu Tyr
110                    115                 120
Cys Phe Arg Lys Asp Met Asp Lys Val Glu Thr Phe Leu Arg Ile
125                    130                 135
Val Gln Cys Arg Ser Val Glu Gly Ser Cys Gly Phe
140                    145                 151
```

(2) SEQ ID NO: 7 的信息:

(i) 序列特征

(A) 长度: 30 碱基对

(B) 类型: 核酸

(C) 链性: 单链

(D) 拓扑: 线性

(ii) 分子型: 寡核苷酸

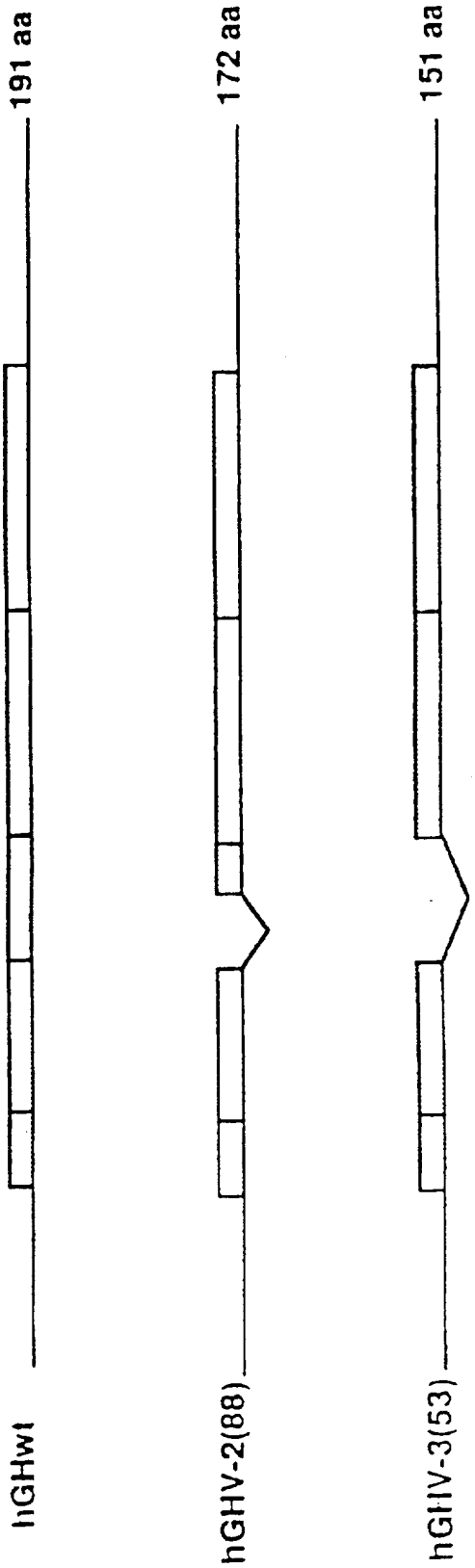
(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 7:

AGAGGATCCG CCATGGCTAC AGGCTCCCGG 30

说 明 书 附 图

图 1

hGH剪接变异体示意图



人生长激素剪接变异体

hGHwt

-26

```
 M   A   A   G   S   R   T   S   L   L   L   A   F
ATG GCT GCA GGC TCC CGG ACG TCC CTG CTC CTG GCT TTT-->
  1
 F   P   T   I   P   L   S   R   L   F   D   N   A
TTC CCA ACC ATT CCC TTA TCC AGG CTT TTT GAC AAC GCT->

                    32
 T   Y   Q   E   F   E   E   A   Y   I   P   K   E-->
ACC TAT CAG GAG TTT GAA GAA GCC TAT ATC CTG AAG GAG
 C   F   S   E   S   I   P   T   P   S   N   R   E
TGC TTC TCA GAG TCT ATT CCA ACA CCT TCC AAC AGG GTG->
 S   L   L   L   I   Q   S   W   L   E   P   V   Q
TCC CTG CTG CTC ACT CAG TCA TGG CTG GAG CCC GTG CAG->
 A   S   D   S   N   V   Y   D   L   L   K   D   L
GCC TCG GAC AGC AAC GTC TAT CGC CAC CTG AAG GAC CTA->
 G   S   P   R   T   G   Q   I   F   K   Q   T   Y
GGC AGC CCC CGG ACT GGG CAG ATC TTC AAT CAG TCC TAC->
 L   K   N   Y   G   L   L   Y   C   F   R   K   D
CTC AAG AAC TAC GGG CTG CTC TAC TGC TTC AGG AAG GAC->

                                    191
 R   S   V   E   G   S   C   G   F
CGC TCT GTG GAG GGC AGC TGT GGC TTC TAG
```

图 2Aa

与

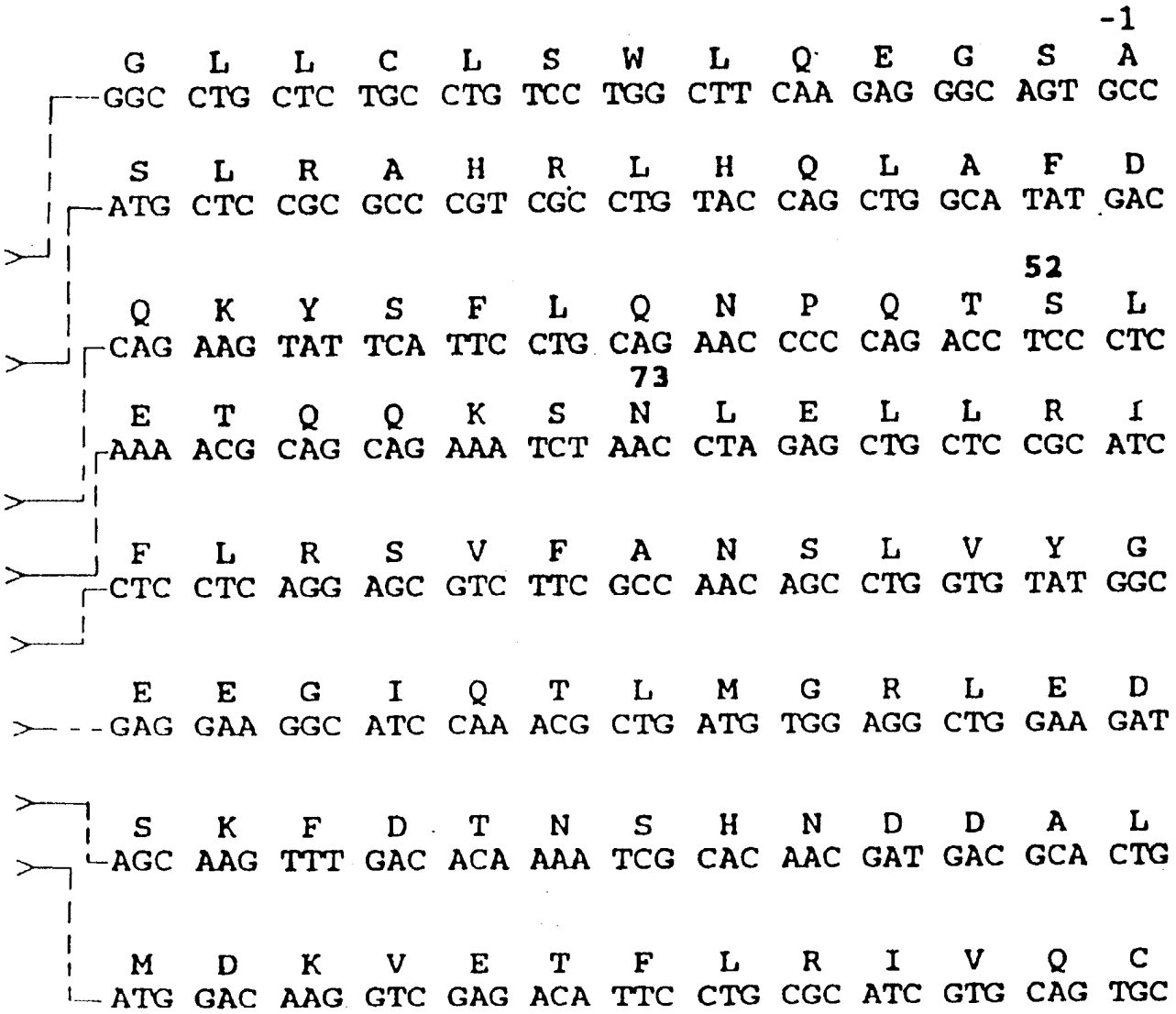
图 2Ab

相

对

应

图 2Ab



与图 2Aa 相对应

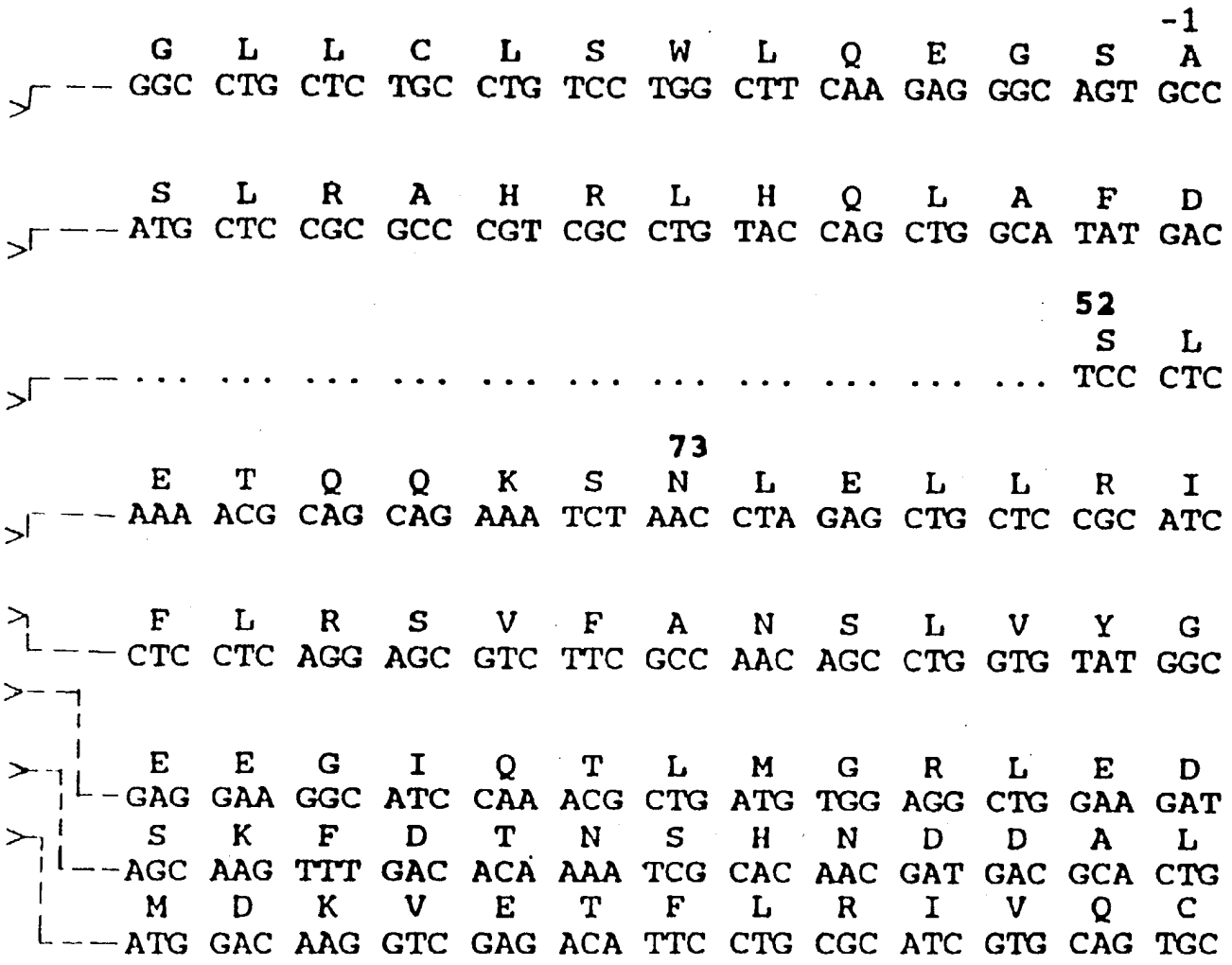
hGHV-2(88)

```
-26
 M   A   A   G   S   R   T   S   L   L   L   A   F
ATG GCT GCA GGC TCC CGG ACG TCC CTG CTC CTG GCT TTT→

  1
 F   P   T   I   P   L   S   R   L   F   D   N   A
TTC CCA ACC ATT CCC TTA TCC AGG CTT TTT GAC AAC GCT→

                    32
 T   Y   Q   E   F
ACC TAT CAG GAG TTT ... ... ... ... ... ... ... ...→

 C   F   S   E   S   I   P   T   P   S   N   R   E
TGC TTC TCA GAG TCT ATT CCA ACA CCT TCC AAC AGG GTG→
 S   L   L   L   I   Q   S   W   L   E   P   V   Q
TCC CTG CTG CTC ACT CAG TCA TGG CTG GAG CCC GTG CAG→
 A   S   D   S   N   V   Y   D   L   L   K   D   L
GCC TCG GAC AGC AAC GTC TAT CGC CAC CTG AAG GAC CTA→
 G   S   P   R   T   G   Q   I   F   K   Q   T   Y
GGC AGC CCC CGG ACT GGG CAG ATC TTC AAT CAG TCC TAC→
 L   K   N   Y   G   L   L   Y   C   F   R   K   D
CTC AAG AAC TAC GGG CTG CTC TAC TGC TTC AGG AAG GAC→
                                172
 R   S   V   E   G   S   C   G   F
CGC TCT GTG GAG GGC AGC TGT GGC TTC TAG
```

图 2Ba

与图 2Bb 相对应

图 2Bb



与图 2Ba 相对应

hGHV-3(53)

```
-26
 M   A   A   G   S   R   T   S   L   L   L   A   F
ATG GCT GCA GGC TCC CGG ACG TCC CTG CTC CTG GCT TTT→

  1
 F   P   T   I   P   L   S   R   L   F   D   N   A
TTC CCA ACC ATT CCC TTA TCC AGG CTT TTT GAC AAC GCT→

                    32
 T   Y   Q   E   F
ACC TAT CAG GAG TTT ... ... ... ... ... ... ... ...→

... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ... ...→
 S   L   L   L   I   Q   S   W   L   E   P   V   Q
TCC CTG CTG CTC ACT CAG TCA TGG CTG GAG CCC GTG CAG→
 A   S   D   S   N   V   Y   D   L   L   K   D   L
GCC TCG GAC AGC AAC GTC TAT CGC CAC CTG AAG GAC CTA→
 G   S   P   R   T   G   Q   I   F   K   Q   T   Y
GGC AGC CCC CGG ACT GGG CAG ATC TTC AAT CAG TCC TAC→
 L   K   N   Y   G   L   L   Y   C   F   R   K   D
CTC AAG AAC TAC GGG CTG CTC TAC TGC TTC AGG AAG GAC→

                            151
 R   S   V   E   G   S   C   G   F
CGC TCT GTG GAG GGC AGC TGT GGC TTC TAG
```

图 2Ca

与

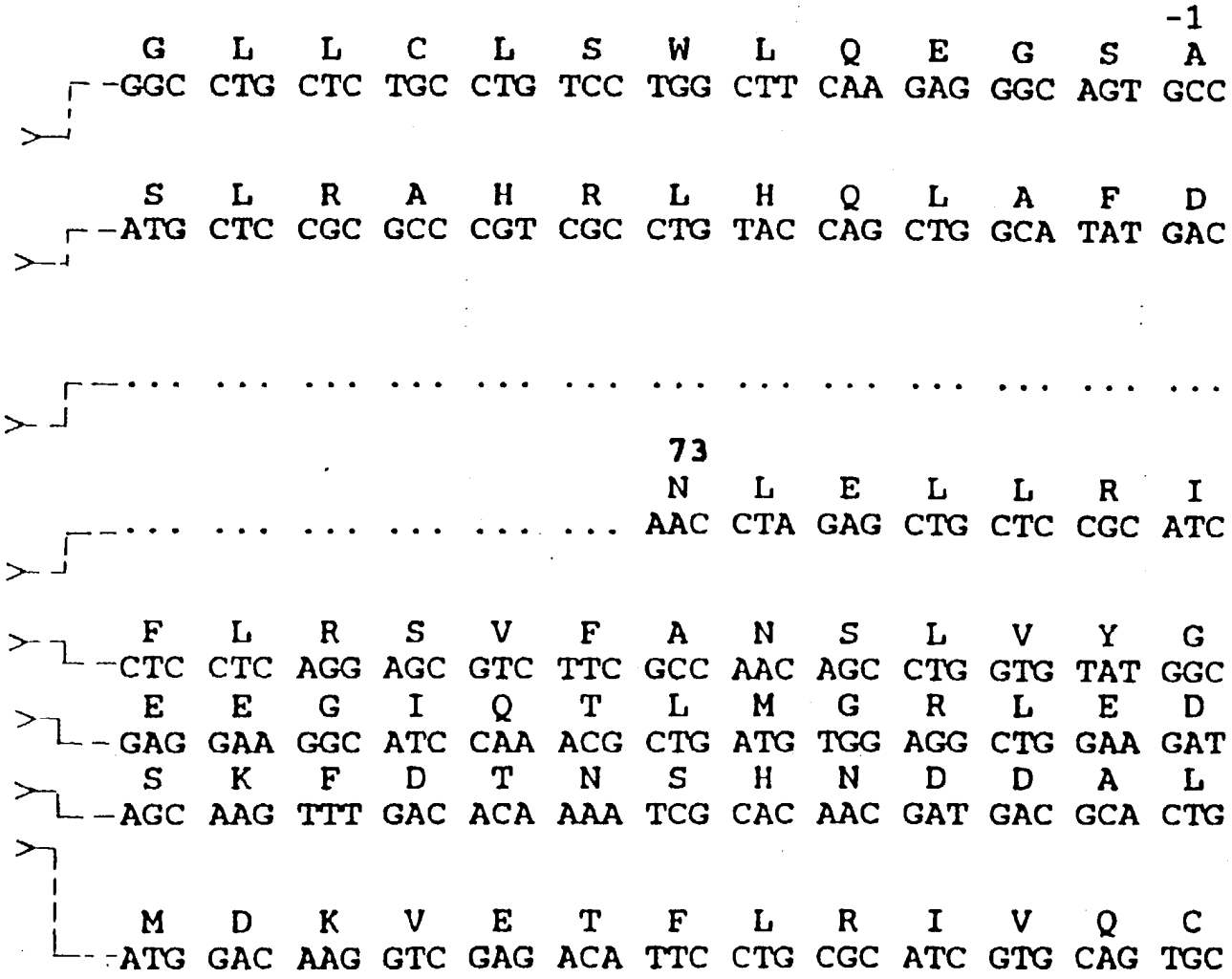
图 2Cb

相

对

应

图 2Cb



与图 2Ca 相对应

图 3

hGH变异体的细菌表达和纯化

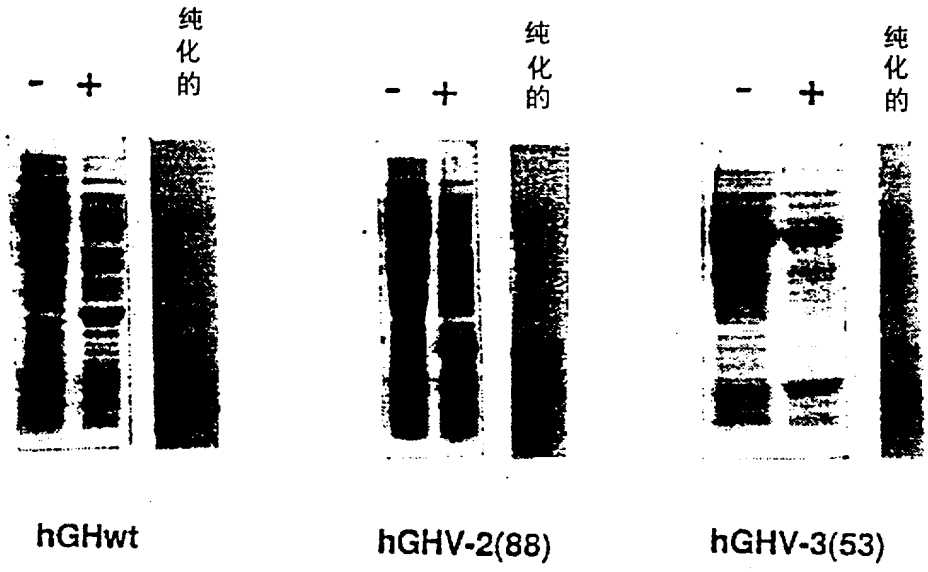


图 4

