

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

[12] 发明专利说明书

C07K 14/53
C12N 15/27
C12N 15/70 C12P 21/02
A61K 38/19

[21] ZL 专利号 97123162.1

[45] 授权公告日 2001 年 2 月 14 日

[11] 授权公告号 CN 1061992C

[22] 申请日 1997.11.19 [24] 颁证日 2000.12.29
 [21] 申请号 97123162.1
 [73] 专利权人 蒋永平
 地址 536000 广西壮族自治区北海市怡海新
 地苑别墅 23 栋
 共同专利权人 戴 卫
 [72] 发明人 蒋永平 戴 卫
 [56] 参考文献
 CN1132527 1996.10.2 C12N15/27
 CN86106815 1987.9.9 C12N15/00
 审查员 黄 赤

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所
 代理人 徐 迅

权利要求书 1 页 说明书 10 页 附图页数 4 页

[54] 发明名称 新的重组人粒细胞集落刺激因子及其药物组合物

[57] 摘要

本发明公开了新的重组人粒细胞集落刺激因子(rhG-CSF),它在序列的 N 端添加了 3—6 个氨基酸残基,且其中至少一个氨基酸残基是精氨酸;更佳地,在 N 端添加包含序列为甲硫氨酸-精氨酸-谷氨酸-丝氨酸在内的 4—6 个氨基酸;最佳地,在 N 端添加序列为甲硫氨酸-精氨酸-谷氨酸-丝氨酸的 4 个氨基酸。本发明的新型重组蛋白的活性有显著提高,而且稳定性明显提高。还提供了有关序列、表达载体、宿主细胞和药物组合物。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

- 1.一种重组的人粒细胞集落刺激因子，其特征在于，它在序列N端添加4-6个氨基酸，且该4-6个氨基酸包含序列：甲硫氨酸-精氨酸-谷氨酸-丝氨酸。
- 5 2.如权利要求1所述的重组人粒细胞集落刺激因子，其特征在于，该因子在N端添加的氨基酸序列是甲硫氨酸-精氨酸-谷氨酸-丝氨酸。
- 3.如权利要求1或2所述的重组人粒细胞集落刺激因子，其特征在于，该因子第17位上的半胱氨酸被丙氨酸所取代。
- 4.一种表达载体，其特征在于，它含有编码权利要求1所述的重组人粒细胞集
10 落刺激因子的核酸序列。
- 5.一种表达如权利要求1所述的人粒细胞集落刺激因子的宿主细胞，其特征在于，它是大肠杆菌。
- 6.如权利要求5所述的宿主细胞，其特征在于，它是 E.coli M15(G-CSFa),
CCTCC No. M97022。
- 15 7.一种药物组合物，其特征在于，它包括有效量的权利要求1所述的重组人粒细胞集落刺激因子和药学上可接受的载体或赋形剂。
- 8.如权利要求7所述的药物组合物，其特征在于，它是冻干粉剂或水剂。

说明书

新的重组人粒细胞集落刺激因子及其药物组合物

5 本发明涉及蛋白质重组领域。更具体地，涉及对人粒细胞集落刺激因子(hG-CSF)的重组改造。此外，本发明还涉及有关的表达载体、生产重组人粒细胞集落刺激因子的工程菌和含有该重组人粒细胞集落刺激因子的药物组合物等方面。

10 集落刺激因子(CSF)是一类生物体内产生的蛋白质分子，它们能刺激体内造血细胞的增殖分化，提高造血功能和免疫功能。已发现有多种类型的CSF，主要包括巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)等。

15 人粒细胞集落刺激因子(Human Granulocyte Colony Stimulating Factor, hG-CSF)是由人体的内皮细胞、单核细胞、巨噬细胞和成纤维细胞等所分泌的一种糖蛋白。它由174个氨基酸组成，并在133位氨基酸上连有一糖链。其主要功能是：促进造血干细胞向中性粒细胞分化、成熟，并增强其吞噬功能。

20 在中国专利申请CN 86 106234(申请人为柯瑞英-艾格公司,又译为安进(Amgen)公司)中，公开了粒细胞集落刺激因子的核苷酸序列和氨基酸序列，以及有关的载体、转化细胞和多肽。该申请还对G-CSF的17、36、42、64和74位上的半胱氨酸残基进行置换，公开了突变体[Ala¹]G-CSF、[Ser¹⁷]G-CSF、[Ser³⁶]G-CSF、[Ser⁴²]G-CSF、[Ser⁶⁴]G-CSF、[Ser⁷⁴]G-CSF等突变形式。该文献在此引用作为参考。

25 此外，在中国专利申请CN 86106815(申请人为日本中外制药株式会社)中，公开了具有人G-CSF活性多肽的基因、插入该基因的重组载体、含该载体的转化体、由转化体产生的具有G-CSF活性的多肽和糖蛋白，以及生产具有人G-CSF活性的多肽和糖蛋白的方法。该文献在此引用作为参考。

30 在安进公司的中国专利申请CN 94191031中，发明名称为“G-CSF类似物组合物及其制备方法”，公开了编码多种G-CSF类似物的核酸序列、宿主细胞、载体。还公开了设计G-CSF类似物及相关组合物的方法。该文献在此引用作为参考。

自发现G-CSF以来，安进公司和日本中外制药株式会社等公司分别利用重组技术，开发出了多种G-CSF产品。其产品具有与天然G-CSF相同的生物活性，

已广泛应用于治疗各种原因尤其是肿瘤化疗和放疗引起的中性粒细胞减少、再生障碍性贫血等症状，并在提高骨髓移植及外周血干细胞移植成功率等方面起到了极其重要的作用。

但是，已有技术中的 G-CSF 的生物活性较低，或者虽然生物活性有所提高，但仍难以满足要求。因此迫切需要一种活性高的 G - CSF 重组蛋白。

此外，已有技术中的 G-CSF 稳定性较差。因为 G-CSF 样品的药效不稳定，所以目前只有水剂型，其运输、储存都要求在 4℃ 进行。

因此，本发明的目的是克服已有技术中上述缺点，提供一种生物活性高和/或稳定性好的重组人粒细胞集落刺激因子。

10 本发明的目的之一是提供一种新的 G-CSF 突变体，其活性更高。

本发明的目的之二是提供一种新的 G-CSF 突变体，它不仅活性更高，而且稳定性更好，从而可以被制成冻干粉剂。

本发明的目的之三是提供一种含有编码该 G-CSF 突变体的核酸序列的表达载体。

15 本发明的目的之四是提供一种产生新型 G-CSF 突变体的宿主细胞，它所产生的 G-CSF 具有更高的活性和/或更高的稳定性。

本发明的目的之五是提供一种含有该新型 G-CSF 的药物组合物。

图 1 是本发明的 G-CSF 突变体以及天然 G-CSF 的 cDNA 序列。其中上行是与天然 G - CSF 不同的、突变体的 cDNA 序列；下行是与天然 G-CSF 相同的 cDNA 序列。其中在天然 G-CSF 核苷酸序列 5'端 ATG 前添加了 ATG AGA GGA TCC。

图 2 是本发明的一种 G-CSF 突变体的氨基酸序列以及天然 G-CSF 的氨基酸序列。其中在上行粗体部分是与天然 G - CSF 不同的、突变体的氨基酸序列；下行是与天然 G-CSF 相同的氨基酸序列。其中在天然 G-CSF 氨基酸序列 N 端添加了 Met Arg Gly Ser 和/或在 17 位用 Ala 替换 Cys。

图 3 是重组 G-CSFa 的 PCR 克隆及表达载体构建过程的示意图。

图 4 是本发明的一种重组蛋白 G-CSFa 与国外产品的活性比较图

30 本发明的发明人经过多年研究发现，通过在 G-CSF 的 N 端添加包含精氨酸在内的氨基酸残基，可以提高重组人粒细胞集落刺激因子的活性和/或稳定性。这是因为精氨酸是带有正电荷的氨基酸，将其添加在 G - CSF 的 N 端，可提高重组 G - CSF 与细胞上相关受体(或细胞因子)的结合。

在这一发现的基础上，本发明人完成了本发明。

因而，本发明提供了一种重组的人粒细胞集落刺激因子，它在序列的 N 端添加了 3-6 个氨基酸残基，且其中至少一个氨基酸残基是精氨酸。更佳地，在序列 N 端添加 4-6 个氨基酸，且该 4-6 个氨基酸含有序列：甲硫氨酸-精氨酸-谷氨酸-丝氨酸。

在本发明的一个最佳实施例中，所提供的重组重组人粒细胞集落刺激因子在 N 端添加甲硫氨酸-精氨酸-谷氨酸-丝氨酸，和/或第 17 位上的半胱氨酸被丙氨酸所取代。

本发明还提供了含有编码上述重组人粒细胞集落刺激因子的核酸序列的表达载体，以及含有该表达载体的宿主细胞。

本发明还提供了一种药物组合物，它包括有效量的上述的重组人粒细胞集落刺激因子和药学上可接受的载体或赋形剂。更佳地，该组合物是冻干粉剂或水剂；最佳地，该组合物是冻干粉剂。

经本发明人的研究表明，尽管确切的机制还不清楚，但是通过在 G-CSF 的 N 端添加带正电荷的精氨酸残基，可以提高重组 G-CSF 与相关的细胞受体的结合和/或作用，从而提高重组 G-CSF 的药效。

在此基础上，本发明对天然和或重组的 G-CSF 的 N 端进行了修饰，即在 G-CSF 序列的 N 端添加了 3-6 个氨基酸残基，且其中至少一个氨基酸残基是精氨酸。更佳地，在序列 N 端添加 4-6 个氨基酸，且该序列含有甲硫氨酸-精氨酸-谷氨酸-丝氨酸。

又根据本发明人及本领域其他研究人员的研究表明，G-CSF 的稳定性与半胱氨酸残基有关系。对于原序列中不参与形成二硫键的半胱氨酸，如 17 位的半胱氨酸，用其他氨基酸加以替换，尤其是用丙氨酸加以替换，可进一步提供重组 G-CSF 的稳定性。

因此，在本发明的一个最佳实施例中，所提供的重组人粒细胞集落刺激因子，它在 N 端添加了甲硫氨酸-精氨酸-谷氨酸-丝氨酸，而且第 17 位上的半胱氨酸被丙氨酸所取代。

除了在 N 端进行上述的氨基酸添加和/或 17 位氨基酸的替换之外，本领域的技术人员知道，还可对其他位置的氨基酸进行修饰，如取代、插入或缺失。对于取代，可用性质相近的氨基酸加以取代。较佳地，这种氨基酸取代是在下表 1 中同一组别(代表性的取代)中进行，最佳地这种取代是下表 1 中优选的取代。

表 1

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	val;leu;ile	val
Arg (R)	lys;gln;asn	lys
Asn (N)	gln;his;lys;arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro;ala	ala
His (H)	asn;gln;lys;arg	arg
Ile (I)	leu;val;met;ala;phe;正亮氨酸	leu
Leu (L)	正亮氨酸;ile;val;met;ala;phe	ile
Lys (K)	arg;gln;asn	arg
Met (M)	leu;phe;ile	leu
Phe (F)	leu;val;ile;ala;tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr;phe	tyr
Tyr (Y)	trp;phe;thr;ser	phe
Val (V)	ile;leu;met;phe;ala;正亮氨酸	leu

对 DNA 进行遗传修饰的技术总结于诱变：一种实用方法(Mutagenesis: a Practical Approach), M.J. McPherson, Ed., (IRL Press, Oxford, UK.(1991), 例如包

5 括定点诱变、盒式诱变和聚合酶链反应(PCR)诱变。该文献在此引用作为参考。
 可以通过 PCR 等方法, 获得天然的和/或重组的 G-CSF 核苷酸序列, 然后用各种本领域中熟知的诱变方法进行本发明所述的突变。本发明的一种 G-CSF 突变体的 DNA 序列在图 1 中列出。但是由于遗传密码的简并性, 所以可以制备许多
 10 种核苷酸, 它们都是能够指导合成本发明的重组 G-CSF。因此, 功能上与上述序列等价的 DNA 序列, 或者功能上与指导合成本发明重组 G-CSF 蛋白质类似物(按

照氨基酸序列产生的)的序列相等价的序列, 都被包括在本发明之内。

对于本发明的编码新型重组 G-CSF 的核酸, 通过限制性酶切, 然后与质粒片段连接, 可以被克隆入合适的载体如质粒中。对于选用的质粒, 没有特别的限制, 只要它能在选用的宿主细胞中复制和表达重组的 G-CSF。

5 当然, 该重组蛋白的编码序列也可整合如宿主细胞的基因组中。

含有编码新型重组 G-CSF 的核酸的质粒, 一般含有合适的启动子、增强子等调控元件, 以及合适的选择基因(如抗生素抗性基因, 比如氨苄青霉素抗性基因; 或营养缺陷型基因), 这些都是本领域中熟知的。可参见 Sambrook 等人, 分子克隆: 实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。

10 携带本发明的重组 G-CSF 编码序列的表达载体, 可用本领域熟知的方法, 如电穿孔、共转染法等, 转入合适的宿主细胞。宿主细胞可以是原核生物或真核生物, 如大肠杆菌、枯草杆菌、昆虫细胞、CHO 细胞等。但是较佳地是大肠杆菌。

在转化之后, 用常规方法筛选出转化子。并根据所用的宿主细胞和表达载体, 用本领域常规使用的培养基和培养条件来培养转化的细胞, 从而表达重组的 G-
15 CSF。

在转化的宿主细胞表达本发明的重组 G-CSF 之后, 如果重组蛋白被分泌入培养基中, 可以直接从培养基中分离纯化出重组蛋白。如果重组蛋白是以包涵体形式被表达, 那么可从培养物中, 通过裂解细胞、分离、提纯等步骤获得所需的重组蛋白。这些步骤和方法都是本领域中熟知的, 可参见例如 Sambrook 等人, 分子克隆: 实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)。
20

本发明还提供了一种药物组合物, 它包括有效量的本发明的重组人粒细胞集落刺激因子和药学上可接受的载体或赋形剂。至于载体和/或赋形剂, 可以在制备 G-CSF 药品中所采用的常规载体和/或赋形剂中加以选择。例如与水等制成水剂。

但是, 如上所述, 本发明的重组 G-CSF 不仅药效显著提高, 而且稳定性也有
25 明显提高, 因此本发明的药物组合物除了被制成本领域中常见的水剂之外, 还可被制成冻干粉剂, 从而便于运输和储存。

下面结合实施例进一步阐述本发明。在本申请中, 所用的术语和缩写是本领域中技术人员通用的术语和缩写。

30 实施例 1

G-CSF 突变体 cDNA 的制备

从中国人体单核细胞中提取 mRNA, 用标准 RT-PCR 技术制备 G-CSF 的

cDNA. PCR 中所用引物为:

上游引物: 5' TGG ATC CAT GAC CCC CCT GGG CCC 3'

下游引物: 5'TAA GAT CTC AAG CTT TCA GGG CTG CGC AAG GTG GCG
TA 3'

5 这对引物有如下特点: 上游引物含 BamHI 内切酶位点(GGATCC), 下游引物含有 HindIII 位点(AAGCTT)和 BglII 位点(AGA TCT). 引入这些内切酶位点(粗体部分)是为了便于随后的克隆操作.

扩增出的序列与原序列相比, 在 5'端增加了 ATG AGA GGA TTC 12 个碱基, 而 3'端序列中以 TGA 为终止密码子. 再利用诱变技术将原序列第 49-51 位碱基由
10 TGC 改为 GCC.

实施例 2

转化大肠杆菌

将 560bp 的 PCR 扩增产物, 用 Genclean System 洗脱. 然后用 Bam HI 和 HindIII
15 在 37 °C 消化 2 小时. 消化产物用苯酚/氯仿抽提, 用 100%酒精沉淀, 沉淀物用 70%酒精洗涤一次. 然后将此消化产物与事先用 Bam HI 和 HindIII 消化的 pQE3 载体在 16 °C 进行连接反应过夜. 将连接产物 pQE3-G-CSF 转染大肠杆菌 M15 和 JM109 感受菌. 然后接种于含抗生素的 LB 平板上. M15 大肠杆菌宿主细胞用于 rhG-CSF 的高表达, 而 JM109 宿主细胞用于对克隆的 G-CSF cDNA 结构进行特征
20 鉴定.

通过对转化后 JM109 宿主细胞中 G-CSF 序列的鉴定, 证实与设计是一致的.

同时, 从转化的 M15 大肠杆菌中筛选出一种转化的大肠杆菌 E.coli M15(G-CSFa), 该菌株于 1997 年 10 月 18 日保藏在中国典型培养物保藏中心(CCTCC, 中国武汉市), 保藏号为 No. M97022.

25

实施例 3

重组人粒细胞集落刺激因子突变体(G-CSFa)的生产

1、生产菌程(工业菌株)的制备检定

从菌种库(-80 °C 的超低温冰箱内)中取 G-CSFa 生产菌种 E.coli M15(G-CSFa),
30 划 LB 平板(在无菌超净工作台内进行)二块. 接种后在 37 °C 的恒温箱中培养 18 小时, 挑选 4 个菌落, 分别接种在含有 3ml LB 培养液的试管里, 在自动摇床 (G-25KC, New Brunswick Scientific, Inc. U.S.A)摇动培养 14 个小时(37 °C). 此

时测得该菌液在 600nm 吸收峰为 0.8,然后每试管中加 IPTG,使最终浓度为 0.5mM 继续培养 3 小时, 从每试管中取等量 1ml 菌液离心, 用 15% SDS-PAGE 检测 G-CSFa 的表达量。

5 2、种子液的准备

选上述 G-CSF 表达最高的为种子液培养。培养基选用 TYP, 该配方是每升含 16 克 Bacto-豚, 16 克 Bacto-酵母提取物、5 克氯化钠、2.5 克磷酸氢二钾和 5 克葡萄糖。在 250 毫升的 TYP 接种上述单一菌落的 G-CSFa 菌种, 250 转/分钟, 37 °C 培养 12 个小时, 该种子液共 500 毫升作进一步发酵使用。

10

3、工业化发酵

供工业发酵的发酵装置购自美国 New Brunswick Scientific 公司, 型号 Bio-Fol5000, 40 升。

15 工业发酵液: 上述的种子液是进一步工业发酵液的母液。配制 35 升 TYP 培养液于 Bio-Flo5000 的发酵罐内, 同时加入 20ml 的消泡剂(anti-foam M-10,Hodag Chemical Corp Skokie, Illinois, U.S.A.), 然后进行自身高温(121 °C 和 1.2kg/cm² 的压力下)灭菌 30 分钟。当冷却到 37 °C 后, 在 37 °C 中过夜, 第二天检查培养液为澄清, 无污染。

20 将准备好的 500 毫升 G-CSFa 种子液接种到 35 升的培养液中, 发酵条件温度为 37 °C, 转速 500rpm, pH7.0, 空压 0.14kg/cm², 通氧量 15L/min, 溶氧 100%。4 小时后加入 7 克 IPTG, 再加入 10 毫升消泡剂, pH 值用氨水调节。

4、收菌

25 用工业化连续性自动离心机(CEPA A14/)收集菌体, 10,000g, 4 °C, 测定菌体重量。

5、G-CSFa 包涵体的提取与粗纯化

(1)细胞的裂解

30 将约 40 克的菌体悬浮在 0.8 升的提取液 A(50mM T-HCl 5mM EDTA pH8.0) 中, 然后再加 200 毫升含有 250 毫克的裂解酶(Lysozyme)的提取液 A, 在室温下搅拌 10 分钟, 此时, 提取液的粘度大大增加, 表明细菌已裂解。

(2)离心和清洗

裂解液离心条件为 10,000g × 10 分钟, 4 ℃, 收取沉淀的包涵体, 均匀地悬浮于 50mM 的磷酸缓冲液(含 0.15M 的氯化钠和 4M 尿素, pH7.0), 离心后的沉淀加 10ml 上述缓冲液(W/V=1/10), 收集包涵体, 计算回收率。

5 用不同浓度的尿素洗涤包涵体。使包涵体滤液浮于尿素中, 离心 10 分钟, 结果表明用 4M 尿素洗涤可最大提高包涵体样品中 G-CSFa 的纯度, 而且包涵体丢失少。

此外, 优选采用的裂介酶是水溶性的, 因为包涵体是不溶性的。这样, 用此方法得到 G-CSFa 包涵体及以后在精制过程中 G-CSFa 便可最大限度地降低该酶造成残余污染的可能性。

10

6、G-CSFa 蛋白的复性、粗纯与精纯化

(1) G-CSFa 蛋白的复性

15 经过上述纯化的 G-CSFa 是一种无生物学活性和非水溶性的蛋白。该蛋白需要经过一系列构象转化的处理, 使之成为可溶性且具有生物活性的 G-CSFa 蛋白, 这一过程为 GCSFa 蛋白复性。

20 具体方法步骤为: 取上述纯化的包涵体 10 克, 溶于 2000 毫升含有 6M 盐酸胍, 20ml DTT, 20mm EDTA 的 0.1M Tris-HCl 的缓冲液, pH7.5, 在室温中搅拌 1 小时, 然后离心 30 分钟(10,000g)。取上清液, 超滤浓缩, 将含有 G-CSFa 的上清液通往直径 4cm, 柱长 1.2 米(床体积 1.5 升)的 Sephadex G-25 层析柱。该柱用盐
25 酸胍, 20mM EDTA(pH7.0)溶液平衡。整个层析过程在 Bio-Pilot 纯化系统 (Pharmacia Biotech, INC, U.S.A.)上进行, 流速为 40 毫升/小时, 用 UV-280NM 分光光度计和 SDS-PAGE(15%)检测 G-CSF 蛋白峰, 收集 G-CSFa 蛋白。然后将该溶液用 1M 的盐酸胍稀释到蛋白浓度为 0.3mg/ml, 并透析于含 0.5M 盐酸胍、20mM EDTA、0.01%吐温 80 和 40mM 醋酸钠(pH5.4)缓冲溶液中, 每隔 8 小时换一次新配的磷酸钠缓冲液, 总共清换三次, 上述透析过程都在 4 ℃ 的活动冷库中进行。

将透析后的 G-CSFa 粗纯溶液 4 ℃ 离心 30 分钟(10,000g)并取上清液。检测复性蛋白, 并计算复性率, 复性率=复性蛋白/包涵体湿重。

(2)浓缩与精纯化

30 在活动冷库(4 ℃)中, 用浓缩超滤器(Minnitan, Millipore Corp. MA, U.S.A.)将上述的 G-CSFa 上清液进行浓缩, 浓缩到 300ml, 浓缩的 G-CSFa 进一步用 60 毫升 CM-Sephadex 的正离子交换树脂纯化。该柱在 20mM 的醋酸钠(pH5.4)缓冲液

中平衡, 然后用 0.125M 的氯化钠溶液洗脱 G-CSFa, 浓缩后上样于柱直径 6 厘米, 柱长 1.0 米(床体积分 1.7 升)的 Superdex75 层析柱. 该柱在 10mM 的醋酸钠, pH4.0 0.004%吐温的溶液中平衡. 整个柱层析纯化过程在 Pharmacia Biotech 的 Biopilot 纯化装置上进行, 流速 500ml/小时. 用 UV-280nm 分光光度计检测 G-CSFa 的峰
5 值, 并结合 SDS-PAGE(15%)分析法测定每管的 G-CSFa 的纯度.

实施例 4

含 G-CSFa 的药物组合物

(1)去内毒素与除菌

10 将实施例 4 中获得的 G-CSFa 精制品通过 20ml 的 polymyxin 柱(Bio-Rad), 缓冲液为 10mM NaAc, pH4.0,收集过滤液, 在 pH4 的 10mM NaAc 缓冲液中透析, 然后用 0.22u 滤膜除菌.

(2)成品制剂的配制与分装

15 (i) 水剂: 每 75ug G-CSFa 蛋白与 10mM 乙酸钠、0.004%吐温 80、5% D-甘露醇混合, 配制成注射用成品, 每支安瓿分装 0.3ml.

(ii) 冻干粉剂: 按常规方法, 将 G - CSFa 制成冻干粉剂, 剂量为 100 微克/剂.

实施例 5

20 G-CSFa 的药效和稳定性测定

对于实施例 4 中获得的 G-CSFa, 委托美国哈佛大学及辛辛那提医学院, 用 G-CSF 鉴定细胞株 NFS60, 对该变异体进行鉴定. 结果示于图 4, 图中 ED₅₀ 是半数有效浓度, 即 50%细胞增长的药物浓度. ED₅₀ 数值越小, 则药物作用越强. 结果表明, 本发明的突变体 G-CSFa, 与市售的国外产品 G-CSF(惠尔血)相比, 药
25 效提高 10 倍以上(即本发明的突变体的 ED₅₀ 是惠尔血的 1/10).

根据中国科学院上海药物研究所和上海医科大学药物研究中心完成的药代动力学、药效学及急性毒理等鉴定结果表明: 本发明的 G-CSFa 水剂和市场上的标准水剂型(惠尔血)相比, 对人体骨髓细胞和小鼠粒细胞的提升分别提高 8 倍和 6 倍. 对于化疗后的猴子试验中所采用的 3 个浓度(2、10 和 50 微克/千克), 本发
30 明的 G-CSFa 水剂比标准样品(惠尔血)高得多.

在小鼠身上, 使用 600 倍正常剂量的本发明 G-CSFa, 结果无一小鼠发生过敏反应或死亡.

因此，这些结果表明，本发明的 G-CSFa 比已有技术中的相同产品具有更显著的疗效。

此外，本发明的 G-CSFa 的稳定性也有进一步显著提高。由于 G-CSF 药品的药效不稳定，所以目前国际市场上只有水剂型，且运输和储存均要求在 4℃ 进行。而本发明的 G-CSFa 可制成冻干粉剂，从而大大有利于 G-CSF 药物组合物的运输和储存，并延长了药物的保质有效期。

用细胞株上进行鉴定，该冻干粉剂的药效比标准 G-CSF 的水剂型高 4 倍，在猴子身上的药效与标准 G-CSF 相当。

10 尽管本发明是结合本发明的最佳实施例进行描述的，但是本领域的技术人员知道，可在所附权利要求限定的范围内对本发明进行各种改动或修饰，这些改动或修饰形式同样落于本发明范围内。

说明书附图

ATG AGA GGA TCC
GCC ATGACCCCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCT
CAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAG
CTGTGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTCGGACACTCTCT
GGGCATCCCCCTGGGCTCCCCCTGAGCTCCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCT
GCTTGAGCCAACTCCATAGCGGCCTTTTCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAA
GGGATATCCCCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTGCGCGACTT
TGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAAGTGGGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCCA
CCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCTTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCTTG
GTTGCTAGCCATCTGCAGAGCTTCCTGGAGGTGTGTAACCGCGTTCTACGCCACCTTGCG
CAGCCCTGA

图 1

1
Met Arg Gly Ser

1	Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	Cys	Ala	Leu	Gln	20
	Val	Arg	Lys	Ile	Gln	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu	Gln	Glu	Lys	Leu	Cys	Ala	Thr	Tyr	Lys	40
	Leu	Cys	His	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Leu	Leu	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro	60
	Leu	Ser	Ser	Cys	Pro	Ser	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu	Ala	Gly	Cys	Leu	Ser	Gln	Leu	His	Ser	80
	Gly	Leu	Phe	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu	Gly	Ile	Ser	Pro	Glu	Leu	Gly	100
	Pro	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Gln	Leu	Asp	Val	Ala	Asp	Phe	Ala	Thr	Thr	Ile	Trp	Gln	Gln	120
	Met	Glu	Glu	Leu	Gly	Met	Ala	Pro	Ala	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Ala	Met	Pro	Ala	Phe	140
	Ala	Ser	Ala	Phe	Gln	Arg	Arg	Ala	Gly	Gly	Val	Leu	Val	Ala	Ser	His	Leu	Gln	Ser	Phe	160
	Leu	Glu	Val	Ser	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg	His	Leu	Ala	Gln	Pro							

1
2
1

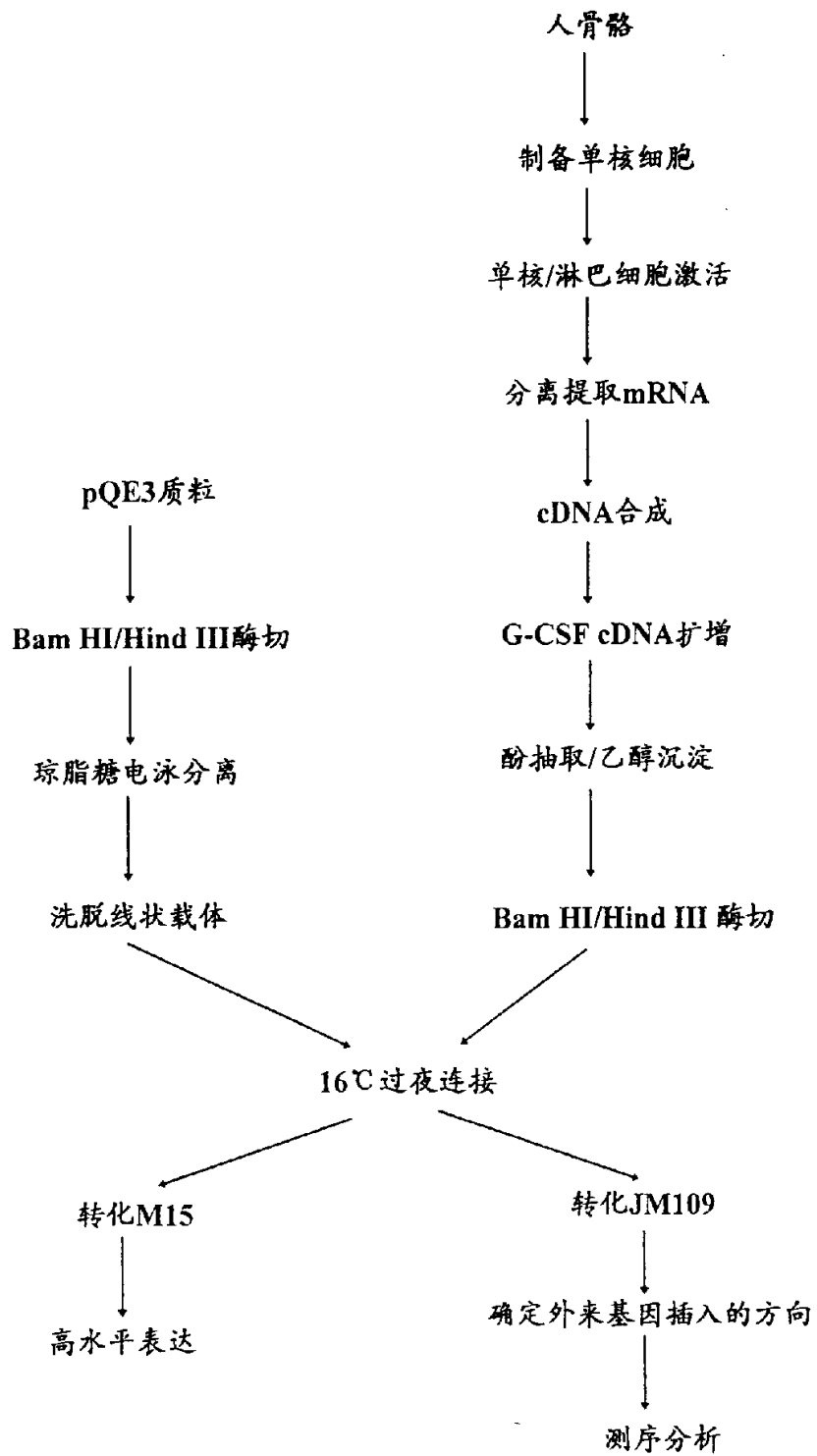


图 3

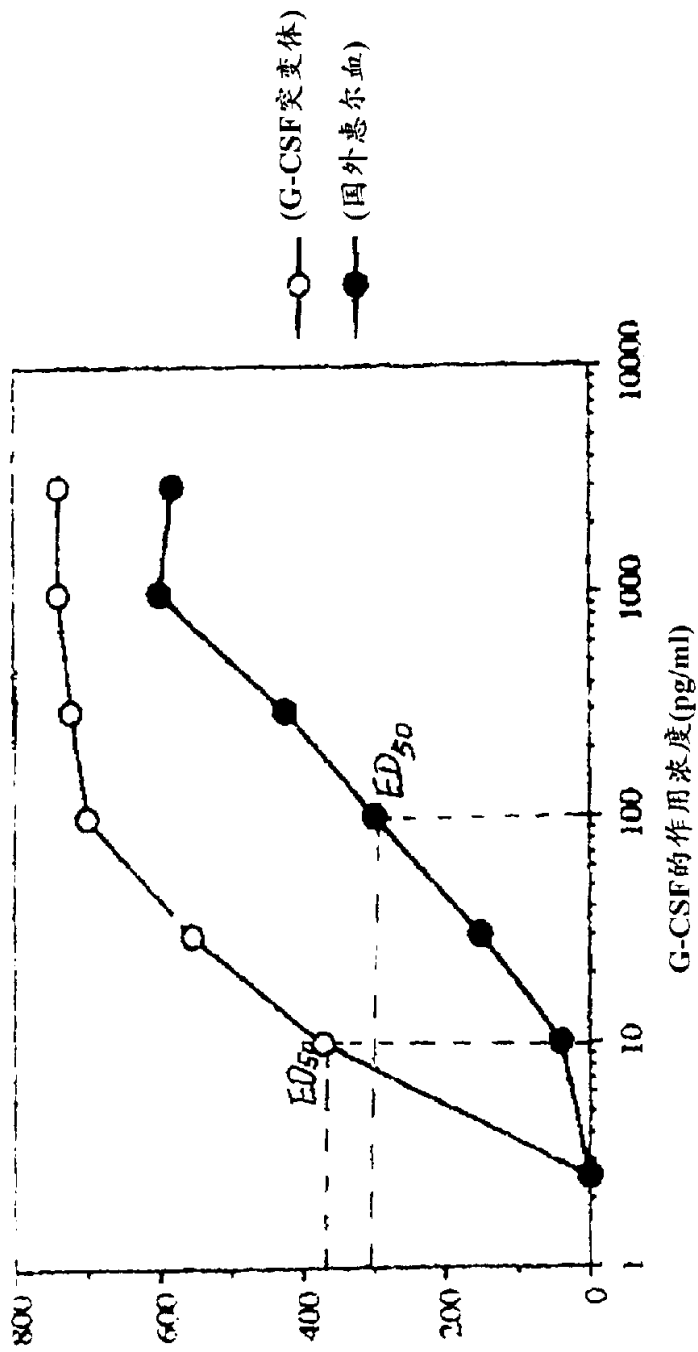


图 4