

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/54

C12N 15/67 C12N 5/10

C12N 5/06 C12N 9/12

C07K 14/52 C07K 14/54

C07K 14/525 C12P 21/02



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00809023.8

[43] 公开日 2003年2月26日

[11] 公开号 CN 1399681A

[22] 申请日 2000.6.14 [21] 申请号 00809023.8

[30] 优先权

[32] 1999.6.15 [33] US [31] 60/139,313

[86] 国际申请 PCT/US00/40199 2000.6.14

[87] 国际公布 WO00/77236 英 2000.12.21

[85] 进入国家阶段日期 2001.12.17

[71] 申请人 基因特罗生物治疗公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 A·S·劳 L·布朗宁

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程伟 彭益群

权利要求书2页 说明书22页 附图3页

[54] 发明名称 在细胞培养物中增强细胞因子产生的方法

[57] 摘要

本发明涉及在哺乳动物细胞培养物中，通过修饰细胞中的细胞因子调节因子的水平，从而导致细胞因子的产生水平被增强的方法。本发明进一步地涉及这样的细胞系，它们表现出增强的细胞因子调节因子表达和增强的细胞因子表达。

ISSN 1008-4274

1. 一种在哺乳动物细胞培养物中产生细胞因子的方法，它包括：
 - (a) 培养具有产生细胞因子能力的哺乳动物细胞系；
 - (b) 以在细胞系中有效地导致细胞因子调节因子过表达的方式，修饰所说的培养的哺乳动物细胞系，其中在所说的细胞系中获得了高于正常水平的具有调节细胞因子表达能力的因子；
 - (b) 处理所说的培养的、过表达细胞因子调节因子的哺乳动物细胞系，从而使细胞因子有效地产生；和
 - (c) 收集由培养的、经处理的细胞系产生的所说的细胞因子。
2. 权利要求 1 的方法，其中所说的细胞因子调节因子是 PKR。
3. 权利要求 1 的方法，其中所说的修饰是指在导致细胞因子调节因子在所说的被转染细胞中过表达的条件下，用含有编码细胞因子调节因子的与启动子可操作地连接的 DNA 的表达载体转染所说的培养的哺乳动物细胞系。
4. 权利要求 1 的方法，其中所说的处理包括引发步骤。
5. 权利要求 4 的方法，其中所说的处理进一步地包括诱导步骤。
6. 权利要求 4 的方法，其中所说的引发是通过用佛波酯处理完成的。
7. 权利要求 5 的方法，其中所说的诱导是通过用 poly r(I):poly r(C)处理完成的。
8. 权利要求 2 的方法，其中所说的细胞因子选自白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 8 (IL-8) 和肿瘤坏死因子 β (TNF- β)。
9. 权利要求 1 的方法，其中所说的启动子是可诱导型启动子。

在细胞培养物中增强细胞因子产生的方法

发明领域

本发明涉及在细胞培养物中，通过 PKR 的过表达，用于增强细胞因子产生的方法。

参考文献

- Abbas, AK, 等人, 编写, 细胞和分子免疫学 (Cellular and Molecular Immunology), 第三版, WB Saunders Co., 256-257,1997.
- Balkwill FR 和 Burke F, 今天的免疫学 (Immunology Today), 10 (9): 299,1989.
- Barber, G. N.等人, 美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA) 91,4278-4282,1994.
- Buffet-Janvresse, 等人, 干扰素研究杂志 (J. Interferon Res.), 6: 85-96 1986.
- Chong 等人, EMBO J 11 (4): 1553-62,1992.
- Clark S 和 Kamen R, 科学 (Science), 236: 1229-1237,1987.
- Clemens MJ 和 Elia A, 干扰素细胞因子研究杂志 (J Interferon Cytokine Res), 17 (9): 503-24,1997.
- Clemens MJ 和 Bommer UA, 国际生物化学细胞生物学杂志 (Int J Biochem Cell Biol), 31 (1): 1-23,1999.
- Dinareello, C A, Eur. Cytokine Netw. 5: 513,1994.
- Donze O, 等人, 病毒学 (Virology), 10; 256 (2): 322-9,1999.
- Farrel, 等人, 细胞 (Cell), 11: 187-200,1977.
- Feng, G. S 等人, 美国国家科学院院刊, 89,5447-5451,1992.
- Galabru, J., 和 Hovanessian, A., 生物化学杂志 (J Biol. Chem.), 262: 15538-15544,1987.
- Hershey, J. W. B., 生物化学年鉴 (Ann. Rev. Biochem.), 60: 717-755, 1991.

-
10. 权利要求 9 的方法，其中所说的可诱导型启动子是金属硫蛋白启动子或者四环素（TRE）启动子。
 11. 权利要求 8 的方法，其中所说的启动子是 CMV 启动子。
 12. 权利要求 8 的方法，其中所说的细胞因子是白细胞介素 6（IL-6），并且哺乳动物细胞系是 Namalwa。
 13. 权利要求 8 的方法，其中所说的细胞因子是白细胞介素 8（IL-8），并且哺乳动物细胞系是 Namalwa。
 14. 权利要求 8 的方法，其中所说的细胞因子是肿瘤坏死因子 β （TNF- β ），并且哺乳动物细胞系是 Namalwa。
 15. 一种哺乳动物细胞系的组合物，其特征在于 PKR 的高于正常表达以及白细胞介素 6（IL-6）的高于正常表达。
 16. 一种哺乳动物细胞系的组合物，其特征在于 PKR 的高于正常表达以及白细胞介素 8（IL-8）的高于正常表达。
 17. 一种哺乳动物细胞系的组合物，其特征在于 PKR 的高于正常表达以及肿瘤坏死因子 β （TNF- β ）的高于正常表达。

- Hovanessian, 生物化学 (Biochimie), 62: 775-778,1980.
- Koromilas 等人, 科学, 257: 1685,1992.
- Krust, 等人, 病毒学, 120: 240-246,1982.
- Kumar, A., 等人, 美国国家科学院院刊, 91: 6288-6292,1994.
- Lannutti BJ 等人, 癌症研究 (Cancer Res), 57 (23): 5277-5280,1997.
- Levin, 等人, 美国国家科学院院刊, 75: 1121-1125,1978.
- Link 等人, 267 生物化学杂志, 239,1992.
- Meurs, E., 等人, 细胞, 62: 379-390,1990.
- O'Reilly MS, 等人, 细胞, 88 (2): 277-85,1997.
- Patel, R. C. 和 Sen, G. C. EMBO J., 17,4379-4390,1998.
- Sambrook J 等人, 分子克隆: 实验室手册 (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL), 冷泉港实验室出版社 (Cold Spring Harbor Laboratory Press), Cold Spring Harbor, NY, 第二卷,1989 年.
- Smith, KA, 科学, 240: 1169,1988.
- Whitlock 等人, 免疫学方法杂志 (J. Immunol. Methods), 67 : 353-69,1984.
- Wong G 和 Clark S, 今天的免疫学, 9 (5): 137,1988.
- Yeung M, Lau AS 等人, 美国国家科学院院刊, 93: 12451-12455,1996.
- Zamanian-Daryoush M, 等人, 癌基因 (Oncogene), 14 : 18 (2): 315-26,1999.

发明背景

dsRNA-激活的蛋白质激酶 (PKR), 称为 P1/eIF2 激酶, DAI 或者 dsI 表示 dsRNA 激活的抑制剂, 以及 p68 (人) 或者 p65 (鼠) 激酶, 是丝氨酸/苏氨酸激酶, 其酶性激活需要与 dsRNA 或者与单链 RNA 结合, 呈现出 dsRNA 的内部结构并随后发生自体磷酸化 (Galabru 和 Hovanessian, 1987; Meurs 等人, 1990)。在兔网织红细胞、不同的鼠组织以及人外周血液单核细胞中, 已对类似的酶进行了描述 (Farrel 等人, 1977; Levin 等人, 1978; Hovanessian, 1988; Krust 等人, 1982; Buffet-Janvresse 等人, 1986)。

已经表明, PKR 通过其磷酸化蛋白质合成起始因子 eIF2 以及 I- κ B

(NF- κ B 的抑制剂; Kumar A 等人, 1994) 和其它底物的能力, 在翻译、转录和信号转导途径的调节中, 扮演着多种重要的角色。

PKR 的表征得最清楚的体内底物是真核生物起始因子 2 的 α 亚基 (eIF-2 α), 一旦它被磷酸化, 它最终导致细胞和病毒性蛋白质合成的抑制 (Hershey, 1991)。已经证实: 当 PKR 被双链 RNA 激活时, 它在体外磷酸化起始因子 eIF-2 (Chong 等人, 1992)。

归属到 PKR 的活性, 包括它在下面三过程中扮演的角色: (1) 介导 IFN- α 和 IFN- β 的抗病毒和抗增殖活性, (2) 未感染细胞对生理应激反应的应答, 和 (3) 细胞生长的调节 (Clemens MJ 和 Elia A, 1997; Zamanian-Daryoush M 等人, 1999)

另已建议: PKR 可以作为肿瘤抑制剂和细胞凋亡诱导剂而发挥功能 (见, 例如, Clemens MJ 和 Bommer UA, 1999; Yeung, Lau 等人, 1996; Koromilas 等人, 1992), 最近的结果表明活性形式 PKR 的表达, 很可能是通过 Fas 受体的去调节, 触发细胞凋亡 (Donze O 等人, 1999)。

已进一步地表明: 当用编码 PKR 的表达载体转染具有产生干扰素能力的细胞系时, PKR 的过表达诱导出更多的干扰素产生 (WO 97/08324)。干扰素蛋白质家族是细胞因子的原型, 而且已表明它们在免疫防御抵抗病原和癌性组织中扮演着关键角色。

细胞因子是表现出一系列生物学活性的调节性分子, 并作用于广泛的靶细胞 (见, 例如, Balkwill FR 和 Burke, 1989; Wong G 和 Clark S, 1988; Clark S 和 Kamen R, 1987)。

一般地, 当前是通过在昆虫、细菌和哺乳动物宿主细胞中表达重组的蛋白质, 生产细胞因子。

通过从哺乳动物细胞系纯化天然的细胞因子或者在昆虫、微生物或哺乳动物细胞中重组生产细胞因子, 而将细胞因子用于多种治疗性用途。优选天然的细胞因子, 这是由于已知它们含有某一给定细胞因子之天然形式的全部组成部分并且具有恰当的结构, 但是它们很昂贵而且生产起来很费时间。

重组生产的细胞因子制造起来相对便宜, 但是随来源的不同, 可能含有外源抗原, 从而使施用了它们的对象产生免疫反应, 或者由于与天然形式有结构差异, 例如糖基化型式不同, 而可能具有较低的活性。

因而，能够用于增强天然细胞因子产生的方法，从而使它们不再那么昂贵，将是有优越性的。

目前的方法是采用在微生物系统中表达细胞因子，它们不能够将细胞因子蛋白质糖基化和天然折叠，或者在人细胞中表达细胞因子，一般地这些人细胞产生的重组细胞因子的水平非常低。

本发明涉及惊人的发现，即通过操作某些基因的表达，使得在培养的哺乳动物细胞中细胞因子的产生得到增强。

发明概述

通过提供这样的细胞系，其中的细胞因子调节蛋白质的表达被提高到高于正常水平而导致细胞因子的产生水平增加，本发明提供了在哺乳动物细胞培养物中增强细胞因子产生的方法。

一方面，本发明提供了生产细胞因子的方法，即通过培养已以一种方式被修饰的哺乳动物细胞系，所采用的修饰方式能够导致细胞因子调节因子的过表达，并且对所说的哺乳动物细胞系进行了处理，从而有效地产生细胞因子，接着收集由培养的、经处理的细胞系产生的细胞因子。

在一个优选的实施方案中，细胞因子调节因子是 PKR。

在一个方法中，用具有启动子片段的表达载体对哺乳动物细胞系进行转染，该启动子片段能够在宿主细胞中发挥功能并且与编码细胞因子调节因子的 DNA 片段可操作地连接，这样以来，在细胞系中细胞因子调节因子被过表达。

通过引发 (priming) 和诱导，例如采用佛波酯诸如乙酸肉豆蔻佛波醇 (PMA) 引发和采用 dsRNA 诸如 poly r(I):poly r(C) 诱导可以对细胞系进行处理，从而有效地产生细胞因子。引发是一种众所周知的现象，因此采用细胞因子或者其它化合物对细胞进行预处理，会导致相同的和/或另外的细胞因子在随后的刺激之后产生得到增强。

用本发明方法可以增加的细胞因子表达的实例包括但不限于：白细胞介素 (IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-4 至 8)，肿瘤坏死因子 α 和 β (TNF- β)，集落刺激因子 (粒细胞集落刺激因子，G-CSF；粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子，GM-CSF；以及 IL-3)，血管生成因子 (成

纤维细胞生长因子, FGF; 血管内皮细胞生长因子, VEGF; 以及血小板衍生的生长因子 1 和 2 (PDGF-1 和-2) 和抗-血管生成因子 (制管张素 (angiostatin) 和内皮抑素 (endostatin))。

可以在可诱导型启动子例如金属硫蛋白启动子或四环素 (TRE) 启动子, 或者组成型启动子例如 CMV 启动子的控制之下, 表达细胞因子。

本发明进一步地提供了细胞系组合物, 其特征在于细胞因子调节因子例如 PKR 的高于正常表达以及细胞因子例如白细胞介素 6 (IL-6)、白细胞介素 8 (IL-8) 或者肿瘤坏死因子 β (TNF- β) 的高于正常表达。

当阅读了下面的本发明详述并结合所附的附图和实施例后, 本发明的这些和其它目的及特性将会变得更加充分明显。

附图简述

图 1 表示在未被转化的 Namalwa 以及过表达 PKR 的 Namalwa 细胞中, 白细胞介素 6 (IL-6) 的产生。将 2A1.D1.G7.和亲代 Namalwa 细胞于含有 20nM PMA 的 DMEM/F12 培养基中培养 20 小时, 然后用 200 μ g/ml 的 poly r(I):poly r(C)处理 3 天 (+) 或者不作处理 (-)。收集培养上清液, 然后采用 ELISA (R&D Systems), 根据供应商提供的方法, 分析其中 IL-6 的产生。

图 2 表示在未被转化的 Namalwa 以及过表达 PKR 的 Namalwa 细胞中, 白细胞介素 8 (IL-8) 的产生, 除了对培养上清液采用 ELISA, 根据 ELISA 试剂盒供应商 (R&D Systems) 提供的方法, 分析其中 IL-8 的产生外, 完全按图 1 中所描述出的方法进行。

图 3 表示在未被转化的 Namalwa 以及过表达 PKR 的 Namalwa 细胞中, 肿瘤坏死因子 β (TNF- β) 的产生, 除了对培养上清液采用 ELISA, 根据 ELISA 试剂盒供应商 (R&D Systems) 提供的方法, 分析其中 TNF- β 的产生外, 完全按图 1 中所描述出的方法进行。

发明详述

I. 定义

术语“载体”指能够同化新核酸并且在合适的宿主中能够繁殖那些新序列的核苷酸序列。载体包括但不限于重组的质粒和病毒。本发明

的编码序列所必需的 DNA 序列。适于原核细胞的控制序列包括,例如,启动子、任选地操纵子序列和核糖体结合位点。已知真核细胞利用启动子、多腺苷酸化信号和增强子。

启动子序列编码组成型或者可诱导型的启动子。这些启动子可以是天然存在的启动子或者杂合的启动子。杂合的启动子将多于一种启动子的元件结合在一起,它们一般为本领域所公知,并用于本发明的实施之中。

正如本文所用,术语“细胞因子调节因子表达”指细胞因子调节因子基因的转录和翻译,其产物包括前体 RNA、mRNA、多肽、经翻译后加工的多肽,和它们的衍生物,其中包括来自诸如鼠或猿猴的酶类的其它非人类物种的细胞因子调节因子。正如本文所用,术语“PKR 表达”指 PKR 基因的转录和翻译,其产物包括前体 RNA、mRNA、多肽、经翻译后加工的多肽和它们的衍生物,其中包括来自诸如鼠或猿猴的酶类的其它非人类物种的 PKR。

正如本文所用,术语“PKR 的生物学活性”和“具有生物学活性的 PKR”指与 PKR 或者 PKR 的任何片段、衍生物或类似物相关的任何生物学活性,诸如酶活性,具体包括自体磷酸化活性、真核细胞翻译起始因子 2 (eIF-2) 磷酸化活性或者导致蛋白质诸如细胞因子的转录被增强的激酶活性。所以,某一给定的细胞因子调节因子的生物学活性是指由本领域技术人员所一般赋予该因子的任何生物学活性。

正如本文所用,术语“细胞因子调节因子活性的正常水平”,“细胞因子调节因子表达的正常水平”,其分别被简称为“PKR 活性的正常水平”和“PKR 表达的正常水平”,是指细胞因子调节因子例如 PKR 的活性或表达的水平,经确定其存在于未受刺激或未受感染的某一特定类型细胞例如某一特定细胞系中。应当理解的是,这样的“正常的”细胞因子调节因子活性或表达,一般是在未用编码细胞因子调节因子的载体转染、未受刺激(没有受到诱导或被引发)和未受感染的某一给定类型的细胞中所观察到的细胞因子调节因子活性或表达的一个范围,并且可能会依培养条件而有所变化。

例如,U937 细胞系所具有的 PKR 活性的正常范围,可能与 U937、T98G 或 Namalwa 细胞系所具有的 PKR 活性的正常范围不同。因此,

某一给定细胞因子调节因子例如 PKR 的过表达,就意味着其表达水平,高于在未用编码 PKR 的载体转染、未受刺激(没有受到诱导、预处理或被引发)和未受感染的某一给定类型的细胞中所一般观察到的 PKR 表达的正常水平。

类似地,正如本文所用,术语“细胞因子活性的正常水平”和“细胞因子表达的正常水平”,是指细胞因子活性或表达的水平,经确定其存在于没有过表达某一给定的细胞因子调节因子例如 PKR 的某一特定类型细胞中,诸如正常地产生或者具有产生某一给定细胞因子能力的未受转染的细胞系。应当理解的是,这样的“正常的”细胞因子活性或表达,一般是在没有过表达细胞因子调节因子的某一给定类型的细胞中所观察到的细胞因子活性或表达的一个范围,并且可能会依培养条件而有所变化。

例如,没有过表达 PKR 的某一给定细胞系可以具有正常的细胞因子活性范围,它与用 PKR 转染或者过表达 PKR 的该相同细胞系所具有的细胞因子活性范围不同。

II. 发明方法

本发明是基于这样的发现,即在哺乳动物的细胞培养物中,通过对某些蛋白质的表达或活性进行调节,可以将细胞因子的产生水平提高,这些蛋白质在正常情况下调节细胞因子的体内表达。

这些因子包括细胞因子特异的调节因子,例如干扰素调节因子(IRF-1、IRF-3 和 IRF-7)、细胞因子受体、核因子 κ B (NF- κ B)、激活子蛋白质-1(AP-1)、核因子 IL-6(NF-IL6)、蛋白质激酶 C、p38 MAPK、STAT/Jak 激酶系统因子,以及尤其是 PKR。

增强任何这些调节因子的表达或活性,将会导致编码一种或多种细胞因子基因的高于正常水平的表达。如此增强的细胞因子表达将导致细胞因子的生产效率更高、生产成本更低。

在本文中,PKR 被用作一个具有调节细胞因子表达能力的蛋白质例子,但是应该明白,可以使用其它的细胞因子调节因子例如 PMA、蛋白质激酶 C (PKC) 诱导物、干扰素- γ 、干扰素- α 、干扰素- β 、TNF- α 、GM-CSF、EGF 和 PDGF,来取代 PKR。

的载体（例如质粒或重组的病毒），可以是处于一种携带体中，例如，与蛋白质复合的质粒，与基于脂质的核酸转导系统复合的质粒，或者其它非病毒性携带体系统。

表达载体可以包含另外一些元件，例如，表达载体可以具有两种复制系统，从而允许其能够在两种生物体中保持，例如在哺乳动物或昆虫细胞中保持存在以表达以及在原核宿主中保持存在以克隆和扩增。

无论是表达载体还是克隆载体，它们均包含能够使载体在一种或多种被选择的宿主细胞中复制的核酸序列。对于多种细菌、酵母和病毒，这样的序列众所周知。而且，对于整合型表达载体，表达载体含有至少一个与宿主细胞基因组同源的序列，优选地含有两个位于表达构建体侧翼的同源序列。通过选择合适的同源序列并将其插入到载体中，就可以将整合型载体导向宿主细胞中的特定位点。整合型载体的构建体为本领域所公知。

表达和克隆载体一般含有选择性的标记基因，它编码这样的蛋白质：（a）赋予对抗生素或其它毒素，例如氨基青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素，的抗性（b）互补营养缺陷型，或者（c）提供无法从复合培养基中获得的关键营养物质，例如，编码杆菌（*Bacilli*）D-丙氨酸消旋酶的基因。

在载体中，必须将核酸编码序列“可操作地连接”，这可通过将其置于与另一核酸序列处于功能关系之中而实现。例如，如果编码前序列（presequence）或分泌性前导序列（leader）的DNA被表达为参与多肽分泌的一种前蛋白质（preprotein），那么它就是与编码多肽的DNA进行了可操作地连接；如果启动子或增强子影响了编码序列的转录，那么它就是与编码序列进行了可操作地连接；或者，如果核糖体结合位点被置于促进翻译的部位，那么它就是与编码序列进行了可操作地连接。通常地，“可操作地连接”的DNA序列是紧邻（contiguous）的，并且，在分泌性前导序列的情况下也是连续的并处于阅读框架中。然而，增强子却并不一定是紧邻的。连接是通过将方便的限制位点连接而完成的。如果不存在这样的位点，那么可以根据常规方法，使用合成的寡核苷酸连接物（adaptor）或接头（linker）。

术语“控制序列”指在某一特定的宿主生物体中表达可操作地连接

在哺乳动物细胞中，通过提高细胞因子调节因子例如 PKR 的表达/活性，能够将细胞因子的生产水平提高。因而，将这样的哺乳动物细胞培养物用于生产细胞因子，它们组成型地表达较高水平的细胞因子调节因子，或者其中的细胞因子调节因子的表达可被诱导至更高水平。

该方法依赖于这样可使用的细胞，它们过表达能够调节细胞因子表达的蛋白质（细胞因子调节因子），例如包括但不限于 PKR，作为细胞因子的来源，除了一般使用了非微生物诱导物之外，而并不需要特定的方法来过表达细胞因子调节因子。但是，在某些情况下，结合丁酸钠处理、使用了例如病毒性诱导。

具体地，该方法包括：(a) 在能够足够地过表达细胞因子调节因子的条件下，培养具有过表达细胞因子调节因子或其类似物或其同源物之能力的哺乳动物细胞，和 (b) 合适地处理细胞培养物以诱导细胞因子基因的表达。

用于生产某一给定细胞因子的细胞能够过表达细胞因子调节因子，例如来自任何哺乳动物源的 PKR，诸如在兔网织红细胞、多种小鼠组织或人外周血液单核细胞中所通常发现的 PKR。分别在相应的鼠或人的细胞培养物中，优选地将鼠 p65 激酶（Feng, G. S 等人, 1992）和最优选地 p68 激酶（Meurs, E 等人, 1990; GenBank Accession No. NM_002759）过表达。

在某些情况下，被过表达的细胞因子调节因子是天然细胞因子调节因子的类似物，例如 PKR 的类似物诸如能够介导细胞因子转录的 dsRNA 激活（通常是通过对编码天然 PKR 蛋白质的基因进行修饰而获得）的非天然蛋白质激酶。

具有过表达细胞因子调节因子能力的哺乳动物细胞可以由本领域所公知的若干方法中的任何获得，或者可以从商业来源物获得。

用于获得过表达细胞因子调节因子细胞方法的实例包括选择表达更高水平细胞因子调节因子的细胞，用编码在启动子控制下的细胞因子调节因子的表达载体转染，以及导致细胞因子调节因子的表达比起正常水平来被提高的其它方法。

另外一些方法包括失活 PKR-抑制因子 p58 或减低其水平，p58 在正常情况下可抑制 PKR 的活性。p58 的突变、修饰或靶向基因切除将导

致 PKR 活性的增强 (Barber, G. N.等人, 1994)。

另一个例子包括能够增强 PKR 表达的 PKR 之天然、合成或重组激活剂,例如,PKR 激活剂蛋白质、PACT(Patel, R. C 和 Sen, G. C., 1998)。

本发明提供了适于转化人细胞的载体,例如,含有多核苷酸的重组表达载体,该多核苷酸编码蛋白质以有效地调节细胞因子表达,而该蛋白质与调节元件可操作地连接,从而使调节元件对该蛋白质在哺乳动物的细胞系中表达发挥作用。优选的编码序列包括 p68 (人) 或 p65 (鼠) 激酶的编码序列。在一个相关的方面中,本发明包括含有载体的哺乳动物宿主细胞。

在一个优选的方法中,载体包含一个多核苷酸序列,该多核苷酸序列编码蛋白质,有效地调节细胞因子的表达,而细胞因子又与另外的编码序列诸如融合蛋白质或信号肽编码序列在一起,其中还结合有非编码序列诸如内含子和控制元件,诸如启动子和终止子元件或者 5' 和/或 3' 非翻译区,这些非编码序列对编码序列在合适的宿主和/或在载体和宿主环境中表达起作用,而其中的编码序列是异源基因。“异源 DNA”和“异源基因”就是指这样的核苷酸,它们与将它们包含在其中的细胞或基因组的部分不是同源的。一般地,通过转染、同源重组、显微注射、电穿孔等,将这样的核苷酸加入到细胞。表达载体也含有用于翻译起始的核糖体结合位点以及转录终止子。载体也可以包含用于增强表达的合适的序列。另外,表达载体优选地含有一种或多种选择标志基因,从而为选择被转化宿主细胞提供表型性状。

对本领域的那些技术人员来讲,已知有大量的合适载体和启动子,并可商业获得。用于人细胞的合适的克隆和表达载体,在 Sambrook 等人 (1989) 的分子克隆: 实验室手册 (第二版), 冷泉港出版社 (Cold Spring Harbor Press), Plainview, N. Y. 以及 Ausubel FM 等人现代分子生物学方法 (Current Protocols in Molecular Biology), John Wiley & Sons, New York, N. Y. 中也有描述, 此处特别引用作为参考。启动子的实例既包括组成型启动子又包括可诱导型启动子, 其中的例子包括 CMV 启动子、SV40 早期启动子、RSV 启动子、EF-1 α 启动子、含有 tet 应答元件 (TRE) 的启动子和金属硫蛋白启动子。

可以将这样的异源核酸序列, 其中含有编码有效地调节细胞因子表

达的蛋白质之编码序列，包含在表达多肽的多种表达载体中的任何一种之内。任何载体，只要能够在引入载体的哺乳动物细胞中复制和存活，就都可以使用。可以通过多种方法将合适的 DNA 序列插入到载体中。一般地，是通过标准方法将 DNA 序列插入到合适的一种或多种限制性内切酶位点之中。这样的方法以及相关的亚克隆方法，被认为是在本领域的那些技术人员知识范围之内。

可以将含有如上所述的合适 DNA 序列以及合适启动子或控制序列的载体，用于转化哺乳动物细胞系，以允许细胞表达蛋白质，从而增强细胞因子的产生。

采用磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质转染胺 (lipofectamine) 或脂质转染-介导的转染或电穿孔，可以将载体引入到宿主细胞中 (Davis, L., Dibner, M. 和 Battey, I. 分子生物学基本方法 (Basic Methods in Molecular Biology), 1986)。为了长期、高产重组细胞因子，对稳定表达予以优选。因此，任何有效地产生稳定转化子的方法，均可以用于实施本发明。

本发明也提供了已经用本发明的表达载体转导、转化或转染的宿主细胞。培养条件，诸如温度、pH 等，与前面所用的在选择表达用宿主细胞时的那些条件相同，并且它们对本领域的技术人员而言是显而易见的。

用于表达细胞因子调节因子的合适的克隆细胞系的例子，包括但不限于 Namalwa、U937、Vero、MRC-5、WI-38 细胞、Flow 1000 细胞、Flow 4000 细胞、FS-4 和 FS-7 细胞、MG-63 细胞、CCRT-SB 细胞、CCRF-CEM 细胞以及 T98G 细胞。用于表达细胞因子调节因子的合适的初级细胞类型的例子，包括但不限于单核/巨噬细胞谱系的细胞、包括 T-和 B-细胞的淋巴细胞系的细胞、肥大细胞、成纤维细胞、骨髓细胞、角质形成细胞、成骨细胞衍生的细胞、黑素细胞、内皮细胞、血小板、多种其它免疫系统细胞、肺上皮细胞、胰腺实质细胞、神经胶质细胞以及源自这些细胞类型的肿瘤细胞。

优选地，过表达细胞因子调节因子的细胞培养物可诱导地过表达细胞因子调节因子，从而调节可用于细胞因子诱导的因子的水平。

细胞因子调节因子的过表达，是指高于正常水平的细胞因子调节因

子活性。细胞因子调节因子的“正常”活性或表达，是指细胞因子调节因子的活性或表达的一个范围，它一般在这样的给定细胞类型中观察到，该细胞类型还没有用编码细胞因子调节因子的载体转染、没有受到刺激（没有受到诱导或被引发）和感染。应当明白，细胞因子调节因子的正常活性范围会随特定的因子、细胞类型而变化，并且对于某一给定的细胞类型也会随培养条件的变化而有所不同。

高于正常水平含义是：它为在采用特定培养条件下的一给定细胞因子调节因子之正常水平的优选地至少 150%、更优选地至少 200%或 300%、最优选地至少 500%。过表达细胞因子调节因子的细胞培养物可以是组成型地过表达细胞因子调节因子或者可诱导型地过表达细胞因子调节因子。

在一个实施方案中，细胞因子调节因子是 PKR，过表达 PKR 的细胞培养物可诱导型地过表达 PKR，从而调节可用于诱导细胞因子的 PKR 水平。若干已知的细胞类型中的任何，都可以用于产生过表达 PKR 的细胞系，并且上面已给出了一些特定例子。

通过本领域公知的方法，能够确定某一给定细胞因子调节因子的活性。作为例子，PKR 表达的测定法包括自体磷酸化测定法、eIF2 α 磷酸化测定法、蛋白质水平 Western 印迹分析以及 Northern 印迹分析和 PKR mRNA 的逆转录酶聚合酶链式反应（RT-PCR）。

一般地，需要采取添加步骤，以增强哺乳动物细胞的细胞因子表达。这样的步骤包括一次或多次（1）在能够有效地增强细胞因子调节因子表达的条件下，培养被转染细胞，（2）用包括但不限于多肽、化学物质或者核酸在内的试剂，引发表达细胞因子调节因子的细胞，以及（3）处理表达细胞因子调节因子的细胞，以诱导细胞因子的产生（诱导）。

引发可以包括用引发剂例如乙酸肉豆蔻佛波醇（PMA）和其它佛波醇酯类、钙离子载体类、干扰素- α 、干扰素- γ 、干扰素- β 、G-CSF、GM-CSF、PDGF、TGF、EGF、丁酸钠、激酶激活剂或转录激活剂来处理。

处理可以包括将微生物性（即，病毒性的）或非微生物性的诱导物添加于细胞培养物。一般地，诱导物是非微生物性诱导物，例如，poly(I):poly(C) 或者 poly r(I):poly r(C)。

一般地，优选 U937 细胞，用于生产 FGF 和 sTNF-R；优选 Jurkat 细胞用于生产 IL-3 和 TNF- β ；优选成纤维细胞用于生产 FGF 和制管张素（angiostatin）；优选 U937 细胞用于生产 IL-6 及其类似物；优选包括 Jurkat 和 HUT 在内的 CD-4 表达细胞用于生产 TNF- β ；以及优选包括 Jurkat 及 Namalwa 在内的 T-与 B-细胞用于生产 IL-8 及其类似物。

一旦实现了某一给定细胞因子的增加表达，就可以将如此产生的细胞因子从细胞培养物中纯化出来。适用于这样的纯化方法包括如下：抗体-亲和柱层析，离子交换层析；乙醇沉淀；反相 HPLC；在硅胶或阳离子-交换树脂诸如 DEAE 上的层析；聚焦层析；SDS-PAGE；硫酸铵沉淀；以及使用了例如 Sephadex G-75 的凝胶过滤。可以采用纯化蛋白质的多种方法，这样的方法为本领域所公知，并且在例如 Deutscher 的酶学方法（Methods in Enzymology）第 182 卷，1990；Scopes 的蛋白质纯化：原理与实践（Protein Purification: Principles and Practice），Springer-Verlag, New York, 1982 中予以了描述。所选择的纯化步骤将取决于，例如，所采用的生产方法以及所产生的特定细胞因子的特性。

在本发明的一个优选的方面中，将培养条件、引发和处理结合起来，导致细胞因子产生的显著增加，例如，至少增加 2.5 倍，优选地增加 10 倍或更多。在某些情况下，本发明的方法导致细胞因子的产生增加 100 到 1000 倍或更高。

在细胞培养中，一般与细胞因子产生相关的问题，例如非重组哺乳动物系统的低产率、微生物系统所产生的蛋白质的不恰当糖基化或误折叠，在本发明的方法中被消除，这必将会对开发治疗性蛋白质发挥作用。

III. 细胞因子

细胞因子是通过与它们的同族受体结合，随后通过信号转导而导致对多种生化过程的刺激，从而激发出它们的生物学活性。在某些情况下，这些受体的表达受到特定信号的调节，例如细胞因子也许参与了正或负反馈回路，从而调节针对同一或不同细胞因子的受体的表达。这些受体可以是产生细胞因子的同一类型细胞或者是不同类型细胞。

细胞因子的作用是介导和调节免疫和炎症应答。一般地，细胞因子的产生是短暂的，并且其产生是发生在很短的转录期间，生成寿命也很短的 mRNA 转录本并随后接受转录后控制机制。最近的研究已经指出，多种细胞因子都采用了一种相同的信号转导途径，即“Jak/STAT”途径（Abbas, AK 等人，1997）。

应当意识到，来自细胞的细胞因子，各自具有其不同的特性，并且每种都能够由多种广泛不同的细胞类型产生。另外，一种给定的细胞因子（1）可以作用于多于一种类型的细胞，（2）对于同一细胞可以具有多于一种效应，（3）可以具有与另一种细胞因子共享的活性，和（4）通过例如拮抗或协同其效应，可以影响其它细胞因子的合成或效应。

已经观察到：重组的可溶性肿瘤坏死因子受体（sTNF-R）中和 TNF 并具有抗炎性质。

sTNF-R 目前是以重组蛋白质的形式被生产。

用于产生 sTNF-R 的靶细胞包括单核/巨噬细胞谱系的细胞。

sTNF-R 的临床用途包括应用于类风湿性关节炎和脓毒症以及多种研究性用途。

已知白细胞介素-2（IL-2）或“T-细胞生长因子”促进 T-细胞的生长和功能。当用某些有丝分裂原刺激或者使 T-细胞受体复合物与抗原/MHC 复合物在抗原递呈细胞的表面相互作用，而将 T-辅助淋巴细胞激活时，IL-2 以及 IL-2 受体被诱导出来，导致抗原特异 T-细胞的克隆性扩增（见，例如，Smith, KA, 1988；Dinarello, 1994）。

目前，通过在多种不同类型的细胞中表达重组的 IL-2，来生产 IL-2。

用于生产 IL-2 的靶细胞包括 T-细胞在内。

IL-2 的临床用途包括抗癌和抗 HIV 应用，以及多种研究性用途。

白细胞介素 3（IL-3）作为一种刺激因子，参与若干类型的造血细胞形成，其中包括粒细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、巨核细胞和红系细胞。

已观察到 IL-3 对骨髓（BM）干细胞具有多种造血效应，IL-3 比 G-CSF 具有更多效应。

目前在采用重组 DNA 技术生产 IL-3。

用于产生 IL-3 的靶细胞包括 T-细胞和肥大细胞。

IL-3 的临床用途包括应用于：(1) T-和干细胞的离体扩增，(2) 体内骨髓移植后，(3) 骨髓衰竭（化疗），(4) 血液不调和 (5) 各类血细胞减少症，此外还有多种研究用途。

白细胞介素 4 (IL-4)，也称为 B 细胞刺激因子或 BSF-1，已观察到它具有多种生物学效应，其中包括 (1) T-细胞、肥大细胞、粒细胞、巨核细胞和红细胞的共刺激，(2) 诱导 II 型主要组织相容性复合物分子在静息 B 细胞上的表达，(3) 增强受刺激的 B 细胞分泌 IgE 和同型 IgG1，和 (4) 抗炎症特性。

已观察到 IL-4 对 II 型辅助 T-细胞 (TH2) 应答具有效应并且具有抗生长特性。

目前通过表达重组蛋白质的形式生产 IL-4。

用于产生 IL-4 的靶细胞包括 T-细胞和肥大细胞。

IL-4 的临床用途包括应用于干细胞的离体扩增、抗癌策略以及治疗实体肿瘤，此外还有多种研究用途。

白细胞介素 5 (IL-5) 被认为对抑制变态反应性应答以及抑制嗜酸性粒细胞有效应。

目前通过表达重组蛋白质的形式生产 IL-5。

用于产生 IL-5 的靶细胞包括 T-细胞和肥大细胞。

IL-4 的临床用途包括应用于治疗哮喘，此外还有多种研究用途。

白细胞介素 6 (IL-6) 是一种多功能的细胞因子，由多种类型细胞产生，并且作为分化和生长因子作用于多种类型细胞，其中包括免疫系统中的细胞、肝细胞、肾细胞、造血干细胞 (hematopoietic staminal cells)、角质形成细胞和神经元。

已观察到 IL-6 在发炎中扮演了角色并具有抗生长特性。

目前通过表达重组蛋白质的形式生产 IL-6。

用于产生 IL-6 的靶细胞包括成纤维细胞、T-细胞和单核细胞/巨噬细胞谱系的细胞。

IL-6 的临床用途包括应用于治疗乳癌和白血病，并且 IL-6 的抗炎症特性也许在治疗多种感染性疾病以及血栓形成障碍中有用途，此外还有多种研究用途。

白细胞介素 7 (IL-7)，以前称为“淋巴细胞生成素-1”，最初是根据

它能够刺激源自长期骨髓培养物的前-B 细胞 (B220⁺细胞) 增殖而定义的 (Whitlock 等人, 1984)。已观察到 IL-7 能够刺激骨髓中 B-和 T-细胞的祖先生长, 并在 (1) 皮肤中的细胞因子合成, (2) 细胞毒 T-淋巴细胞 (CTL) 活性的增加, 和 (3) 天然杀伤 (NK) 细胞活性的增加中扮演角色。

目前通过表达重组蛋白质的形式生产 IL-7。

用于产生 IL-7 的靶细胞包括骨髓细胞和角质形成细胞。

IL-7 的临床用途包括应用于治疗黑素瘤, 此外还有多种研究用途。

白细胞介素 8 (IL-8) 是一种趋化性细胞因子, 能够引起人嗜中性粒细胞的去颗粒化, 并由角质形成细胞、上皮细胞、滑膜细胞、肝细胞和嗜中性粒细胞产生, 已知 IL-8 的生物学效应是通过七次跨膜结构域、G-蛋白-偶联的受体所介导。

已观察到 IL-8 是 CXC 趋化因子家族的一员, 并具有趋化和生血管特性。

目前通过表达重组蛋白质的形式生产 IL-8。

用于产生 IL-8 的靶细胞包括成纤维细胞、T-细胞和单核细胞/巨噬细胞谱系的细胞。

尽管 IL-8 的临床研究还没有完成, 预计其用途包括应用于细菌和病毒感染、癌症治疗和促进血管生长, 此外还有多种研究用途。

肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 和肿瘤坏死因子- β (TNF- β ; 淋巴毒素), 主要是分别通过巨噬细胞和淋巴细胞而产生的。TNF- α 具有多种生物学功能, 其中包括移植性肿瘤的出血性坏死、细胞毒性、在内毒素休克和在炎症中的重要角色、免疫调节、增殖和抗病毒应答。TNF- α 和 TNF- β 共享相似的生物学活性谱。TNF- β 对肿瘤性质的细胞系表现出抗细胞活性, 但是对初级细胞培养物和正常细胞系没有抗细胞活性, 这就提示它具有潜在的抗肿瘤活性。TNF- β 在淋巴器官的发育中也扮演了重要的角色。TNF- α 和 TNF- β 与相同的细胞表面受体结合, 这与它们具有相似的活性相一致。

TNF- α 和 TNF- β 的临床用途包括应用于抗-癌症, 尤其是与其它化疗试剂或基因治疗联合起来使用。联合治疗可能是重要的, 这样, 就可以只施用相当低剂量的 TNF (美国专利 5976800, 公开于 11/2/99)。

这些因子也许对于治疗患有包括黑素瘤、骨肉瘤乳癌和淋巴瘤在内的弥漫性肿瘤患者有用途。

粒细胞集落刺激因子 (G-CSF)，已观察到它刺激嗜中性粒细胞前体的增殖和分化，并且在粒细胞的成熟和氧化性裂解中扮演了角色。

目前通过在细菌和哺乳动物宿主细胞中表达重组蛋白质的形式生产 G-CSF。

用于产生 G-CSF 的靶细胞包括成纤维细胞、内皮细胞和单核细胞/巨噬细胞谱系的细胞。

G-CSF 的临床用途包括应用于治疗化疗后的各类血细胞减少症，骨髓移植后的治疗，以及多种研究用途。

粒细胞-巨嗜细胞集落刺激因子 (GM-CSF)，已观察到它能够刺激粒细胞和巨嗜细胞从它们的前体细胞产生克隆，并促进多能祖先细胞的生长和分化。另外，GM-CSF 看起来在粒细胞和巨嗜细胞的功能中扮演了效应子角色。

目前通过在细菌和哺乳动物宿主细胞中表达重组蛋白质的形式生产 GM-CSF。

用于产生 GM-CSF 的靶细胞包括成纤维细胞、内皮细胞和 T-细胞。

GM-CSF 的临床用途包括广泛应用于治疗化疗后的各类血细胞减少症，骨髓移植后的治疗，以及多种研究用途。

成纤维细胞生长因子 (FGF)，已观察到酸性和碱性两种形式均在血管生成和内皮细胞增殖中扮演角色。对培养物中重组 FGF-5 的研究显示，它能够促进培养的运动神经元的存活，这表明 FGF-5 是运动神经元的神经营养因子。

目前通过表达重组蛋白质的形式生产 FGF。

用于产生 FGF 的靶细胞包括成血小板、内皮细胞和巨噬细胞谱系的细胞。

FGF 的用途包括应用于治疗缺血性心脏病、充血性心脏衰竭和多种涉及炎症应答的疾病，以及多种研究用途。

血管内皮细胞生长因子 (VEGF)，是一种血管生成生长因子，它具有包括血管生成、氧化氮-介导的血管舒张、增加血管通透性、增加内皮细胞的增殖及游动性在内的多种生理效应。已观察到 VEGF 的表达

被局部缺血显著地去调节。

目前通过在细菌和哺乳动物宿主细胞中表达重组蛋白质的形式生产 VEGF。

用于产生 VEGF 的靶细胞包括多种免疫细胞。

VEGF 的用途包括应用于治疗充血性心脏衰竭,以及多种研究用途。

血小板衍生的生长因子 (PDGF-1 和 PDGF-2), 已观察到它们作为生长因子而起作用并在血管生成中扮演了角色。已表明, 纯化后的人血小板衍生的生长因子 (PDGF) 是间充质衍生的培养的平滑肌细胞、成纤维细胞和神经胶质细胞的有丝分裂原, 并作为单核细胞和嗜中性粒细胞的趋化吸附剂起作用。

在体内, PDGF 存在于血小板的 α 颗粒以及内皮细胞中, 并且已表明它具有愈伤特性。

目前通过表达重组蛋白质的形式生产 PDGF-1 和 PDGF-2。

用于产生 PDGF-1 和 PDGF-2 的靶细胞包括血小板、内皮细胞和单核细胞/巨噬细胞谱系的细胞。

PDGF-1 和 PDGF-2 的临床用途包括应用于治疗缺血性心脏病, 以及多种研究用途。

制管张素和内皮抑素, 已观察到它们在抑制内皮细胞生长中扮演了角色。已观察到制管张素和内皮抑素在携带肿瘤动物中作为血管生成的抑制剂起作用 (Lannutti BJ 等人, 1997; O'Reilly MS 等人, 1997)。

用于产生制管张素和内皮抑素的靶细胞包括多种免疫系统的细胞。

制管张素和内皮抑素的用途包括应用于癌症治疗, 以及多种研究用途。

另外一些细胞因子

通过使用本发明的方法可以将其他示范性细胞因子的表达提高, 这些示范性细胞因子包括但不限于: 上面提到的细胞因子的其它家族成员, 诸如 IL-6 家族成员制瘤素 M; IL-11, 白血病抑制因子 (LIF); 纤毛性神经营养因子和心脏营养因子。另外, 上面提到的细胞因子的同族受体, 诸如 TNF 可溶性受体 (sTNF-R)、Fas 可溶性受体 (sFas) 以及 IL-6 家族受体可溶性糖蛋白 130 (gp130), 其表达可以被提高。通过使用本发明的方法可以将另外一些示范性细胞因子的表达提高, 这

些细胞因子的实例包括但不限于这样一些细胞因子，它们的基因被 PKR 激活的转录因子所调节，其中包括 NF- κ B、IRF-1, 3 和 7，以及 Stat 家族成员。

IV. PKR

在一个方法实例中，PKR 是用于增强细胞因子产生的因子，并且用于实施本发明方法的细胞具有产生 PKR 的能力并在没有被修饰时产生基线水平的 PKR。

在一些情况下，通过测量 PKR 的自体磷酸化活性或者在磷酸化底物中的激酶活性，优选地底物为真核细胞起始因子-2 α (eIF-2 α) 或者另一种因子诸如核因子- κ B (NF- κ B) (Link 等人, 生物化学杂志 (J. Bio. Chem.) 267 卷, 239 页, 1992), 或者通过生化测试, 诸如聚合酶链式反应 (PCR) 或用 PKR 专一性抗体进行 Western 印迹, 可以直接评价 PKR 的活性。

可以采用若干方法来增强 PKR 的表达。在本发明的一个实施方案中, 采用包含编码 PKR 序列, 该序列有效地与启动子连接, 以及含有在哺乳动物宿主细胞表达 PKR 所必需的控制序列的表达载体, 转染具有产生某一给定细胞因子能力的哺乳动物宿主细胞, 增强了 PKR 的表达。

可以将用编码 PKR 的核苷酸序列转染的宿主细胞, 在适于在细胞中表达所编码的 PKR 的条件下进行培养。正如本领域的那些技术人员所理解, 能够对含有编码 PKR 的多核苷酸的表达载体进行设计, 使得由重组细胞所产生的 PKR 可以被分泌出来、结合到膜上或者包含在细胞内, 这取决于所使用的序列和/或载体。

在一些情况下, 可以采取添加步骤以增强被转染的宿主细胞表达 PKR。这样的步骤包括一次或多次 (1) 在能够有效地增强 PKR 表达的条件下, 培养被转染的细胞, (2) 引发 PKR-转染的细胞, 以及 (3) 正如下面所进一步描述, 处理 PKR-转染的细胞, 以诱导细胞因子的产生。

在一个优选的实施方案中, 将培养条件、引发和处理结合起来, 导致细胞因子的产生被显著地增强, 例如, 至少 2.5 倍以及优选地至少

10 倍的增加或者更多。在一些情况下，本发明的方法所导致的细胞因子产生的增加，为 100 至 1000 倍或者更高。

V. 细胞因子表达的评价

为了对由过表达细胞因子调节因子细胞系表达目的细胞因子进行评价，可以在蛋白质水平、RNA 水平或者通过使用专门针对被表达的各个细胞因子的功能性生物测定法，进行测定。

通过采用由本领域的那些技术人员日常所使用的方法，可以进行针对某一目的细胞因子蛋白质的免疫测定。这样的免疫测定可用于定性和定量分析目的细胞因子的表达。

目的被关注的细胞因子的纯化形式可以从天然来源物获得，或者在转染的细胞中重组产生并使用蛋白质纯化的标准技术进行纯化。接着可以将纯化的蛋白质用于产生对所表达的蛋白质特异的单克隆或多克隆抗体，然后就可以将这些抗体用于多种免疫测定（见，例如，Harlow 和 Lane, 抗体：实验室手册（Antibodies: A Laboratory Manual），冷泉港出版社，N.Y., 1988）。示范性的测定法包括 ELISA、竞争性免疫测定法、放射性免疫测定法、Western 印迹、间接免疫荧光测定法等。

一般地，这样的抗体可商业获得。可商业获得的细胞因子分析试剂盒一般用于已知细胞因子的表达水平的定量免疫测定。

在下面的实施例中，给出了上面所描述的操作步骤的具体例子。但是，对其进行许多修改是非常可能的，这对于本领域的普通技术人员是显而易见的，而且提供实施例的目的只是为了阐明，并不是为了限制本发明，除非特别指出。

实施例 1

过表达 PKR 的 Namalwa 细胞系的制备

将编码人的全长 PKR 分子的 cDNA（551 个氨基酸；Meurs, E 等人，1990；GenBank Accession No. NM_002759）插入到真核细胞表达载体中，这样做，使得 PKR 编码序列在 CMV 启动子的控制下得到表达。该载体含有适于 PKR 转录的多种特性，其中包括：i) 来自人 CMV（巨细胞病毒）立即早期基因的启动子序列，用于高水平 mRNA 表达；

ii)来自 β -球蛋白基因的多腺苷酸化信号和转录终止序列,以增强RNA的稳定性;iii)氨苄青霉素抗性基因;和iv)ColE1复制起点,用于在大肠杆菌(*E. coli.*)中的选择和保持。第二种载体含有氨苄青霉素抗性基因和ColE1起点用于在大肠杆菌中的选择和保持,以及G418抗性标记(Neo)以便在共转染到真核细胞中后能够对该质粒进行选择和鉴定。

用 $15\mu\text{g}$ 表达PKR的质粒和 $15\mu\text{g}$ 含有Neo的载体,在DMEM/F12(+10%FBS)中,采用Gene Pulser装置(Bio-Rad),在设定 $800\mu\text{F}$ 、 300V 的条件下,电穿孔 4×10^6 个对数生长的Namalwa细胞。采用 2mg/ml 的基因菌素(geneticin)(Gibco-BRL)进行选择3-4周,,获得了大量稳定的转染子。通过有限稀释性克隆化,随后获得了克隆系。对亲代和PKR-转染的Namalwa细胞中的PKR水平进行分析,结果发现:相对于亲代Namalwa细胞,在PKR-转染子中PKR的水平已提高了大约16倍。

将一个具有代表性的过表达PKR和克隆化的Namalwa细胞系选择出来,将其指定为2A1.D1.G7。

在补充了10%FBS的DMEM/F12培养基中,于 2.5×10^5 个细胞/毫升下培养2A1.D1.G7和亲代Namalwa细胞。将细胞用 20nM 的PMA处理(引发)20小时,然后用 $200\mu\text{g/ml}$ 的poly r(I):poly r(C)处理(诱导)3天。其中有一组细胞没有作处理(未诱导的对照)。在处理之后,收集培养上清液,采用ELISA,根据ELISA试剂盒供应商(R&D Systems)所提供的方法,分析其中的白细胞介素6(IL-6)、白细胞介素8(IL-8)和TNF- β 的水平。

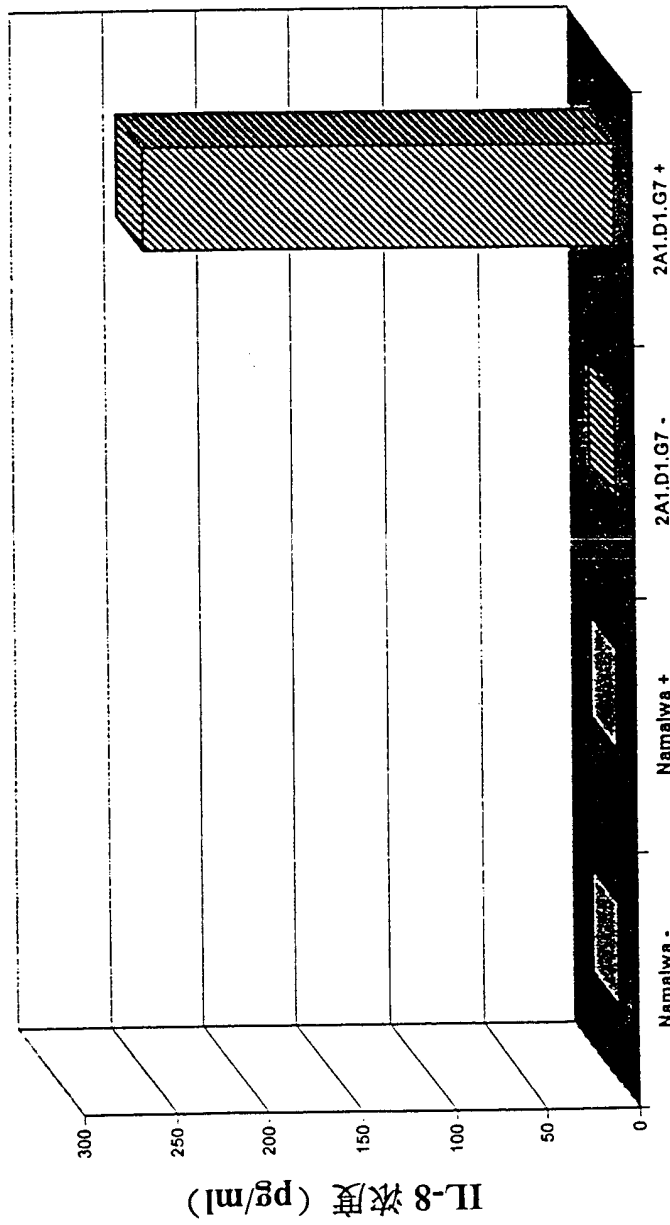
IL-6在多种条件下的产生情况见图1。在不存在引发剂(PMA)以及诱导剂[poly r(I):poly r(C)]时,亲代Namalwa和2A1.D1.G7均不产生IL-6。用PMA和poly r(I):poly r(C)处理亲代Namalwa细胞也没有产生出可检测水平的IL-6(所用测定法的最低可检测水平为 3pg/ml)。相比之下,用PMA和poly r(I):poly r(C)处理的2A1.D1.G7产生出高于 300pg/ml 的IL-6。这就意味着,相对于未受处理的2A1.D1.G7以及用PMA和poly r(I):poly r(C)处理的亲代Namalwa细胞,IL-6的产生提高了至少100倍。此外,过表达PKR的其它几个克隆化的细胞系,在PMA和poly r(I):poly r(C)处理后,产生高于 300pg/ml 的IL-6(数据未给出)。

这些结果表明：在 Namalwa 细胞中过表达 PKR 基因并随后引发和激活，导致 IL-6 的过表达。

IL-8 在多种条件下的产生情况见图 2。与所得到的针对 IL-6 的结果相一致，在不存在引发剂（PMA）以及诱导剂〔poly r(I):poly r(C)〕时，亲代 Namalwa 和 2A1.D1.G7 均不产生 IL-8。用 PMA 和 poly r(I):poly r(C)处理亲代 Namalwa 细胞也没有产生出可检测水平的 IL-8（所用测定法的最低可检测水平为 31pg/ml）。相比之下，用 PMA 和 poly r(I):poly r(C)处理的 2A1.D1.G7 产生出大约 300 pg/ml 的 IL-8，这就意味着，相对于未受处理的细胞以及用 PMA 和 poly r(I):poly r(C)处理的亲代 Namalwa 细胞，提高了至少 10 倍。此外，过表达 PKR 的其它几个克隆化的细胞系，在 PMA 和 poly r(I):poly r(C)处理后，产生 250-470 pg/ml 的 IL-8（数据未给出）。

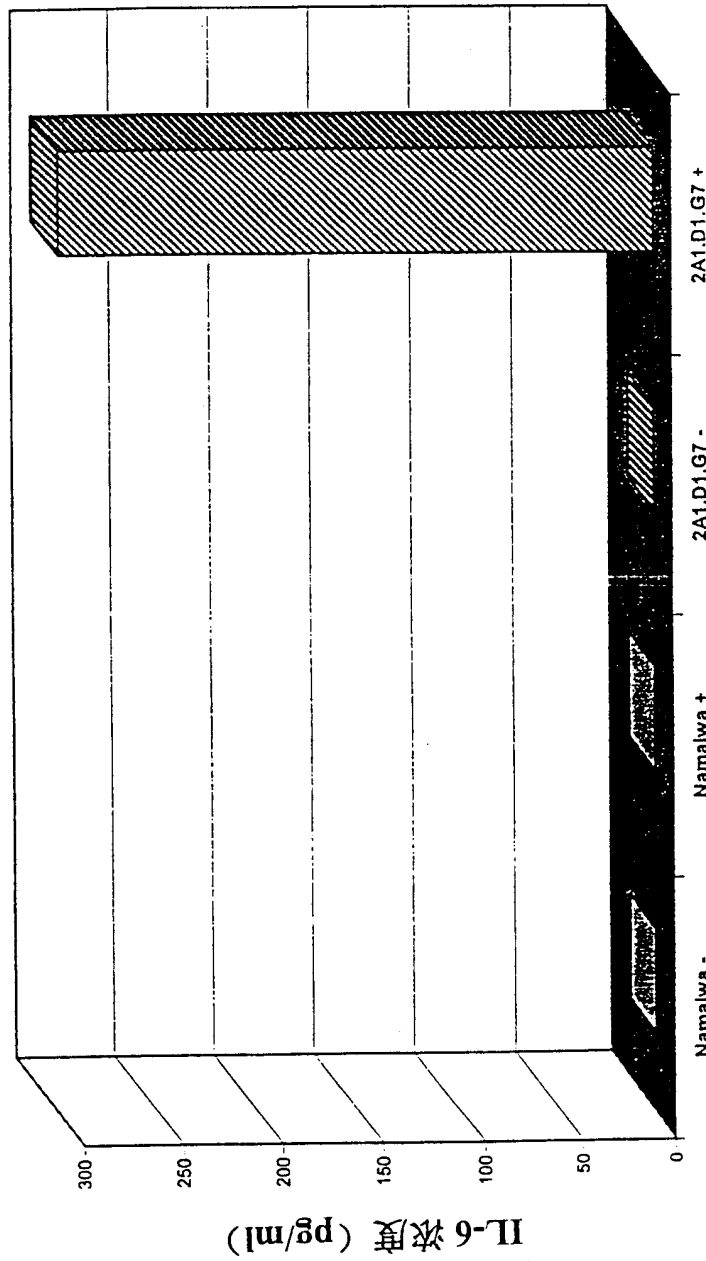
TNF- β 在多种条件下的产生情况见图 3。在这个实验中，在不存在引发剂和诱导剂时，亲代 Namalwa 和 2A1.D1.G7 均不产生 TNF- β 。然而，在引发和诱导后，亲代 Namalwa 细胞产生出大约 800 pg/ml 的 TNF- β ，而 2A1.D1.G7 细胞系产生出高于 2000 pg/ml 的 TNF- β 。在用 PMA 和 poly r(I):poly r(C)处理后，过表达 PKR 的细胞系比亲代细胞系又一次产生出更多的细胞因子（大约提高了 2.5 倍）。另外，过表达 PKR 的其它几个克隆化的细胞系，在 PMA 和 poly r(I):poly r(C)处理后，产生高于 2000 pg/ml 的 TNF- β （数据未给出）。

本文所给出的结果表明，本发明提供了用于在哺乳动物细胞培养物中增强细胞因子产生的有效方法。



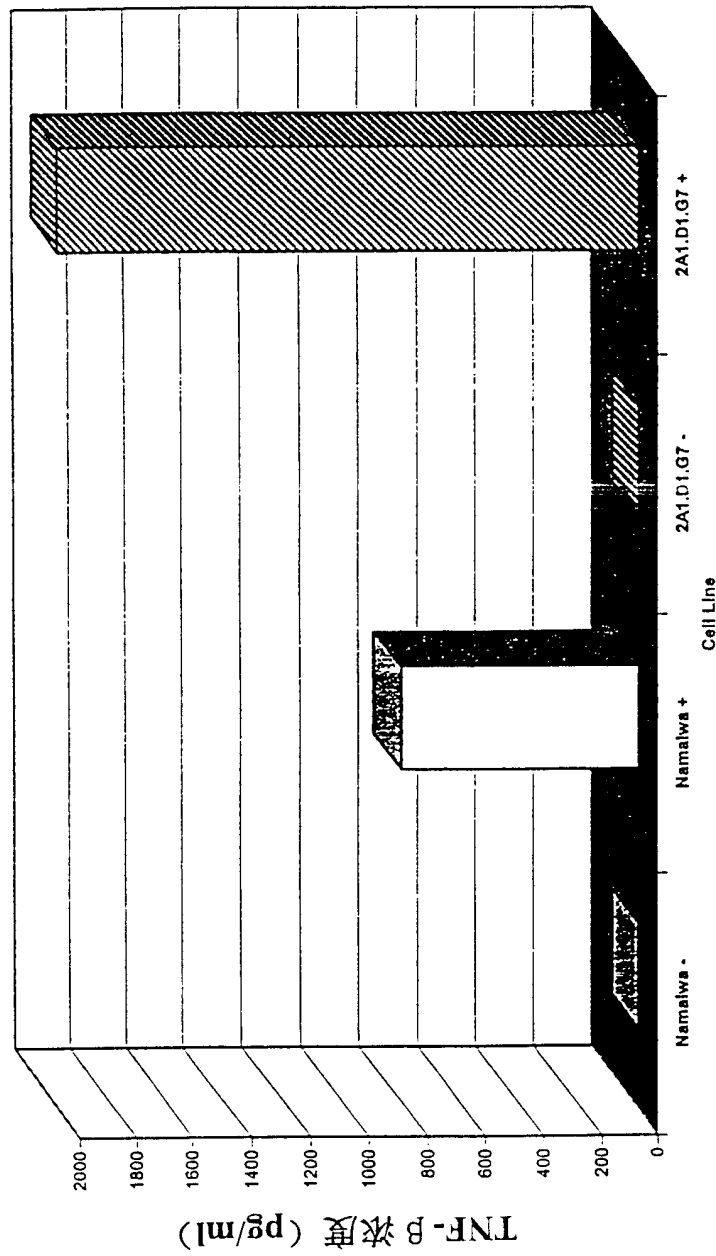
细胞系

图 2



细胞系

图 1



细胞系

图 3