

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02821690.3

[51] Int. Cl.

C12N 15/65 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

C07K 14/505 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 11 月 7 日

[11] 授权公告号 CN 100347306C

[22] 申请日 2002.10.29 [21] 申请号 02821690.3
[30] 优先权
[32] 2001.10.29 [33] NL [31] PCT/NL01/00792
[32] 2002.4.19 [33] NL [31] PCT/NL02/00257
[86] 国际申请 PCT/NL2002/000686 2002.10.29
[87] 国际公布 WO2003/038100 英 2003.5.8
[85] 进入国家阶段日期 2004.4.29
[73] 专利权人 克鲁塞尔荷兰公司
地址 荷兰莱顿
[72] 发明人 迪尔克·扬·埃尔贝特斯·奥普斯泰
尔滕
约翰·克里斯蒂安·卡普坦
彼德鲁斯·克里斯蒂安纳斯·约翰内
斯·约瑟夫斯·帕西耶

罗纳德·亨德里克·彼得·布鲁斯
亚伯拉罕·布特

[56] 参考文献

WO9844141A2 1998.10.8

US5789247A 1998.8.4

WO0063403A2 2000.10.26

Biotination of Proteins in vivo. John E. Cro-
nan. The Journal of Biological Chemistry, Vol. 265
No. 18. 1990

审查员 刘红霞

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 林晓红

权利要求书 4 页 说明书 72 页 附图 42 页

[54] 发明名称

生产具有预定的翻译后修饰的蛋白质的方法
和手段

[57] 摘要

本发明提供了鉴别、选择及获得能生产包含预定翻译后修饰的蛋白质分子的哺乳动物细胞的方法，其中所述翻译后修饰是表达所述蛋白质分子的哺乳动物细胞完成的。优选地，所述预定翻译后修饰包含糖基化。本发明还提供了施用通过本发明方法可获得的哺乳动物细胞获得和生产蛋白质分子的方法。优选所述蛋白质分子包含促红细胞生成素(EPO)，因为(重组)EPO的作用主要依赖于蛋白质上存在的寡糖的糖基化模式。本发明还提供了基于其生产的蛋白质和/或翻译后修饰的能力而获得的哺乳动物细胞，其中预定的翻译后修饰是所希望的。优选地，所述哺乳动物细胞具有神经特征和性质，由此可以生产携带“神经或脑型”性质的大量重组蛋白质。

1. 一种包含促红细胞生成素样分子的组合物, 所述促红细胞生成素样分子选自如下一组: 促红细胞生成素, 促红细胞生成素的一或多种突变蛋白和促红细胞生成素的一或多种衍生物, 所述组合物特征在于每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 2.2。

2. 权利要求 1 的组合物, 特征在于每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 2.6。

3. 权利要求 1 的组合物, 特征在于每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 2.7。

4. 权利要求 1 的组合物, 特征在于每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 3.6。

5. 权利要求 1 的组合物, 特征在于每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 4.1。

6. 权利要求 1 的组合物, 特征在于每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 5.7。

7. 权利要求 1—6 任一项的组合物, 其中所述促红细胞生成素样分子上 N 联聚糖主要是双触角结构。

8. 一种包含促红细胞生成素样分子的组合物的药物制剂, 所述促红细胞生成素样分子选自如下一组: 促红细胞生成素, 促红细胞生成素的一或多种突变蛋白和促红细胞生成素的一或多种衍生物, 其中所述促红细胞生成素样分子的组合物特征在于每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 2.2。

9. 权利要求 8 的药物制剂, 其中每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 2.6。

10. 权利要求 8 的药物制剂, 其中每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 2.7。

11. 权利要求 8 的药物制剂, 其中每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 3.6。

12. 权利要求 8 的药物制剂, 其中每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 4.1。

13. 权利要求 8 的药物制剂, 其中每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 5.7。

14. 用作药物的促红细胞生成素样分子的组合物, 所述促红细胞生成素样分子选自如下一组: 促红细胞生成素, 促红细胞生成素的一或多种突变蛋白和促红细胞生成素的一或多种衍生物, 其中所述促红细胞生成素样分子的组合物特征在于每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 2.2。

15. 权利要求 14 的组合物, 其中每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 2.6。

16. 权利要求 14 的组合物, 其中每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 2.7。

17. 权利要求 14 的组合物, 其中每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 3.6。

18. 权利要求 14 的组合物, 其中每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 4.1。

19. 权利要求 14 的组合物, 其中每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 5.7。

20. 促红细胞生成素样分子的组合物在制备用于治疗选自缺血、再灌注损伤、缺氧引起的疾病、炎症疾病、神经变性疾病和中枢或周围神经系统的急性损害的一种疾病的药物中的应用, 所述促红细胞生成素样分子选自如下一组: 促红细胞生成素, 促红细胞生成素的一或多种突变蛋白和促红细胞生成素的一或多种衍生物, 其中所述促红细胞生成素样分子的组合物特征在于每个促红细胞生成素样分子 N 联

聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 2.2。

21. 权利要求 20 的应用，其中每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 2.6。

22. 权利要求 20 的应用，其中每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 2.7。

23. 权利要求 20 的应用，其中每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 3.6。

24. 权利要求 20 的应用，其中每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 4.1。

25. 权利要求 20 的应用，其中每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数目为至少 5.7。

26. 一种表达和纯化具有至少一个包含 lewis X 结构的 N 联聚糖的促红细胞生成素或其突变蛋白或衍生物的方法，所述方法包括：

a) 在表达编码腺病毒 E1A 的核酸的哺乳动物细胞中表达编码所述促红细胞生成素或其突变蛋白或衍生物的核酸，以及

b) 纯化所述促红细胞生成素或其突变蛋白或衍生物，所述纯化包括将所表达的促红细胞生成素或其突变蛋白或衍生物与一种凝集素或者一种结合包含 lewis X 结构的 N 联聚糖的单克隆抗体结合的步骤。

27. 权利要求 26 的方法，包括将所表达的促红细胞生成素或其突变蛋白或衍生物与一种 AAL 凝集素结合的步骤。

28. 权利要求 26 或 27 的方法，其中在纯化期间所述促红细胞生成素或其突变蛋白或衍生物基于 lewis X 含量被分级分离。

29. 权利要求 26 或 27 的方法，其中所述哺乳动物细胞衍生自在欧洲动物细胞保藏中心以保藏号 96022940 保藏的细胞。

30. 权利要求 28 的方法，其中所述哺乳动物细胞衍生自在欧洲动物细胞保藏中心以保藏号 96022940 保藏的细胞。

31. 一种纯化具有至少一个包含 lewis X 结构的 N 联聚糖的促红细胞生成素或其突变蛋白或衍生物的方法, 所述方法包括将所述促红细胞生成素或其突变蛋白或衍生物与一种凝集素或者一种结合包含 lewis X 结构的 N 联聚糖的单克隆抗体结合的步骤。

32. 权利要求 31 的方法, 包括将所述促红细胞生成素或其突变蛋白或衍生物与一种 AAL 凝集素结合的步骤。

生产具有预定的翻译后修饰的蛋白质的方法和手段

发明领域

本发明涉及重组 DNA 技术领域。本发明还涉及蛋白质的生产。本发明更特别涉及重组蛋白质的生产，所述蛋白质用作药物制剂的治疗活性组分。本发明还涉及哺乳动物细胞系，所述细胞系经鉴别、选择和/或创建以重组生产蛋白质。本发明还涉及如此生产的蛋白质的应用。

发明背景

用于生产蛋白质的重组细胞表达系统是已知的。这些系统的范围包括从细菌，酵母和真菌至植物细胞，及从昆虫细胞至哺乳动物细胞。生产宿主和表达系统的选择一般依赖于这样的因素，如应用方便，培养成本，生长特性，生产水平及在无血清培养基上的生长能力。已知上述细胞表达系统在发挥翻译同时和翻译后修饰的能力方面也不同，所述修饰如折叠，磷酸化， γ -羧基化， γ -羟基化。尽管意识到重组表达系统的选择对表达的蛋白质的最后结构具有戏剧性的因果关系，但翻译后修饰一般在选择一给定蛋白质的合适表达系统时不起决定性作用。

近年来的研究更多地揭示了人体蛋白质的不同翻译后修饰的复杂性及其对在人体内的功能的潜在内涵。例如，最近的发现提示在血液发生的人蛋白质的差异糖基化模式（所谓的“血清型”修饰）与在脑脊液中发生的修饰（“脑型”修饰）不同。这种不同也许是设计有效的治疗剂的极为重要的关键问题。

通常地，人神经糖蛋白的特征在于其糖基化，在文献中将其称为

脑型糖基化(Margolis and Margolis 1989; Hoffmann et al. 1994)。与血清型糖基化蛋白(即在血液中循环的糖蛋白)相反,脑型糖基化蛋白特征性地具有复合型 N 联糖,其用附着于乳糖胺型触角(antenna)的 N-乙酰葡萄糖胺的 α -1,3-连接的岩藻糖修饰,从而形成 Lewis x 或唾液酸-Lewis x 结构(图 5)。有两种类型的 Lewis x 结构:一种具有末端半乳糖残基,一种具有末端 N-乙酰半乳糖胺(GalNac)残基。如果这些末端基团与唾液酸连接,则所述 Lewis x 结构称为唾液酸 Lewis x 结构。血清型和脑型寡糖之间的另一种不同是后者通常含有末端 N-乙酰葡萄糖胺和/或末端半乳糖,而且可以包括一个末端 N-乙酰半乳糖胺修饰,而血清型寡糖通常只含有很低量的这种结构。

一般在血清中循环的蛋白质上发现的寡糖通常含有大量半乳糖化结构。这意味着半乳糖与周围 N-乙酰葡萄糖胺连接,从而形成乳糖胺结构。该糖蛋白以此方式被保护免于肝网状内皮细胞和巨噬细胞中存在的 N-乙酰葡萄糖胺受体(即识别末端 N-乙酰葡萄糖胺的受体)胞吞(Anchor et al. 1978; Stahl et al. 1978)。血清型寡糖通常还含有末端唾液酸(也通常称为神经氨酸),其保护糖蛋白免于通过脱唾液酸糖蛋白受体而清除。这些清除机制特异性应用于血中循环的糖蛋白并可能在中枢神经系统(CNS)中缺乏(Hoffmann et al. 1994)。

本领域可获得生产包含“血清型”修饰的蛋白质的重组表达系统,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞和幼仓鼠肾(BHK)细胞。然而,为生产具有其它修饰如“脑型”修饰的蛋白质,还没有描述这类方便的系统。因此,需要考虑到治疗蛋白质上不同的翻译后修饰的表达系统。特别地,需要包含“脑型”翻译后修饰的蛋白质的有效表达系统。

具有这些特异性需要的蛋白质可以有益于治疗所有种类的疾病,包括与 CNS,周围神经系统和心脏组织相关的疾病。影响 CNS 的疾病包括不同种类的疾病如急性脑损伤,神经变性疾病及其它功能失调如癫痫,精神分裂症和情绪失调。可影响神经细胞和组织的其它病理

疾病是由于损伤所致，所述损伤可以是缺氧，癫痫发作，神经毒素中毒，多发性硬化，低血压，心脏骤停，辐射或低血糖所致。神经损伤也可以在手术程序如动脉瘤修复或肿瘤切除期间发生。

具有至少与翻译后修饰中的差异部分相关的不同作用的蛋白质例如是一种已知为促进红细胞生成素（EPO）的激素。EPO 是一种由于其在将造血干细胞分化为红细胞中的作用而闻名的蛋白质，其还具有一些其它功能，包括在神经组织中的功能。对 EPO 在 CNS 的发育中的作用已经有推测(Dame et al. 2001)。EPO 蛋白还已经在人婴儿和成年人的脑脊液(CSF)中检测到(Juul et al. 1997; Buemi et al. 2000)。存在于 CSF 中的 EPO 表现为在脑中局部产生，因为其不能穿过血脑屏障(Marti et al. 1997 ; Buemi et al. 2000)。EPO 表达的调节是组织特异性的，这进一步加强了这样的假想，即 EPO 具有组织特异性功能，其在脑和骨髓中功能不同(Masuda et al. 1999 ; Chikuma et al. 2000 ; Sasaki et al. 2001)。因此已推测 EPO 除了其造血功能之外，还可具有神经营养作用。神经营养因子是指体液分子，其作用于神经元影响其发育，分化，维持和再生(Konishi et al. 1993)。一些研究结果目前已经表明 EPO 可作为神经营养因子(例如 Sadamoto et al. 1998; Brines et al. 2000)。除了 EPO 对红细胞生成和神经保护的所述作用之外，对 EPO 的其它作用已经有描述，例如在内皮细胞和肌细胞中的作用。本领域已经根据该蛋白质上存在的寡糖的糖基化模式而充分确定了（重组）EPO 的作用。人 EPO 的 N 联寡糖由于其熟知的生物学活性而非常重要：其刺激红细胞生成(Takeuchi and Kobata 1991; Wasley et al. 1991; Tsuda et al. 1990; Morimoto et al. 1996; Takeuchi et al. 1989; Misaizu et al. 1995)。

在 EPO 的情况中，与在其它组织如脑中产生的 EPO（脑型）相比，还可以将在肾中产生及在血液中循环的这种蛋白质称为血清型 EPO（或“肾型”或“尿型” EPO）。本领域已经充分确定了血清型

EPO 的生产和纯化系统，重组生产的血清型 EPO 常规地并成功地用于例如患有低红细胞水平的患者中。本领域熟知这种重组 EPO 必须满足一种稳定的蛋白质的所有要求，可以在血流中循环足够的时间量以能诱导红细胞生成。通常地，基于 CHO 或 BHK 的细胞系统用于生产具有这些特性的 EPO。然而，得自这种生产和纯化系统的血清型 EPO 在治疗与中枢或周围神经系统相关的疾病以及在治疗与缺血/再灌注引起的疾病相关的疾病中相对无效。这是因为其糖基化模式不适于治疗这些疾病，还因为其强红细胞生成活性所致的红细胞数目增加(红细胞增多症)，在这些非造血病变中认为这种红细胞生成是非希望的副作用 (Wiessner et al, 2001)。因此，需要一种新的蛋白质如 EPO 的生产系统，其具有 EPO 分子的特征性特点，在脑或参与基于选择蛋白的转运或定向的组织中具有活性。另外，需要具有与血清型糖基化不同的翻译后修饰，优选具有脑型糖基化的蛋白质如 EPO 的药物可接受制剂，及需要提供这些制剂的有效生产和纯化系统。

在不同组织中具有不同糖基化模式从而提示不同糖基化模式的不同作用的蛋白质的另外一个例子是运铁蛋白，其在 CSF 中以脱唾液酸运铁蛋白形式大量产生，但在血清中不以这种方式出现(Van Eijk et al. 1983; Hoffmann et al. 1995)。

糖蛋白的一个称为选择蛋白的家族在缺血/再灌注损伤中的白细胞粘附于内皮的初始步骤中起重要作用。选择蛋白家族中有三个成员：P-选择蛋白，E-选择蛋白和 L-选择蛋白。选择蛋白具有一个凝集素结构域，其识别与之结合的糖蛋白配体的糖结构。寡糖中唾液酸 Lewis x 修饰在与选择蛋白的结合中可能有作用(Foxall et al. 1992)。一些研究已经表明选择蛋白和唾液酸 Lewis x 结构对缺血/再灌注模型中白细胞粘附的重要性。例如唾液酸 Lewis x 寡糖 Sle^x-OS 在猫缺血/再灌注模型中示出有心脏保护作用，使心脏坏死减少 83% (Buerke et al. 1994)。另外，专利申请 WO 02/38168 描述了包含唾液酸 Lewis x

结构的选择蛋白结合蛋白在治疗各种疾病中用作抗炎剂的应用。然而，还没有关于制备包含（唾液酸）Lewis x 聚糖的蛋白质的合适表达系统的描述。因此，需要一种蛋白质的重组表达系统，所述蛋白质具有预定的糖基化结构如（唾液酸）Lewis x 结构。更一般地，需要重组生产蛋白质的表达系统，所述蛋白质具有预定的翻译后修饰。

表及附图简述

表 I：可用于鉴定细胞的标记蛋白总览。

表 II：可用于表 1 所示一些标记蛋白的阳性对照组织。

表 III：用于鉴定 PER.C6™ 细胞系的标记蛋白的抗体的详细信息（供应商和目录号）。

表 IV：PER.C6™ 上标记蛋白的存在记录。

表 V：PER.C6™-EPO 和 Eprex 的 N 联糖的单糖组合物。

表 VI：观测到的由 N-聚糖酶 F 从在 DMEM 中由生产 EPO 的 PER.C6™ 克隆 P7 生产的 EPO 中释放的脱唾液酸 N-聚糖的分子离子的 MS 峰排布。同样质量(m/z)值在 Eprex 中也发现的峰以下划线示出并以黑体表示。

表 VII：观测到的由 N-聚糖酶 F 从在 DMEM 中由生产 EPO 的 PER.C6™ 克隆 P8 生产的 EPO 中释放的脱唾液酸 N-聚糖的分子离子的 MS 峰排布。同样质量(m/z)值在 Eprex 中也发现的峰以下划线示出并以黑体表示。

表 VIII：CHO 和 PER.C6™ 细胞中 FUT 活性。

表 IX：观测到的由 N-聚糖酶 F 从在 AAL 柱上分级分离以选择高和低岩藻糖含量的 EPO 中释放的脱唾液酸 N-聚糖的分子离子的 MS 峰排布。

表 X：生产 EPO 的 E1A. EPO 和 E1A.E1B.EPO HT1080 克隆的相对 E1A 表达和形态学情况。E1A 的表达数量通过 Western 印迹分

析确定。选择用*标记的克隆进行 EPO 生产分析。

表 XI: 从 HT1080/Epo 克隆 033, HT1080/E1A-EPO 克隆 008 及 HT1080/E1A.E1B-EPO 克隆 072 中获得的 EPO 的 N 联糖的质量分布图的相对存在情况. 使用 ExPASy's 计算机程序预测糖组分。表中示出了聚糖的触角 (antennae) 中存在的氨基己糖, 己糖和脱氧己糖数。

图 1: Eprex, P7-EPO (集合 A, B 和 C), P8-EPO (集合 A, B 和 C) 的 N 联糖的质谱图。(A) Eprex; (B) P7, 集合 A; (C) P7, 集合 B; (D) P7, 集合 C; (E) P8, 集合 A; (F) P8, 集合 B 及 (G) P8, 集合 C。

图 2: PER.C6TM-EPO 和 CHO-EPO 的唾液酸含量。

图 3: PE-R. C6TM-EPO 上存在的 Lewis x 聚糖结构。

图 4: 在 PER.C6TM细胞表面的 Lewis x 结构表达。

图 5: Lewis x 和唾液酸 Lewis x 结构的示意图。

图 6: PER.C6TM-EPO 和 Eprex 在体内对红细胞生成的作用。

图 7: 在未治疗的大鼠 (对照) 和治疗的大鼠中, 基于在再注入开始之后 24 小时使用 MRI 产生的 ADC 图 (图 7A) 和 T2 图 (图 7B) 的梗塞体积。

图 8: 在三个动物中经单次静脉内注射 150 eU 的 Eprex 之后, 在指定的时间点 Eprex 的浓度。

图 9: 在用于选择高和低岩藻糖含量的 AAL 柱上分级分离的 PER.C6TM EPO 的层析图。

图 10A: 来自 AAL 柱的级分 1—4 的 N 联糖的质谱。B: 在一个独立的实验中来自 AAL 柱的级分 4 的 N 联糖的质谱。

图 11: HT1080/EPO 克隆 033 (A) 和 HT1080/E1A.E1B. EPO 克隆 058 (B) 及 026 (C) 的图示。E1A 的表达由 Western 印迹分析示出 (D)。E1A 表达克隆具有扁平的形态。

图 12: 从 HT1080/EPO 克隆 033 和 HT1080/E1A.E1B 克隆 072

生产的 EPO 中释放的 N 联聚糖的 HPAEC-PAD 图。底部的线表示无电荷的(0)，单电荷的，双电荷的，三电荷的及四电荷聚糖的洗脱(分别为 1—4)。注意到克隆 072 朝向较少载荷的 N 联聚糖移动。

图 13: 由三个不同克隆生产的 EPO 的 Maldi-MS 分析(A)。所述克隆是 HT1080/EPO 克隆 033, HT1080/E1A-EPO 克隆 008 和 HT1080/E1A.E1B-EPO 克隆 072。后两个克隆示出更复杂的图式。

图 14: 对 HT1080/EPO 克隆 033, HT1080/E1A-EPO 克隆 008 和 HT1080/E1A.E1B-EPO 克隆 072 的 N 联聚糖进行的单糖分析中获得的图示。所示单糖(Fuc = 岩藻糖, GalN = N-乙酰半乳糖胺, GlcNac = N-乙酰葡萄糖胺, Gal = 半乳糖, Man = 甘露糖) 的比率参照甘露糖进行标准化。

图 15. 对用(B,D)或不用(A,C)岩藻糖苷酶处理的 HT1080/EPO 克隆 033 (A, B)和 HT1080/E1A. E1B-EPO 克隆 072 (C, D)产生的 EPO 进行 Maldi-MS 分析。只在衍生自克隆 072 的 EPO 聚糖图式中观测到不同。发现 m/z 值为-2039, -2185 和-1892 的峰明显改变 (C 和 D), 其极有可能表示含有触角脱氧己糖的推测结构减少。

图 16: 通过 IEF 分离的不同 EPO 制剂的各种同种型。EPO-同种型每分子含有 0—14 个唾液酸。应用以下样品(2000 eU/条带): Eprex (A); 神经氨酸酶处理的 Eprex (B); CHO-EPO, 总产量(C); PER.C6TM-EPO, 克隆 022 (D); frCHO-EPO (E)。

图 17: 用 5000eU/kg Eprex, frCHO-EPO, PER.C6TM-EPO 或者稀释剂缓冲液(对照)注射的大鼠的血细胞比容(HCR, 体积百分比)。与对照组, frCHO-EPO 和 PER.C6TM-EPO 相比, EPO 治疗的大鼠显示显著较高的 HCR ($p < 0.001$)。

图 18: 用 5000 eU/kg Eprex, frCHO-EPO, PER.C6TM-EPO 或者稀释剂缓冲液(对照)注射的大鼠血液中网织红细胞的百分比。与对照组相比, 经 EPO 治疗的大鼠显示显著较高的网织红细胞百分比($p <$

0.001)。经 Eprex 和 frCHO-EPO 治疗的大鼠的网织红细胞百分比均显著高于 PER.C6TM-EPO 治疗组($p < 0.001$)。

图 19: 在用 5000 eU/kg Eprex, frCHO-EPO, PER.C6TM-EPO 或者稀释剂缓冲液(对照)注射后 4 天, 总网织红细胞群的幼网织红细胞(IFR)百分比。与对照组, frCHO-EPO 或 PERC6-EPO 相比, Eprex 治疗的大鼠显示显著较高的幼网织红细胞百分比($p < 0.001$)。

图 20: PNGase F (标记为 F)和内切糖苷酶 F2 (标记为 F2)的切割位点。

图 21: 用 PNGase F (A)和内切糖苷酶 F2 (B)释放的 PER.C6TM-EPO-聚糖的 MALDI 谱。下部谱图的横坐标以两个谱中相应峰直接彼此在对方之上的这种方式排列(349 Da 差异, 见正文)。

图 22: N 末端聚糖的一些单糖键。

图 23: 该图的上部示出从 PER.C6TM-EPO 中释放的脱唾液酸化的聚糖, 下部数值是在半乳糖苷酶处理后的谱图中检测的。在括号之间是给定结构中反映的谱的总百分比。所述谱图示于图 26。

图 24: 该图的上部示出从与半乳糖苷酶温育的 PER.C6TM-EPO 中释放的脱唾液酸化的聚糖; 中部数值是在用牛肾岩藻糖苷酶处理后的谱中检测的, 下部数值是在用 GlcNAcase 温育后获得的。括号之间的是在给定结构中反映的谱的总百分比。所述谱图示于图 26。

图 25: 该图上部示出从与半乳糖苷酶温育的 PER.C6TM-EPO 中释放的脱唾液酸化的聚糖; 中部数值是在用杏仁粉岩藻糖苷酶处理后的谱中检测的, 下部数值是在经 GlcNAcase 温育后获得的。括号之间的是在给定结构中反映的谱的总百分比。所述谱图示于图 27。

图 26: 对 PER.C6TM-EPO 的 N 联聚糖进行外切糖苷酶处理的 MALDI 谱。

A.)与 PNGase F 和神经氨酸酶温育的 PER.C6TM-EPO。

B.) 与 PNGase F, 神经氨酸酶和半乳糖苷酶温育的

PER.C6TM-EPO。

C.) 与 PNGase F 和神经氨酸酶温育, 随后用半乳糖苷酶和牛肾岩藻糖苷酶处理的 PER.C6TM-EPO。

D.) 与 PNGase F 和神经氨酸酶温育, 随后用半乳糖苷酶、牛肾岩藻糖苷酶和 GlcNAc-ase 处理的 PER.C6TM-EPO。

E.) 与 PNGase F 和神经氨酸酶温育, 随后用半乳糖苷酶和杏仁粉岩藻糖苷酶处理的 PER.C6TM-EPO。

F.) 与 PNGase F 和神经氨酸酶温育, 随后用半乳糖苷酶、杏仁粉岩藻糖苷酶和 GlcNAc-ase 处理的 PER.C6TM-EPO。

发明概述

本发明提供了鉴别、选择和获得哺乳动物细胞的方法, 所述哺乳动物细胞能产生蛋白质分子如包含翻译后修饰的肽和蛋白质, 其中所述翻译后修饰是预定的而且由表达所述蛋白质分子的哺乳动物细胞带来。本发明还提供了使用本发明方法获得的哺乳动物细胞及在基于其生产蛋白质和/或指示所希望的预定翻译后修饰的翻译后修饰的能力而获得的哺乳动物细胞上获得及生产蛋白质分子如促红细胞生成素 (EPO) 的方法。

本发明还提供了一种生产包含预定的翻译后修饰的蛋白质分子的方法, 包括以下步骤: 将编码所述蛋白质分子的核酸提供给通过本发明方法获得的一种哺乳动物细胞, 由此所述哺乳动物细胞以可表达形式携带所述核酸; 在有益于所述蛋白质分子生产的条件下培养所述哺乳动物细胞。

在本发明的一个实施方案中, 本发明提供了一种生产包含预定的翻译后修饰的蛋白质分子的方法, 所述方法包括以下步骤: 鉴别一种具有将预定的翻译后修饰提供给蛋白质分子的能力的哺乳动物细胞; 将编码所述蛋白质分子的核酸提供给所述哺乳动物细胞, 由此所述哺

乳动物细胞以可表达形式携带所述核酸；在有益于所述蛋白质分子生产的条件下培养所述哺乳动物细胞。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种生产包含预定的翻译后修饰的蛋白质分子的方法，所述方法包括以下步骤：鉴别一种具有将预定的翻译后修饰提供给蛋白质分子的能力的哺乳动物细胞；将编码所述蛋白质分子的核酸提供给所述哺乳动物细胞，由此所述哺乳动物细胞以可表达形式携带所述核酸；将所述哺乳动物细胞在有益于所述蛋白质分子生产的条件下培养；分析如此产生的所述蛋白质分子上的所述翻译后修饰；确定所述蛋白质分子上存在的所述翻译后修饰是否包含所述预定的翻译后修饰。

在一个优选的实施方案中，本发明提供了哺乳动物细胞，其具有神经特征和性质，由此可以生产大量具有“神经或脑型”性质的重组蛋白质。通过使用本发明的方法和手段可以生产携带特异性预定翻译后修饰的重组蛋白如脑型 EPO。

本发明另外提供了生产包含预定翻译后修饰的蛋白质分子的方法，所述方法包括以下步骤：将编码所述蛋白质分子的核酸提供给通过本发明方法获得的一种哺乳动物细胞，由此所述哺乳动物细胞以可表达形式携带所述核酸；在有益于生产所述蛋白质分子的条件下培养所述哺乳动物细胞，及从哺乳动物细胞培养物中纯化所述蛋白质分子。

在另一个实施方案中，本发明提供了生产包含预定翻译后修饰的蛋白质分子的方法，所述方法包括以下步骤：将编码所述蛋白质分子的核酸提供给通过本发明方法获得的哺乳动物细胞，由此所述哺乳动物细胞以可表达形式携带所述核酸；在有益于生产所述蛋白质分子的条件下培养所述哺乳动物细胞；分析如此生产的所述蛋白质分子上所述翻译后修饰；确定所述蛋白质分子上存在的所述翻译后修饰是否包含所述预定的翻译后修饰。

优选地,所述生产蛋白质分子的方法包括从哺乳动物细胞培养物中纯化所述蛋白质分子的额外步骤。更优选的是在本发明的哺乳动物细胞中生产蛋白质分子的方法,其中所述哺乳动物细胞是无限增殖化的和/或表达 E1A 腺病毒序列。无限增殖化或导入 E1A 腺病毒序列可在鉴别所获得的哺乳动物细胞之前进行,但也可以在鉴别、选择和/或获得所述细胞之后进行。

本发明还提供了纯化蛋白质分子的方法,其中所述蛋白质分子基于所述分子上存在的预定翻译后修饰而从细胞培养物中纯化,所述预定的翻译后修饰是由生产所述分子的哺乳动物细胞带来的。

本发明还提供了促红细胞生成素样分子的组合物在制备治疗如下疾病的药物中的应用,所述促红细胞生成素样分子选自促红细胞生成素,促红细胞生成素的一或多个突变蛋白,促红细胞生成素的一或多个衍生物,或者各种程度唾液酸化的促红细胞生成素分子的一或多个部分(fraction)的组合,所述疾病选自缺血,再灌注损伤,缺氧引起的疾病,炎症疾病,神经变性疾病,及中枢或周围神经系统急性损害,其中所述促红细胞生成素样分子的组合物与目前用于治疗贫血的促红细胞生成素样分子如 epoetin alfa 和 epoetin beta 相比基于蛋白质含量具有较低的体内促红细胞生成活性。本发明还提供了治疗或预防所述疾病的方法,包括施用所述组合物。

在其它方面中,本发明提供了一种在哺乳动物细胞中生产需要糖基化结构的蛋白质分子的方法,所述糖基化结构选自含有(唾液酸) Lewis X 和/或 LacdiNac 的 N 联聚糖结构,其特征在于所述细胞表达编码腺病毒 E1A 的核酸,附带条件是当所述蛋白质分子是促红细胞生成素时,所述哺乳动物细胞不是 PER.C6TM 细胞,当所述蛋白质分子是 glycodeclin 或者 C 蛋白或者组织因子途径抑制剂时,所述哺乳动物细胞不是 HEK293 细胞,当所述蛋白质分子是基质金属蛋白酶 1 时,所述哺乳动物细胞不是 HT1080 细胞。

本发明的另一方面提供了一种生产富含具有包含(唾液酸)Lewis X 和/或 LacdiNac 结构的 N 联聚糖的蛋白质分子的一种部分的方法, 包括以下步骤: a)在表达编码腺病毒 E1A 的核酸的细胞中重组表达所述蛋白质分子; b)分级分离如此产生的蛋白质, 从而获得富含具有所述包含(唾液酸)Lewis X 和/或 LacdiNac 结构的 N 联聚糖的分子的一种部分。

本发明的另一方面提供了一种分级分离一种包含蛋白质分子的混合物的方法, 所述蛋白质分子包含 Lewis X 结构, 所述方法利用所述分子与 AAL 凝集素的结合。在其它实施方案中, 提供了如此获得的部分。

本发明另一方面提供了包含促红细胞生成素样分子的组合物, 所述促红细胞生成素样分子选自促红细胞生成素, 促红细胞生成素的一或多个突变蛋白, 及促红细胞生成素的一或多个衍生物, 其特征在于每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数为至少约 2.2。在其它实施方案中, 所述平均数为至少大约 2.6, 2.7, 3.6, 4.1 或 5.7。另一方面, 本发明的组合物或部分用于制备一种药物。

本发明另一方面提供了可在表达编码腺病毒 E1A 的核酸的哺乳动物细胞中重组产生的促红细胞生成素在制备治疗如下疾病的药物中的应用, 所述疾病选自缺血, 再灌注损伤, 缺氧引起的疾病, 炎症疾病, 神经变性疾病, 及中枢或周围神经系统急性损害。在另一个实施方案中, 本发明提供了一种预防和/或治疗疾病的方法, 所述疾病选自缺血, 再灌注损伤, 缺氧引起的疾病, 炎症疾病, 神经变性疾病, 及中枢或周围神经系统急性损害, 所述方法包括为人或动物治疗对象施用促红细胞生成素样分子的一种组合物, 所述促红细胞生成素样分子选自促红细胞生成素, 促红细胞生成素的一或多个突变蛋白及促红细胞生成素的一或多个衍生物, 其中所述促红细胞生成素样分子的组合物特征在于其可在包含编码腺病毒 E1A 的核酸的哺乳动物细胞中

重组产生。在一些优选的实施方案中，所述细胞是 PER.C6™ 细胞。

详细描述

本发明的实质是提供了适于生产需要预定翻译后修饰的蛋白质的重组生产系统。在第一个方面中，这种重组系统可以根据本发明的方法提供，以鉴别能施加目的蛋白质所需的或者目的蛋白质的指定用途所需的翻译后修饰的表达系统。在第二个方面中，本发明提供了一种生产表达系统的方法，所述表达系统具有将所希望的翻译后修饰施加给需要其的蛋白质的能力。本发明的其它方面包括具有如此产生的预定翻译后修饰的分离的蛋白质，应用方法，及包含这种蛋白质的药物组合物。

本发明因此提供了一种鉴别能生产包含预定翻译后修饰的蛋白质分子的哺乳动物细胞的方法，所述方法包括以下步骤：a) 分析所述哺乳动物细胞产生的蛋白质上的翻译后修饰；b) 确定所述蛋白质是否包含所述预定的翻译后修饰。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种选择哺乳动物细胞的方法，所述哺乳动物细胞能生产包含预定翻译后修饰的蛋白质分子，所述方法包括以下步骤：a) 分析所述哺乳动物细胞中或者所述哺乳动物细胞的细胞表面上一组织特异性标记或组织特异性标记组合的存在与否，当使用本领域技术人员熟知的重组 DNA 技术及其它细胞培养方法在所述细胞中生产时，所述标记或所述标记的组合是所述细胞在蛋白质分子上施加预定的翻译后修饰的能力的指示，b) 基于所述组织特异性标记的存在与否选择所述哺乳动物细胞。

在又一个实施方案中，本发明提供了一种从异质细胞群中获得能生产包含预定翻译后修饰的蛋白质分子的哺乳动物细胞的方法，述方法包括以下步骤：a) 在所述异质细胞群中基于所述细胞生产的蛋白质上的翻译后修饰淘选细胞，b) 选择能生产包含所述预定翻译后修饰

的蛋白质的细胞。这种淘选可以使用本领域已知方法实现，包括但不限于使用识别预定的翻译后修饰的荧光标记的抗体淘选细胞。

在另一个实施方案中，本发明提供了一种鉴别能生产包含预定翻译后修饰的蛋白质分子的哺乳动物细胞的方法，所述方法包括以下步骤：将编码需要并能接受翻译后修饰的蛋白质的核酸提供给所述哺乳动物细胞，由此所述哺乳动物细胞以可表达形式携带所述核酸；在有益于所述蛋白质生产的条件下培养所述哺乳动物细胞；分析所述哺乳动物细胞生产的所述蛋白质上的翻译后修饰；证实所述蛋白质上所述翻译后修饰的存在。根据另一个实施方案，本发明提供了一种鉴别能生产包含预定翻译后修饰的蛋白质分子的哺乳动物细胞的方法，所述方法包括以下步骤：将编码所述能包含翻译后修饰的蛋白质分子的核酸提供给所述哺乳动物细胞，由此所述哺乳动物细胞以可表达形式携带所述核酸；在有益于所述蛋白质分子产生的条件下培养所述哺乳动物细胞；分析所述哺乳动物细胞产生的所述蛋白质分子上的翻译后修饰；确定所述蛋白质分子上存在的所述翻译后修饰是否包含所述预定的翻译后修饰。

在此所述蛋白质分子是指但非限于这样的分子，如肽，多肽和蛋白质，以及肽、多肽和蛋白质的突变体（包含缺失，点突变，交换和/或化学诱导的改变的分子），只要其能接受预定的翻译后修饰，即具有顺应修饰的所需氨基酸残基（例如在需要加入 N 联聚糖结构的情况中，其应包含一个 Asn-X-Ser/Thr 序列，由此所述结构可施加于 Asn 残基）。所述蛋白质分子还指携带标签和/或其它蛋白质及非蛋白质标记（例如放射性化合物）的肽，多肽和蛋白质。这种蛋白质的一个实例是人 EPO，其除了肾型或血清型形式之外，还具有其它表型如脑型形式。具有某些特性即在某些组织中在蛋白质的功能性中可能起重要作用及应该（当重组表达时）携带预定翻译后修饰以行使适当功能的蛋白质的其它非限制性实例包括单克隆抗体，神经营养蛋白，细胞因

子, 胰岛素样生长因子, TGF- β 样生长因子, 成纤维细胞生长因子, 表皮生长因子, 肝素结合生长因子, 酪氨酸激酶受体配体及其它营养因子。大多数这些因子与疾病综合征相关, 因此大多数蛋白质可以重组形式用于治疗病人, 条件是所述蛋白质具有在体内发挥活性所必需的翻译后修饰。因此这些蛋白质应在能提供所希望的翻译后修饰的表达系统上生产。这种蛋白质例如但非限于是运铁蛋白, glycodelin, 神经生长因子 (NGF), 脑衍生神经营养因子, 神经营养蛋白-3, 神经营养蛋白-4/5 和神经营养蛋白-6, 睫状神经营养因子, 白血病抑制因子, Cardiotrophin-1, 制癌蛋白-M, 一些白细胞介素, GM-CSF, G-CSF, IGF-1 和 IGF -2, TGF- β , 胶质细胞衍生的神经营养因子, Neurturin, Persephin, Myostatin, 成纤维细胞生长因子-1, 成纤维细胞生长因子-2 和成纤维细胞生长因子-5, 双调蛋白, 乙酰胆碱受体诱导活性, Netrin-1 和 Netrin-2, 神经调节蛋白-2 和神经调节蛋白-3, Pleiotrophin, Midkine, 干细胞因子 (SCF), 集聚蛋白, CSF-1, PDGF 和 Saposin C。在此所用的单克隆抗体是指人和人源化的抗体, 其一部分及等价物如单链 Fv(scFv)片段, Fab 片段, CDR 区域, 可变区, 轻链和重链, 或者适用作特异性配体的任何其它形式。

根据一个特异的实施方案提供了生产系统, 其能在能接受 N 联聚糖结构的蛋白质上施加 lewis X 结构和/或 LacdiNAc。根据本发明, 这类表达系统可以被鉴别、选择或特异性设计。这种目的性设计例如是将包含腺病毒 E1A 序列的核酸导入哺乳动物细胞中, 由此所述 E1A 序列在所述哺乳动物细胞中表达。已经存在的这类细胞例如是 HEK293, PER.C6™, 911。尽管已知这些细胞系并已经用于蛋白质生产 (Van den Nieuwenhof et al, 2000; WO 00/63403; Grinnell et al, 1994), 但是迄今还不清楚 E1A 对将 lewis X 和/或 LacdiNAc 结构施加于所产生的蛋白质中的能力所起的决定性作用。

在此所用术语“翻译后修饰”是指所述蛋白质分子上或其中存在

的任何修饰。其是指在所述分子在体内或体外从 RNA 中翻译期间或之后导入的修饰。这种修饰包括但非限于糖基化，折叠，磷酸化， γ -羧基化， γ -羟基化，多聚化，硫键及例如加工事件如剪除或加入一或多个氨基酸。在此所用术语预定的翻译后修饰是指针对选定的治疗有用的任何翻译后修饰。根据优选的实施方案，预定的翻译后修饰是指一种修饰形式，其使被修饰的蛋白质特别适用于治疗人或动物的特异组织，器官，区室和/或细胞的病变。携带这种预定的翻译后修饰的蛋白质分子除了对欲治疗的组织，器官，区室和/或细胞之外无明显作用（如有害的或其它非希望的副作用）。根据一个实施方案，预定的翻译后修饰导致包含预定翻译后修饰的蛋白质更快速地从血液中清除，例如以降低副作用。预定的翻译后修饰可以预先详细地充分了解，但也可以一般性指一种希望的状态，即是包含这种预定翻译后修饰的蛋白质分子的正确和希望活性所需的，意味着相应的蛋白质分子上存在的修饰无需充分理解和/或阐明，只要具有希望的活性即可。根据希望的用途，O-和/或 N-聚糖中希望的糖基化修饰例如是这样的结构，如 Lewis x，唾液酸 Lewis x，GalNac，GlcNac，LacdiNac，附着于 N-乙酰葡萄糖胺的 α 1,3 连接的岩藻糖，末端 N-乙酰葡萄糖胺，末端半乳糖，等分（bisecting）N-乙酰葡萄糖胺，硫酸基团和唾液酸。

用于生产人蛋白质的本发明的哺乳动物细胞优选是人细胞或来源于人，以生产极有可能携带哺乳动物优选人特性的蛋白质。为生产具有神经（neural）翻译后修饰的蛋白质分子，优选使用具有神经特征的细胞，如作为神经细胞指征的蛋白质标记。这并不排除非神经细胞在生产包含神经型翻译后修饰的蛋白质中也可以是非常有用的。依赖于所需的蛋白质活性选择、鉴别或获得能产生这种翻译后修饰的细胞。

因为当应用于治疗时需要生产大量的蛋白质，因此优选本发明的哺乳动物细胞是无限增殖化的。无限增殖化可以根据许多方式实现。

获得无限增殖化细胞的方法例如通过加入编码转化和/或无限增殖化蛋白的核酸将静止的细胞激活转化为分裂的细胞，或者通过化学处理使内源蛋白质变成转化性的，或者从肿瘤材料中获取细胞。无限增殖化非肿瘤细胞的一个优选方法是加入腺病毒的 E1 区域，如针对细胞系如 911 和 PER.C6™所示出。无限增殖化细胞的其它方法已知如使用某些人乳头瘤病毒(HPV)蛋白质编码序列转化(例如 HeLa 细胞)。加入某些病毒蛋白如腺病毒 E1 可有益于重组蛋白的生产，因为许多这种蛋白质具有转录激活特点，以及抗细胞程序死亡作用。目前令人惊奇地发现腺病毒的 E1A 在用作本发明表达系统的宿主细胞中的表达，改变了该表达系统的特征，由此获得施加包含 lewis X 和/或 LacdiNAc 的 N 联糖基化结构的能力。

生产需要含有 lewis X 和/或 LacdiNAc 的 N 联聚糖的蛋白质分子的方法所用的一种合适的细胞系是 PER.C6™，其保藏在欧洲动物细胞保藏中心 (European Collection of Animal Cell Cultures at the Center for Applied Microbiology and Research)，保藏号 No. 96022940。根据这个方面的其它合适的细胞系包括 HEK293,911 及其它哺乳动物细胞，所述哺乳动物细胞可通过将含有可表达形式的腺病毒 E1A 序列的核酸导入一或多个所述细胞或其祖细胞中而修饰。任选地，包括可表达形式的 E1B 序列，其可以是有益的，因为 E1B 可发挥抗编程性细胞死亡作用从而抵消 E1A 表达所致的潜在编程性细胞死亡作用。

生产本发明蛋白质分子的方法进一步可包括从哺乳动物细胞培养物中纯化所述蛋白质分子的额外步骤。在此所用纯化可以通过本领域已经加以描述的常规方法进行，然而优选使用包括一个步骤的纯化方法，所述步骤中使用所述蛋白质分子中和/或其上存在的翻译后修饰。更优选的是包含这样一个步骤的纯化方法，即其中使用所述蛋白质分子中和/或其上存在的预定的翻译后修饰。当应用亲和纯化方法时，优选使用抗体或其它结合剂，如特异于特定碳水化合物组分及针

对某些类型的翻译后修饰的凝集素。这种抗体例子是抗（唾液酸）Lewis x 结构，lacdiNac 结构或 GalNac Lewis x 结构的抗体。可用于本发明此方面的凝集素的非限制性实例是 AAL 和选择蛋白，如 E-选择蛋白，P-选择蛋白，L-选择蛋白。使用这种结合剂使得可以纯化（重组）蛋白质，由此大多数纯化的蛋白质携带希望的预定翻译后修饰。更优选的方法是其中蛋白质分子纯化为均质。本发明提供了从哺乳动物细胞培养物中纯化蛋白质的方法实例，并涵盖了例如亲和层析方法以通过使用识别重组产生的产物的 N 聚糖中存在的 Lewis x 结构的抗体或凝集素纯化脑型糖基化 EPO。

本发明提供了一种药物可接受的组合物，其包含根据本发明方法可获得的具有预定翻译后修饰的一种蛋白质分子，及一种药物可接受的载体。药物可接受的载体是本领域技术人员已知的那些载体。在一个优选的实施方案中，所述药物可接受的组合物中所述蛋白质分子是促红细胞生成素。根据本发明，在具有神经蛋白标记的细胞中生产的促红细胞生成素获得了一种翻译后修饰，其在神经组织中或在神经细胞上是活性的。然而，该翻译后修饰与在血液中循环的 EPO 上见到的翻译后修饰不可相比。在具有神经蛋白标记的细胞中产生的 EPO 的促红细胞生成作用明显较低。本发明强有力地提示这是由于缺乏高百分比的唾液酸和/或由于存在脑型特点如 Lewis x 结构和末端半乳糖苷所致。这是有利的，因为与目前可利用的 EPO 制剂相比，这种脑型 EPO 可以相对较高的剂量用于治疗与神经组织相关的病变，或者用于治疗由缺血（如心肌缺血）所致组织损害，同时具有明显降低的促红细胞生成作用。本发明提供了包含至少一个翻译后修饰的重组促红细胞生成素，所述翻译后修饰选自唾液酸 Lewis x 结构，Lewis x 结构， $\alpha 1$ ，附着于 N-乙酰葡萄糖胺的 $\alpha 1,3$ -连接的岩藻糖，LacdiNac 结构，末端 N-乙酰葡萄糖胺基团及末端半乳糖基团。所述重组促红细胞生成素可在根据本发明可获得的哺乳动物细胞上生产，以及可在预先

已知但预先未意识到适于该目的的哺乳动物细胞上生产。一个实例是 PER.C6TM 细胞。根据本发明的一个实施方案进一步提供了 PER.C6TM 细胞在生产包含预定翻译后修饰的蛋白质分子中的应用，其中优选所述蛋白质分子快速从血液中清除和/或以高剂量应用。在可在 PER.C6TM 上生产的 EPO 的情况中，可以高剂量使用以治疗或预防与缺氧相关的急性损伤，同时限制红细胞生成的不利副作用。

在本发明的一个实施方案中，本发明的蛋白质分子适于对人或人体进行手术，治疗或诊断处理。优选地，本发明的 EPO 样分子用于生产一种药物，以治疗缺氧所致病变，神经变性疾病或者急性中枢或周围神经系统损害。在另一个优选的实施方案中，所述蛋白质分子如 EPO 用于生产一种药物，以治疗缺血和/或再灌注损伤。在再一个优选的实施方案中，所述蛋白质分子如 EPO 用于生产一种药物，以治疗免疫失调和/或炎症疾病。

在此揭示了产生和生产重组蛋白质的方法和组合物。本发明特别用于生产这样的蛋白质，即其需要翻译同时和/或翻译后修饰如糖基化和正确折叠，本发明进一步涉及能在蛋白质分子上产生脑型翻译同时和/或翻译后修饰的人体细胞的应用。这些细胞可例如用于生产具有神经特征的人糖蛋白，这些人糖蛋白由于其神经特征而可以具有治疗益处。

本发明还提供了具有神经特征的人细胞系的应用，其修饰具有神经性质的重组表达的蛋白质，如脑型或神经型翻译后修饰如糖基化，磷酸化或折叠。这种细胞系例如是 PER.C6TM (U. S. Pat. No. 6,033, 908)，其通过使用具有腺病毒 E1 基因的构建体无限增殖化人胚肾细胞而产生。以前已经证实 PER.C6TM 细胞特别适于生产重组人蛋白，因为可以获得高产量的蛋白质如人 EPO 和完全的人单克隆抗体 (见 WO 00/63403 所述)。本发明揭示了 PER.C6TM 细胞生产的重组蛋白质可获得某些组织特异性特征如神经特征(例如，翻译后修饰如糖基

化)。这通过具有所谓脑型寡糖的蛋白质的产生而举例示出。已经示出 PER.C6™细胞产生的人 EPO 是用 N 联糖修饰的, 所述 N 联糖与在人尿 EPO 或中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或者幼仓鼠肾 (BHK) 细胞产生的重组人 EPO 中发现的 N 联糖明显不同。人尿 EPO 及在 CHO 和 BHK 细胞中产生的重组人 EPO 含有可以被称为肾型或血清型寡糖的糖基化结构。典型地, 这些 CHO-EPO 和 BHK-EPO 制剂的 N 联糖是高度分支的, 高度糖基化的及高度唾液酸化的, 然而它们没有外周 (peripheral) $\alpha 1,3$ -连接的岩藻糖(Tsuda et al. 1988; Takeuchi et al. 1988 ; Nimtz et al. 1993 ; Watson et al. 1994; Rahbek- Nielsen et al. 1997)。

在此已经阐明与在 PER.C6™上产生的人 EPO 连接的寡糖的性质, 并示出明显不同于人尿 EPO 及在 CHO 和 BHK 细胞中产生的重组人 EPO 中存在的寡糖。首先, PER.C6™产生的人 EPO 的寡糖的平均唾液酸含量明显低于人尿 EPO 或重组人 EPO (来自 CHO 和 BHK) 的平均唾液酸含量。在 PER.C6™产生的人 EPO 中非常低的唾液酸含量是存在含有末端半乳糖和/或 N-乙酰半乳糖胺和/或 N-乙酰葡萄糖胺的 N 联寡糖的标示。其次, N-乙酰半乳糖胺在 PER.C6™产生的人 EPO 的 N 联糖中大量发现, 而 N-乙酰半乳糖胺在人尿 EPO 和 CHO 细胞产生的重组人 EPO 的 N 联糖中未发现。已经有报道在 BHK 细胞产生的少数几批重组人 EPO 中 N 联糖中仅有微量的 N-乙酰半乳糖胺(Nimtz et al. 1993)。第三, 在 PER.C6™细胞中产生的人 EPO 的 N 联糖发现含有非常大量的岩藻糖。该岩藻糖的一部分是 $\alpha 1,3$ -连接于周围 N-乙酰葡萄糖胺, 从而形成所谓 Lewis x 结构(图 5)。Lewis x 结构从未报道在人尿 EPO 或者在 CHO 和 BHK 细胞中产生的重组人 EPO 中出现。根据本发明在 EPO 上存在的 (唾液酸) Lewis x 结构使这个 EPO 适于与选择蛋白结合及设想可进一步应用于心脏防护中。

因为蛋白质连接的寡糖对多肽的物理化学性质如三级构象, 溶解

性,粘度及电荷具有重要影响,因此 PER.C6TM产生的人 EPO 具有与人尿 EPO 及 CHO 和 BHK 细胞产生的重组人 EPO 明显不同的物理化学性质(Toyoda et al. 2000)。明显地,PER.C6TM产生的人 EPO 的电荷由于其唾液酸含量较低而少于人尿 EPO 及 CHO 和 BHK 细胞产生的重组人 EPO 的电荷,而且由于非常高的岩藻糖含量而疏水性可能更强。结果,PER.C6TM产生的人 EPO 的平均 pI 明显高于人尿 EPO 及 CHO 和 BHK 细胞产生的重组人 EPO 的 pI。因为 EPO 的聚糖尤其唾液酸对与 EPO 受体的结合也有影响,因此预期与人尿 EPO 及 CHO 和 BHK 细胞产生的重组人 EPO 的相比,PER.C6TM-产生的人 EPO 对 EPO 受体具有不同的亲和性。尽管先前已经揭示了在 PER.C6TM 细胞上生产 EPO (WO 00/63403),但没有对产生的 EPO 的结构进行详细揭示。因此在此获得的见识现在证明如下的结论是正确的,即在 PER.C6TM 上生产的 EPO 使其完全适于新应用,尤其在红细胞生成被视为(非希望的)副作用的场合。当然,其它蛋白质可从在此提供的见识中获益。根据本发明的一个其它方面,提供了使用 PER.C6TM 或任何表达 E1A 的哺乳动物细胞生产需要含有 lewis X 和/或 LacdiNAc 的 N 聚糖的蛋白质的一种方法。可从这种结构中获益并因此可在所述细胞上适当生产的蛋白质例如是促红细胞生成素,运铁蛋白, glycodeilin 如 glycodeilin A(PP14),神经生长因子 (NGF),脑衍生神经营养因子,神经营养蛋白-3,神经营养蛋白-4/5 和神经营养蛋白-6,睫状神经营养因子,白血病抑制因子,Cardiotrophin-1,制癌蛋白-M,白细胞介素,GM-CSF, G-CSF, IGF-1 和 IGF-2, TGF- β , 胶质细胞衍生的神经营养因子, Neurturin, Persephin, Myostatin, 成纤维细胞生长因子-1, 成纤维细胞生长因子-2 和成纤维细胞生长因子-5, 双调蛋白, 乙酰胆碱受体诱导活性, Netrin-1 和 Netrin-2, 神经调节蛋白-2 和神经调节蛋白-3, Pleiotrophin, Midkine, 干细胞因子 (SCF), 集聚蛋白, CSF-1, PDGF, Saposin C, 可溶的补体受体-1, α -1 酸性糖蛋白, 急性

期蛋白, E-选择蛋白配体-1, LAM-1, 癌胚抗原样 CD66 抗原, 周围淋巴结地址素, CD75, CD76, CD45RO, CD21, P-选择蛋白糖蛋白配体-1, GlyCAM-1, 粘液素型糖蛋白, CD34, podocalyxin, α 1-抗胰凝乳蛋白酶, α 1-蛋白酶抑制剂, α 淀粉酶, 富集唾液脯氨酸的糖蛋白, SERP-1, 干扰素- β , β -痕量蛋白, C 蛋白, 尿激酶, 血吸虫糖蛋白, Glycodelin A, 组织因子途径抑制剂, α -胎蛋白, 人妊娠蛋白如促性腺激素如卵泡刺激素 (FSH), 黄体生成素(LH), 人绒毛膜促性腺激素(hCG), 或者能接受所述糖基化结构的任何这些物质的片段或变体。在此所用术语“片段”是蛋白质的一部分, 可以是几个氨基酸长至几乎完整蛋白质的肽。变体可以是突变蛋白, 融合蛋白, 与其它非蛋白质组分偶联的蛋白质或肽等。根据本发明这种片段或变体应能接受翻译后修饰。

在本发明的其它方面中, 提供了生产富含具有包含(唾液酸) Lewis X 和/或 LacdiNac 结构的 N 联聚糖的蛋白质分子的一部分 (fraction) 的方法, 包括以下步骤: a)在表达编码腺病毒 E1A 的核酸的细胞中重组表达所述蛋白质分子; b)分级分离如此产生的蛋白质分子, 从而获得一种部分, 其富含具有包含(唾液酸) Lewis X 和/或 LacdiNac 结构的所述 N 联聚糖的分子。上述蛋白质分子可从本发明此方面中获益。已经描述了在 HEK293 细胞上产生及随后纯化的 C 蛋白具有包含 GalNAc- Lewis x 结构的一种特殊糖基化结构 (Grinnell et al, 1994), 但是没有有目的地富集含有这种类型的糖的纯化的蛋白质, 而且未有意地选择表达 E1A 的生产细胞。本发明的实质是教导了表达腺病毒 E1A 的哺乳动物细胞可用于有目的地生产具有包含(唾液酸) Lewis X 和/或 LacdiNac 结构的 N 联聚糖的蛋白质, 而且富集这些特殊部分。优选地, 所述部分通过一种方法富集, 所述方法包括使用希望的聚糖结构的亲和纯化步骤, 如使用与所述包含(唾液酸) Lewis X 和/或 LacdiNac 结构的 N 联聚糖结合的一种凝集素或单克隆

抗体进行的结合。在此已经示出使用这些 EPO 生产方法能获得具有特殊糖基化形式的 EPO 部分。本发明的一方面提供了包含促红细胞生成素样分子的组合物，所述促红细胞生成素样分子选自促红细胞生成素、促红细胞生成素的一或多个突变蛋白、及促红细胞生成素的一或多个衍生物，其特征在于每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数为至少大约 2.2。在其它的实施方案中，所述每个促红细胞生成素样分子 N 联聚糖上 lewis-X 结构的平均数为至少大约 2.6、2.7、3.6、4.1 或 5.7。这种组合物对在此所述的医学目的有价值。

本发明进一步揭示了在人神经细胞中生产的脑型蛋白质在治疗哺乳动物尤其人中缺血/再灌注损伤中的应用。在此所述缺血/再灌注损伤是指在先前存活的缺血组织在再灌注后发生的细胞损害。缺血/再灌注损伤与例如但非限于溶栓治疗，冠脉血管成形术，主动脉阻断，心肺分流术，器官或组织移植，外伤和休克。

本发明提供了在哺乳动物细胞中生产的具有脑型寡糖的治疗蛋白质的应用。这些脑型寡糖特别包含 Lewisx 结构，唾液酸 Lewis x 结构，或其含(唾液酸) Lewis x 结构的衍生物，用以治疗哺乳动物治疗对象如人中缺血/再灌注损伤。重组蛋白上存在(唾液酸) Lewis x 结构能将蛋白质定向于缺血/再注入的损伤部位，从而发挥其比不含(唾液酸) Lewis x 结构的蛋白质更有效的缺血/再灌注保护性作用。重组表达的蛋白质上脑型寡糖的存在在本发明中通过促红细胞生成素(EPO)举例示出，所述 EPO 在 PER.C6TM 细胞上产生。这种特殊类型的 EPO 含有 Lewis x 以及唾液酸 Lewis x 结构。在本发明中描述了一些实验，所述实验示出在心脏缺血/再灌注损伤的体内模型中心脏保护功能和中风方面，与血清型(或肾型) EPO 相比 PER.C6TM 脑型(或神经型) EPO 的优越性。

本发明表现的另一优势是 PER.C6TM 生产的人 EPO 具有神经营养

活性。PER.C6™-产生的 EPO 提供了 EPO 蛋白质作为神经营养和/或神经保护剂的物理化学和/或药物代谢动力学和/或药物动力学优势。与在 CHO 和 BHK 细胞中产生的高度唾液酸化的血清型糖基化人重组 EPO 相比,PER.C6™生产的 EPO 具有较高的神经细胞亲和性和对于神经细胞上的 EPO-R 的亲和性。在非神经细胞上产生的重组人 EPO (Goto et al. 1988)对在神经细胞上的 EPO-R 的亲和性比对在红细胞祖细胞上的 EPO-R 的亲和性低 (Musada et al. 1993 and 1994)。

EPO 的神经保护作用明显展示了重组人 EPO 在应答由炎症或缺氧和/或缺血诱导的毒性化合物或在神经变性疾病中作为神经保护性治疗的用途的新可能性。然而,一个主要缺点是当用作神经保护剂时,血液循环中存在的重组 EPO 也增加红细胞量或血细胞比容。这反过来导致较高的血粘度,这可能在脑缺血中具有不利作用(Wiessner et al. 2001)。

本发明提供了一种方法,以解决重组人 EPO 在用作神经保护剂所具有的非希望的趋血副作用的问题(Wiessner et al. 2001)。因此,已经示出 PER.C6™产生的脑型糖基化重组人 EPO 具有作为神经形成和/或神经保护剂的高度潜力,而其刺激红细胞生成潜力较低。

根据本发明,在表达 E1A 的哺乳动物细胞上生产的 EPO,如 PER.C6™产生的 EPO,可以系统施用(静脉内,腹膜内,皮内施用)以抑制,预防和/或修复由例如急性头部和脑部损伤或者神经变性疾病引起的神经损伤。本发明还提供了可用于调节由于缺氧所致严重损伤的组织功能的产物,所述组织如哺乳动物中的中枢和周围神经系统,肾组织和心肌组织。这些组织可以是患病的但也可以是正常和健康的。可用本发明提供的产物治疗的疾病可以是急性头部,脑部和/或心脏损伤,神经变性疾病,发作性疾病,神经毒素中毒,低血压,心脏骤停,辐射,多发性硬化和/或缺氧所致损伤的结果。缺氧可以是出生前或出生后缺氧,窒息,肺气肿,脓毒性休克,心脏骤停,气

阻(choking), 新近溺水, 镰形细胞危象, 成人呼吸窘迫综合征, 节律障碍, 氮气麻醉, 手术后认知功能紊乱, 一氧化碳中毒, 烟雾吸入, 慢性阻塞性肺部疾病, 过敏性休克或胰岛素性休克。发作性损伤包括但非限于癫痫, 慢性发作性疾病或惊厥。在病理学为神经变性疾病的情况下, 所述疾病可以是由以下致: AIDS 痴呆, Alzheimer's 病, Parkinson's 病, Creutzfeldt-Jakob 病, 中风, 大脑性瘫痪, 脊髓外伤, 脑外伤, 年龄相关的认知功能丧失, 肌萎缩性脊髓侧索硬化, 酒精中毒, 视网膜缺血, 青光眼, 普通神经丧失, 记忆力丧失或年老。可用本发明提供的产物治疗的其它疾病例如包括孤独症, 抑郁症, 焦虑症, 忧郁症, 注意力缺乏、活动过度障碍(ADHD)及认知功能障碍。

PER.C6TM-EPO 在血脑屏障机能障碍的情况下可以被动穿过血脑屏障。在血脑屏障是完整的情况下, 认为 PER.C6TM-EPO 通过 EPO-R 主动转运通过血脑屏障。一些研究提示当施用高剂量的重组 EPO 时, EPO 自身能穿过血脑屏障 (WO 00/61164)。重组 PER.C6TM-EPO 穿过血脑屏障的另一条预测途径是通过 PER.C6TM产生的 EPO 上存在的(唾液酸) Lewis x 聚糖结构与人脑微血管内皮细胞上存在的 E-选择蛋白之间的相互作用而进行(Lou et al. 1996)。E-选择蛋白与 EPO 之间的相互作用可促进 EPO 转运通过脑内皮屏障, 因为 E-选择蛋白也参与 T 淋巴细胞迁移入 CNS 中(Wong et al. 1999)。如果需要最佳的神经保护作用, PER.C6TM产生的 EPO 与血清型 EPO 相比可以明显较高剂量施用, 因为 PER.C6TM-EPO 诱导红细胞生成的效率低得多, 由此血细胞比容提高引起的不利副作用被降低或者甚至不存在。

在本发明的另一个方面中, 在表达 E1A 的哺乳动物细胞上生产的 EPO 如 PER.C6TM-EPO, 可以通过灌注、或者通过留置心室内导管、或者通过腰部注射而鞘内施用以抑制或预防神经损伤。同样, 施用脑型 EPO 比血清型 EPO 的优越之处在于在血脑屏障功能障碍(例如中风所致)而渗入血液循环的状态下, 没有与红细胞生成相关的非所希

望的副作用发生。

本发明确定在无血清的条件下生长为极高密度并具有神经特征的无限生长的转化细胞，如 PER.C6，在生产功能性依赖于这些特征的因子中非常有用。这自然还提供了生产这样的因子的可能性，所述因子不具有神经特征或者神经相关功能，但是仍得益于由这种细胞带来的翻译后修饰。技术人员可预想一些因子在非神经组织中也起作用，但仍需要糖基化结构，所述糖基化结构包括例如本发明中针对 EPO 所述的 Lewis x 结构或岩藻糖残基，并且可以通过本发明的方式和方法提供。可以由 PER.C6TM产生并利用 PER.C6TM 细胞的神经特征的因子例如包括但非限于脑型促红细胞生成素，运铁蛋白及上述不同的因子。本发明示出其它重组神经营养性糖蛋白的生产将获益于在这种细胞中发生的脑型修饰是非常有可能的。

本发明令人惊奇地发现每个蛋白质主链的唾液酸残基数平均较低的促红细胞生成素样分子，在治疗和/或预防各种病变中仍有效。这完全开启了迄今认为很少或无法使用的 EPO 和 EPO 样分子的新的使用方式，所述 EPO 或 EPO 样分子包括但非限于在重组哺乳动物细胞系统上产生的 EPO 批次中由于其平均低唾液酸化程度低和/或相关的红细胞生成活性低而在分级分离中放弃的低唾液酸 EPO 部分。因此，本发明证实在大鼠实验性诱导的中风中，具有低唾液酸含量的 EPO 在降低梗死大小方面与具有较高唾液酸含量的 EPO 大致一样强。本领域已经充分确定 EPO 的高唾液酸含量与较长的循环半寿期及在体内红细胞生成潜力增强相关(Tsuda et al. 1990; Morimoto et al. 1996)。

因此，概括而言，本发明提供了促红细胞生成素样分子的组合物在制备药物中的应用，所述促红细胞生成素样分子选自促红细胞生成素，促红细胞生成素的一或多个突变蛋白，促红细胞生成素的一或多个衍生物，及各种程度唾液酸化的促红细胞生成素分子的一或多个部

分的组合物，所述药物治疗选自以下的疾病：缺血，再灌注损伤，缺氧引起的疾病，炎症疾病，神经变性疾病，及中枢或周围神经系统急性损害，其中所述促红细胞生成素样分子的组合物基于蛋白质含量，其体内促红细胞生成活性比 epoetin alfa 和 epoetin beta 低。本发明的实施方案包括组合物及其应用，其中所述体内红细胞生成活性比 epoetin alfa(Eprex)或 epoetin beta 低至少 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 或 90%。促红细胞生成素样分子包括具有与目前已知的 EPO 形式相同或相似的蛋白质主链的分子，例如 EPO 突变蛋白，EPO 衍生物，或者在定性和/或定量方面与蛋白质主链的糖基化不同的 EPO 分子。在此所述突变蛋白是指由促红细胞生成素样分子组成，所述分子在蛋白质主链中由于氨基酸缺失，添加，取代和/或易位而与 epoetin alfa 的蛋白质主链相比具有一或多个突变，而且应包括天然发生的等位基因变体以及遗传和/或化学和/或酶促获得的变体。这种分子仍能授予 EPO 的功能活性。它们可使用本领域技术人员熟知的分子生物学标准技术获得。在此所述衍生物是一种促红细胞生成素样分子，其可得自促红细胞生成素或 epoetin alfa 或者通过化学或酶促修饰的 epoetin alfa 的任何其它功能性突变蛋白。在此所述红细胞生成活性是指 EPO 对人或动物治疗对象中红细胞生成的刺激作用，这可以通过在为人或动物对象使用促红细胞生成素样分子后在某一时间点的血细胞比容值增加而测定（例如见实施例 9），或者测定血红蛋白浓度。这些方法是本领域技术人员熟知的。epoetin alfa 是重组人 EPO 形式，目前以 Eprex™在市场上销售，其与分离自贫血患者尿中的人促红细胞生成素相似或相同（在氨基酸和碳水化合物组成方面）。针对红细胞生成目的的治疗方案已经充分确定。一般而言，在针对 EPO 的红细胞生成活性方面，EPO 剂量以 IU（国际单位）给予。这种 IU 与 EPO 的蛋白质含量相关，但是操作性地加以限定，因此这种关联在不同批次之间可以不同。单凭经验的方法，1 IU 相当于 8-10 ng epoetin alfa。

为对本发明加以描述,促红细胞生成素样分子的红细胞生成活性是以基于蛋白质含量表示从而除去由指定 IU 而引入的变量。本领域技术人员清楚尽管 IU 通常针对商业 EPO 制剂给予,但这种制剂中 EPO 分子的浓度可易于根据标准方法确定。这样使得可以确定相对比活性,例如 IU/g (见例如 EP 0428267)。用于这些目的的一些体内和体外分析也由 Storring 等(1992)加以描述。目前市场上其它形式的 EPO 例如是 Procrit 或 Epogen (均为 epoetin alfa)及 Aranesp (darbepoetin α , 具有额外 N-糖基化位点以提高循环半寿期和促红细胞生成活性的 EPO)。尽管红细胞生成活性在市场上的各种商业 epoetin alfa 和 epoetin beta 制剂之间可有一些变化,但它们一般均经最佳化以达到高红细胞生成活性。本发明揭示了具有低造血或红细胞生成活性的 EPO 样分子或者 EPO 形式的应用,从而降低或避免了非所希望的红细胞生成提高所致副作用。

根据本发明的另一个实施方案,一种促红细胞生成素样分子的组合物的特征在于每个促红细胞生成素样分子的唾液酸残基的平均数与 epoetin alfa 中每个促红细胞生成素分子的唾液酸残基的平均数相比低至少 10%。根据其它实施方案,可以选择与 epoetin alfa 中每个 EPO 蛋白质主链的唾液酸残基的平均数相比,所述唾液酸残基的平均数至少低 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 或 90%。所述促红细胞生成素样分子中唾液酸残基的平均数优选为 epoetin alfa 中每个 EPO 分子的唾液酸残基平均数的 0—90%之间,但精确的百分比可取决于疾病,有时取决于患者,因为一些患者—疾病组合与其它相比对高血细胞比容值的易感性较低。或者,唾液酸残基数可以针对每个 EPO 样分子加以描述,例如每个 EPO 样分子 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 或 0 个唾液酸残基。由于该数值是针对由各种唾液酸化程度的 EPO 样分子组成的组合物进行计算的,因此在所述数值之间的非整数值也可用以描述本发明分子。最佳范围

可以经验性确定而不用给本领域技术人员增加不必要的负担。每个分子的平均唾液酸残基数或者 EPO 的唾液酸含量可以根据公布的本领域技术人员熟知的方法确定。一种可能的方法见 EP 0428267 所述。简而言之，将唾液酸残基通过用 0.35M 硫酸在 80℃ 水解 30 分钟而从 EPO 样分子中裂解，将该溶液用氢氧化钠中和之后进行分析。或者，唾液酸可以根据标准方法通过酶解而除去。EPO 的量使用熟知方法评估，例如通过使用可商购蛋白质分析试剂盒(例如 Bradford assay, Biorad)及使用重组人 EPO 作标准的标准曲线，在 280nm 的吸光度，ELISA，RIA 等方法估定。唾液酸含量可以通过 Jourdain 等(1971)所述方法分析。或者，唾液酸可以使用高效阴离子交换层析使用本领域技术人员熟知的方法分析(例如使用高效阴离子交换层析分析唾液酸，Application note number TN41, Dionex)。唾液酸含量可以表示为摩尔唾液酸/摩尔 EPO，或者唾液酸残基平均数/EPO 样分子。唾液酸残基平均数/EPO 样分子也可以通过测定 pI 的等电聚焦给出(见实施例 4)。

可以设想一些方式以获得每个促红细胞生成素样分子唾液酸残基平均数较低的促红细胞生成素样分子。这些包括但非限于使用特定的殊裂解唾液酸的酶如神经氨酸酶，或者裂解糖基化结构的更多取代基(包括唾液酸)的酶如 N-聚糖酶 F (除去整个 N-聚糖)，内切糖苷酶 F2 (除去双触角结构)，内切糖苷酶 F3 (除去双和三触角结构)等处理例如在任何合适的宿主细胞系中重组产生的 EPO 样分子，或者用化学物质处理 EPO 样分子，所述化学物质包括但非限于导致每个促红细胞生成素样分子的唾液酸残基平均数降低的酸。特别地，高度唾液酸化的 EPO 部分可因此脱唾液酸化并用于本发明中。在另一个实施方案中具有平均数较低的唾液酸分子的 EPO 样分子通过从含有较高和较低唾液酸化的这两种 EPO 的混合物中纯化或分离这种形式而获得。目前使用的生产系统一般产生这种混合物，而且用于红细胞生

成目的的 EPO 通过纯化具有高平均数唾液酸残基的形式而制备。本发明揭示了这个过程的其它部分即具有较低唾液酸残基平均数的 EPO 的应用。纯化或分离这种部分可以使用本领域技术人员熟知的方法进行,如离子交换,亲和纯化等。本发明的促红细胞生成素样分子优选重组产生。这可以在任何合适的表达系统中进行,包括但非限于中国仓鼠卵巢细胞,幼仓鼠肾细胞,人细胞如 HeLa, HEK293 或 PER.C6™。在低等真核细胞如昆虫细胞或酵母中表达也是可能的。具有较低唾液酸含量的 EPO 样分子的生产可以在天然缺乏唾液酸化酶的唾液酸化缺陷细胞系统中进行,如在某些原核宿主中进行,或者通过诱变或遗传修饰本来能产生唾液酸化的蛋白质的宿主。生产重组蛋白质的方式和方法有详细论述且为本领域技术人员已知,而且技术人员清楚在不偏离本发明范围内可以使用不同来源的 EPO 样蛋白。在本发明的一方面中,EPO 样分子是通过本发明方法产生的,从而生产具有预定翻译后修饰的分子。在本发明的另一方面中,包含促红细胞生成素样分子的组合物特征在于促红细胞生成素样分子一旦经肠道外施用于人体或动物,从血流中的清除速度比 epoetin alfa 和 epoetin beta 快。从血流中的清除可以通过本领域熟知的方法测定,例如通过测定蛋白质在血液中的半寿期,如实施例 18 所述。在健康志愿者中,在重复静脉内注射之后 epoetin alfa 的循环半寿期为大约 4 小时。已经有报道在慢性肾功能不全的患者中其半寿期为大约 5 小时,在儿童为大约 6 小时。使用实施例 8 的方法,我们测定了 epoetin alfa(Eprex)的半寿期为 180 分钟。本领域技术人员清楚可以使用该方法测定本发明组合物的半寿期,并将该半寿期以小时或以与标准 EPO(Eprex)的半寿期的百分比表示。在人体中进行相似实验以确定在人体内的半寿期。具有较低四触角结构/双触角结构比率的促红细胞生成素样分子在血浆中半寿期也较短(Misaizu et al, 1995; Takeuchi et al, 1989)。在给出这种较低比率的细胞系中生产 EPO 是切实可行的,或者从含有更

多的四触角结构的形式中纯化这些形式。包含相对较多双触角结构的这种组合物根据本发明也是有用的。还应清楚本发明的一个优势是与目前使用的 EPO 形式如 Eprex, Procrit, NESP 相比, 在循环中可以达到较高的促红细胞生成素样分子最大浓度。如果高浓度的 EPO 样分子是所述治疗所希望的, 则可以通过施用高剂量的本发明组合物达到此目的, 例如以含有这种高剂量的药物制剂形式施用。基于目前使用的 EPO 样分子的蛋白质含量使用相似剂量, 导致较高的红细胞生成, 这是所述治疗非所希望的副作用。

本发明还提供了包含所述促红细胞生成素样分子的药物组合物, 及治疗或预防选自所述一组的疾病的方法, 以及预防和/或治疗人或动物体的促红细胞生成素样分子组合物。

实施例

实施例 1: 在 PER.C6™ 细胞中标记蛋白质的表达的研究

用人腺病毒 5 型的 E1 区域转化并导致产生 PER.C6™ 细胞系(保藏在 ECACC, 保藏号 No.96022940)的细胞衍生自人胚胎视网膜。视网膜一般包含许多不同类型的细胞(至少 55 种不同的神经亚型), 包括神经细胞和成纤维细胞样细胞(Masland 2001)。为追溯 PER.C6™ 的细胞起源, 进行研究以测试标记蛋白在该细胞中或该细胞上的表达。本领域已知这些标记是某些细胞类型和/或组织特异性的。所述标记蛋白示于表 I。

使用标记蛋白的抗体测试标记蛋白表达。在每个实验中, 取阴性对照(不与抗体温育的 PER.C6™ 细胞)和阳性对照。这些阳性对照是已知表达标记蛋白的人体组织切片(表 II)。

将 PER.C6™ 细胞在培养玻片上培养(Life Technologies, Nunc Lab-Tek, Chamber Slide, radiation sterilized, 2 medium chambers, cat. no. 154464A)。将 PER.C6™ 细胞以 65—70% 铺满率种植(2 孔/培养室)

并在 37°C 培养 24 小时 (10%CO₂, 95% 空气)。吸取培养基并将具有细胞的玻片用无菌 PBS 洗涤, 从培养室中取出并在空气中干燥。将细胞通过在丙酮中温育 2 分钟而固定在玻片上。经空气干燥后, 将玻片包装在铝箔中并在低于 -18°C 的温度下冷冻直至使用。

阳性对照组织得自 Academic Hospital Erasmus 大学(Rotterdam, The Netherlands)病理学系为常规使用而制备的组织玻片库。根据常规方法制备冷冻的切片(5 μm)并于丙酮中固定。

初级抗体, 其各自的标记蛋白, 供应商和抗体目录号示于表 III。在表 III 中也详细描述稀释液在磷酸盐缓冲盐水 (PBS), 1%牛血清白蛋白中制备。在室温将所述玻片与初级抗体温育 30 分钟, 用 PBS 漂洗并与二级抗体温育。根据使用的初级抗体的性质, 这些二级抗体是山羊抗兔抗体(DAKO E0432; 1:50 稀释)或者山羊抗小鼠抗体(DAKO E0433; 1:50 稀释)。将所述二级抗体与生物素缀合。在用 PBS 漂洗后, 将玻片与碱性磷酸酶缀合的链亲和素一亲和素/生物素复合物温育(DAKO, K0376)。在温育 30 分钟后, 将样品用 Tris/HCl pH 8.0 漂洗, 在暗室中 30 分钟显色品红底物(DAKO K0624)。随后, 将玻片用自来水漂洗 2 分钟, 根据本领域技术人员熟知的常规方法用苏木精复染。然后, 将玻片经显微镜检并记录标记蛋白表达情况 (阴性或阳性)。结果示于表 IV。针对神经丝染色 (阳性), 由于细胞群的不同细胞周期或者成熟阶段, 不是所有的 PER.C6™ 细胞均染色阳性。这对神经丝染色而言是正常的观测现象。

从获得的数据中推断 PER.C6™ 细胞是神经来源的, 因为所述细胞针对波形蛋白, 突触小泡蛋白, 神经丝, GFAP 和 N-CAM 染色阳性。

实施例 2: PER.C6™-EPO 衍生的 N-聚糖与 Eprex 的单糖组成的对比

定性 PER.C6™ 产生的 N-聚糖结构的第一个步骤是测定各种单糖的摩尔比。单糖分析使用具有脉冲电流检测仪的高效阴离子交换层析 (HPAEC-PAD) 进行。在这个分析中选择在 DMEM 和/或 JRH 培养基中由 PER.C6™ 衍生的克隆 P7, P8 和 C25 产生的 EPO 样品 (P7 和 P8 见 WO 00/63403 所述, C25 根据这些方法一般性产生, 使用新霉素抗性基因作为选择标记[质粒 pEP02001/Neo])。Eprex (Jansen Cilag) 是可商购的重组 CHO-衍生的促红细胞生成素, 对其进行平行分析并因此用作参考。

PER.C6™-EPO 样品使用用 C4 琼脂糖珠填充的层析柱通过亲和层析纯化(床体积为 4ml, Amersham Pharmacia Biotech), 所述珠偶联小鼠单克隆抗 EPO(IgG1)抗体。将结合的 EPO 分子用 0.1 M 甘氨酸-HCl, pH 2.7 洗脱, 所得部分立即通过加入磷酸钠/钾缓冲液 pH 8.0 而中和。随后, 将含有 EPO 的部分集合并利用 Hiprep 26/10 脱盐柱 (Amersham Pharmacia Biotech) 将缓冲液更换为含有 0.1% (v/v) Tween 20 的 20 mM Tris-HCl。

针对聚糖分析, 将纯化的 EPO 样品用 MilliQ 级水透析过夜, 并在 Speedvac 蒸发器中干燥。将干燥的 EPO 样品(39—105μg)溶解于温育缓冲液中(1:1 稀释的 C3 profiling 缓冲液, Glyko)。在加入十二烷基硫酸钠(SDS)和β-巯基乙醇至终浓度分别为 0.1% (w/v) 和 0.3% (v/v) 的基础上, 将样品在 100℃ 变性 5 分钟。随后加入 Nonidet P-40 (BDH) 至终浓度为 0.75% (v/v), 并使用 N-聚糖酶 F(mU, Glyko) 将 EPO 在 37℃ 去糖基化过夜。在去糖基化的基础上, 根据 Packer 等(1998) 所述方法, 使用导电炭黑(Carbograph) SPE 柱(Alltech)从蛋白质, 盐和去污剂中分离出释放的 N-聚糖。

将纯化的 N-聚糖链在 2M 三氟乙酸 (TFA) 中在 100℃ 水解 4 小时。在水解后, 将单糖在 Speedvac 蒸发器中干燥, 用水洗涤并再次在 Speedvac 蒸发器中干燥。将干燥的单糖溶解于 26μl MilliQ 级水中。

在加入用作内标的 6 μ l 脱氧葡萄糖(100 nmol/ml)之后,将样品(24.5 μ l)应用于具有 2mm 直径 CarboPac PA1 柱(Dionex)的 HPAEC-PAD BioLC 系统中。将该柱在 16 mM NaOH (Baker)中以 0.25 ml/min 流速等度走柱。通过与使用由岩藻糖,脱氧葡萄糖,半乳糖胺,葡糖胺,半乳糖和甘露糖组成的单糖标准混合物中获得的曲线相对比计算单糖组成。

单糖分析示出 PER.C6TM-EPO 的糖基化状况明显不同于 Eprex(表 V)。将指定的单糖比率标准化为 3 Man (Man = 甘露糖, Fuc = 岩藻糖, GalNAc = N-乙酰半乳糖胺, GlcNAc = N-乙酰葡糖胺, Gal = 半乳糖)。括号中示出 duplo 值。PER.C6TM-EPO 样品含有显著量的 GalNAc, 而 Eprex 的 N-联糖无此残基。这提示 PER.C6TM-EPO 含有所谓的 LacdiNAc (例如 GalNAc β 1-4GlcNAc)结构。PER.C6TM-EPO 的另一个特点是岩藻糖残基相对丰富,如表 V 所示。这强烈表明 PER.C6TM-EPO 的 N 聚糖结构中存在 Lewis 结构。相反,已知 Eprex 无 Lewis 结构。因此, Eprex 中发现的岩藻糖量可以仅归因于 N 聚糖核心岩藻糖基化。引人注目的是,来自单糖分析的数据还表明培养条件影响 PER.C6TM中 EPO 的糖基化状况。不应断定培养条件仅与生产的蛋白质上存在的预定翻译后修饰相关。当然,细胞系通过存在某些特异性糖基化酶如转移酶应能修饰在这些细胞上生产的蛋白质的翻译后修饰。培养条件可仅发挥附加活性。例如,当在 JRH Excell 525 培养基中(悬浮)培养产生 EPO 的克隆时,发现与衍生自于 DMEM 中培养的(贴壁)细胞的 EPO 的 N 联聚糖相比,前者 EPO 的 N 联聚糖含有较高水平的 GlcNAc, GalNAc, Gal 和 Fuc (表 V)。这种作用在克隆 P8 的情况中特别明显。当细胞在 JRH 培养基中培养时, GlcNAc 水平升高可提示 N 联糖的分支增加和/或 N 联糖含有更多的乳糖胺重复。N-乙酰基葡糖胺化和(N-乙酰)半乳糖基化增加引起岩藻糖受体位点数增加,从而提供了对 Fuc 含量增加的一种解释。

实施例 3: 质谱分析揭示 PER.C6™-EPO 和 Eprex 的 N 聚糖之间的结构差异

为获得 PER.CG 产生的 N 聚糖结构的详细信息,通过 MALDI-MS 分析 PER.C6™-EPO 的完整糖链。针对该分析,利用亲和纯化的 EPO 样品,该样品由 PER.C6™衍生的克隆 P7 和 P8 在 DMEM 中产生,通过阴离子交换层析进一步分级分离(如以下所述)。如实施例 2 所述其缓冲液随后更换为 PBS 而亲和纯化的 PER.C6™-EPO 样品,使用 HiTrap sepharose Q HP 柱(Amersham Pharmacia Biotech)进行阴离子交换层析。通过以下于 20 mM Tris-HCl/20 μ M CuSO₄ 中梯度步骤获得三个 EPO 亚部分,所述梯度开始为 45 mM NaCl (部分 1),随后为 75 mM NaCl (部分 2),最后为 135 mM NaCl (部分 3)。每个梯度步骤持续 10 分钟,流速为 1ml/min。4 轮的部分 1 集合为集合 A,部分 2 集合为集合 B,部分 3 集合为集合 C。所得集合 A, B 和 C 随后利用 HiPrep 26/10 脱盐柱 (Amersham Pharmacia Biotech)脱盐。通过 N-聚糖酶 F 处理 N 联聚糖从 EPO 集合中释放,通过神经氨酸酶处理脱唾液酸化。平行分析 Eprex 以作为参考。各种 EPO 样品的代表性质谱示于图 1A—G: Eprex 及纯化的,分级分离的(来自阴离子交换层析柱的集合 A, B 和 C)。衍生自于 DMEM 中培养的指定克隆的 PER.C6™-EPO 样品用聚糖酶 F 和神经氨酸酶处理,随后通过 MALDI-MS 分析。符号(在 Eprex 的质谱中)含义为:实心方块为 GlcNAc,空心圆为 Man,实心圆为 Gal,空心三角为 Fuc。Eprex 的 N 联糖的质谱(图 1A)相应于以前公布的数据并表明有或无乳糖胺重复的四触角糖在这种 EPO 制剂中占优势。尽管 Eprex 和 PER.C6™-EPO 含有具有相似质量的糖结构(图 1B-G),但后者的糖结构质谱更复杂,提示这些糖展示很大程度的异质性。使用 ExPASy's 计算机程序基于观测的质量预测糖组成(表 VI 和表 VII)。还示出了每

个集合中不同寡糖的相对丰富程度。数据表明衍生自 PER.C6™-EPO 的大多数 N 联寡糖含有多个岩藻糖残基(表 VI 和 VII, 见 dHex 残基的水平)。一些聚糖甚至是四岩藻糖基化 (quadruple-fucosylated) 的。因此, 这些数据符合我们的单糖分析并强烈提示 PER-C6™-EPO 是超岩藻糖基化的, 并因此最可能用具有所谓 Lewis 结构的 N 聚糖广泛装饰。具有 (唾液酸化) Lewis x 表位的寡糖已知是选择蛋白的基本识别序列, 在炎症和免疫应答中均介导细胞之间粘附(Varki et al. 1999), 并在脑糖蛋白中特别发现 (Margolis and Margolis 1989)。因此, 携带这些 Lewis x 结构的众多糖蛋白通过呈现抗炎和免疫抑制活性已经示出具有治疗潜力。在此注意质量信号不能总是明白无误地定位某一糖结构: 例如残基 GlcNAc 和 GalNAc 具有相似质量。因为 PER.C6™-EPO 的单糖分析表明在 N 联糖中出现 GalNAc, 因此预期一些峰表示具有所谓 LacdiNAc (例如 GalNAc β 1-4GlcNAc)结构的 N 聚糖。例如具有 m/z 值为~2038 和~2185 (表 VI 和 VII)的峰更可能表示具有 LacdiNAc 基序的 N-聚糖。否则, 这些峰可表示四触角结构, 其在 GlcNAc 中由于没有 Gal 或 GalNAc 而终止。尽管由于不完全糖基化而可以存在这种结构, 但存在邻近的 Fuc 暗示所述糖含有 Gal 或 GalNAc 残基, 其是形成由岩藻糖基转移酶 (FUT) 识别的基序所必需的, 所述酶催化 Lewis 结构的形成。

不同糖的相对出现情况在衍生自两个独立 PER.C6™ 克隆的 EPO 制剂之间不同, 这通过某些峰的相对高度有差异而判断。特别地, 推定的具有 LacdiNAc 基序的双触角糖(图 1; 表 VI 和 VII, m/z 值为~2038 和~2185)是衍生自 P8 的 EPO 样品中的主要糖, 而在 P7 样品中这些结构较少。在 P7 克隆中, 推定相应于完全半乳糖基化的四触角聚糖的 m/z 值为~2541 的峰是最丰富的结构。这些数据与我们的单糖分析一致, 单糖分析已经表明当在 DMEM 中生长时, P8 产生的 EPO 携带的聚糖与衍生自 P7-EPO 的那些相比分支程度较低(表 V)。

实施例 4: PER.C6TM-EPO 和 CHO-EPO 的唾液酸含量对比

使用具有线性 pH3-10 梯度的 IPG 条带(Amersham Pharmacia Biotech), 通过等电聚焦 (IEF) 分析 PER.C6TM-EPO 的唾液酸含量并与衍生自中国仓鼠卵巢细胞促红细胞生成素(CHO-EPO)对比。在聚焦后, 将 EPO 同种型被动印迹于硝基纤维素上, 使用 EPO-特异性抗体和 ECL 观测 (图 2)。通过等电聚焦分析四种不同 PER.C6TM 克隆(泳道 C, D, E 和 F)和稳定表达 EPO 的三种不同 CHO 克隆(泳道 G, H 和 I)产生的 EPO, 以确定唾液酸含量。将产生 EPO 的 CHO 和 PER.C6TM 细胞系根据 WO 00/63403 所述方法一般产生, 使用新霉素抗性基因作为选择标记。每个条带加样 1000 eU 的 PER.C6TM-EPO 和 500 eU 的 CHO-EPO。使用 500 IU 的 Eprex (泳道 A)和神经氨酸酶处理的(部分脱唾液酸化的) Eprex (泳道 B)鉴别各种 EPO 同种型。在聚焦后, 将 EPO 印迹于硝基纤维素滤膜上, 使用 EPO 和 ECL 的单克隆抗体观测。代表一种可商购的 EPO 的 Eprex 样品是一种含有高度唾液酸化的同种型的配方并用作标记。

结果表明 CHO 细胞能产生含有多达至少 12 个唾液酸/分子的 EPO 同种型 (泳道 G-I), 证实了 Morimoto 等(1996)所述数据。相反, 尽管 PER.C6TM产生具有 8-10 个唾液酸的一些同种型, 但这些表现不足, 且只在延长曝光于胶片后才可检测(泳道 C-F)。因此, 可以推断 PER.C6TM-EPO 的唾液酸化程度比 CHO-EPO 低。

实施例 5: PER.C6TM细胞上 α 1,3-, α -1,6-及 α 1,2-岩藻糖基转移酶活性

细胞的糖基化潜力主要由参与 N 联糖和 O 联糖的逐步生物合成的全部糖基转移酶而决定。这些糖基转移酶的活性在细胞系之间不同, 因此在不同细胞系中产生的糖蛋白获得不同的聚糖。参考在此所示数据, 表明 PER.C6TM-EPO 聚糖是重度岩藻糖基化的, 使用本领域

技术人员已知的方法分析参与 N 联糖合成的众多岩藻糖基转移酶 (FUTs) 的活性 (Van den Nieuwenhof et al. 2000)。在这项研究中, 我们研究了参与 N 聚糖的核心岩藻糖基化的 $\alpha 1,6$ -FUT 的活性, 介导末端半乳糖残基的帽化从而产生所谓的 Lewis y 表位的 $\alpha 1,2$ -FUT 的活性, 及产生 Lewis x 结构的 $\alpha 1,3$ -FUT 活性。为进行对比, 我们还分析了在 CHO 细胞中相应的 FUT 活性。

使用糖基转移酶活性分析测定细胞提取物中指定的各种 FUT 在 PER.C6TM 和 CHO 的活性。该分析测定糖基转移酶催化一种糖 (在这种情况下为岩藻糖) 与糖底物之间的反应。还测定了 GalT 活性作为内对照。数值表示两个实验的平均值。所有数值尤其 PER.C6TM 的那些数值在第二个实验中低 2—3 倍。特别地, 所述活性以 (存在于细胞提取物中) 每 mg 蛋白质表示。因为 PER.C6TM 细胞明显大于 CHO 细胞, 因此 CHO 和 PER.C6TM 细胞的 FUT 和 GalT 活性之间的差异可比它们所表现的大或小。糖基转移酶活性分析的结果示于表 VIII, 表明 PER.C6TM 以及 CHO 均具有明显的 $\alpha 1,6$ -FUT 活性, 提示这两种细胞系均能产生核心岩藻糖基化的聚糖链。然而, $\alpha 1,3$ -FUT 活性只在 PER.C6TM 细胞中明显, 而在 CHO 细胞中难以检测。这两种细胞系无一呈现 $\alpha 1,2$ -FUT 活性。总而言之, 这些数据示出 CHO 和 PER.C6TM 的糖基化潜力之间的差异, 并解释了为什么 PER.C6TM-EPO 与 CHO 产生的 EPO (Eprex) 相比含有更多的岩藻糖。

实施例 6: 存在于 PER.C6TM-EPO 上具有 Lewis x 表位的聚糖

由于 PER.C6TM 具有 $\alpha 1,3$ -岩藻糖基转移酶活性, 但无 $\alpha 1,2$ -岩藻糖基转移酶活性, 因此非常有可能 PER.C6TM 产生含有 Lewis x 而不是 Lewis y 表位的 N 聚糖链。我们使用 Western 印迹, 通过用特异性识别 Lewis x 结构的小鼠单克隆抗体 (抗-Lewis x, 人 IgM; Calbiochem) 标记 PER.C6TM-EPO 而加以核实。将未处理的 (—) 或用 HCl 处理的

(+) 等量 PER.C6TM-EPO (衍生自克隆 P7, 在此标示为 P7.100)和 Eprex 使用本领域技术人员已知的方法在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶上电泳, 并印迹于硝基纤维素膜上。使用单克隆抗体(抗小鼠 IgM, Calbiochem)和 ECL (Amersham Pharmacia Biotech)检测 Lewis x 表位。如图 3 所示, 只有 PER.C6TM-EPO 可用特异于 Lewis x 表位的抗体标记。标示了分子量标记的位置(52, 35 和 29 kDa)。因为 α 1, 3-岩藻糖键是酸不稳定的, 因此该信号在用 HCl 处理后失去。

实施例 7: 在 PER.C6TM细胞表面的 Lewis x 结构表达

为发现 Lewis x 结构是否一般出现于 PER.C6TM细胞中, 我们用 Lewis x 特异性抗体(Calbiochem)标记 CHO 和正常(即不产生 EPO 的) PER.C6TM细胞表面。将细胞与初级抗体(针对 Lewis x 使用 0.16 μ g/ml mAb, 针对唾液酸-Lewis x 使用 5 μ g/ml mAb)温育。使用 FITC 缀合的抗 IgM 作为二级抗体。通过 FACS 分析标记的细胞。虚线表示只与二级抗体温育的细胞的信号(阴性对照)。图 4 所示结果表明 PER.C6TM细胞与不能产生这些结构的 CHO 细胞相反明显用所述抗体标记。我们特别重复观测到 PER.C6TM细胞展示用 Lewis x 抗体染色的一种异质模式。用特异于唾液酸 Lewis x 结构的抗体 (Calbiochem)标记只有在使用非常高浓度的抗体时才提供一个中等阳性信号。

实施例 8: PER.C6TM-EPO (脑型)在体外抑制在低氧条件下培养的 NT2 细胞和 hNT 细胞中的编程性细胞死亡

对比 PER.C6TM-产生的(脑型)EPO 和血清型 EPO 在体外保护大鼠, 小鼠和人皮质神经细胞在低氧和葡萄糖剥夺条件下免于细胞死亡的活性。为此, 如其他人所述从大鼠胚胎中制备神经细胞培养物 (Koretz et al. 1994; Nagayama et al. 1999; White et al. 1996)。为评价 PER.C6TM产生的脑型 EPO 和血清型 EPO 的作用, 将细胞在水夹套温

育器的模块温育室中，在具有 30mM 葡萄糖的无血清的培养基中和增湿的 95%空气/5%CO₂（含氧量正常）中或者在无葡萄糖的无血清培养基和增湿的 95%N₂/5% CO₂(缺氧及葡萄糖剥夺)中，在无或有 30 pM 纯化的 PER.C6™ 产生的脑型 EPO 或 30 pM Eprex 条件下，在 37°C 温育接近 48 小时。将细胞培养物暴露在缺氧和葡萄糖剥夺下少于 24 小时，随后恢复含氧量正常条件 24 小时。通过 Alamar 蓝的荧光性分析胞毒性，其报道的细胞存活力是代谢活性的函数。

在另一个方法中，将神经细胞培养物在含氧正常条件下，在无或有各种浓度纯化的 PER.C6™ 产生的 EPO 或 Eprex 条件下，暴露于 1 mM L-谷氨酰胺或 α -氨基-3-羟基-5-甲基异唑-4-丙酸(AMPA)24 小时。通过 Alamar 蓝的荧光性分析胞毒性，其报道的细胞存活力是代谢活性的函数。用 PER.C6™-EPO 处理的细胞的存活力预期与用 Eprex 处理的细胞存活力相似。

实施例 9：与血清型 EPO 相比，PER.C6™-EPO (脑型)在大鼠中刺激红细胞生成的活性

重组人 EPO 刺激红细胞生成的潜力可以在 Barbone 等(1994)所述啮齿动物模型中监测。根据这个模型，网织红细胞计数增加用作重组人 EPO 制剂的生物活性的测定标准。网织红细胞是红细胞的前体，其应答 EPO 的产生可用作 EPO 刺激红细胞生成的潜力的测定标准。红细胞生成增加导致血细胞比容较高。

在 3 只/组的 6 组 Wag/Rij 大鼠中对比 PER.C6™-EPO 与 Eprex 的活性。将各种剂量的 PER.C6™-EPO (P7-EPO), Eprex 及作为阴性对照的稀释缓冲液在第 0, 1 和 2 天经静脉内注射至阴茎静脉中。施用通过可商购的 EPO 特异性 R & D Elisa 试剂盒确定的 5, 25 或 125eU（Elisa 单位）的 PER.C6™-EPO，而 Eprex 施用剂量为 1 或 5 eU。所有 EPO 制剂均在 PBS/0.05% Tween 80 中稀释为适当浓度，总体积为

500 μ l。在第3天，通过刺破舌取250 μ l的EDTA血样。同一天测定总红细胞群中网织红细胞的百分比。

如图6所示（条形图表示总红细胞群中网织红细胞的百分比），每天为大鼠施用1 eU的Eprex共3天，在第4天与只接受稀释缓冲液的大鼠中网织红细胞计数相比网织红细胞计数明显增加。通过将Eprex剂量增加5倍该网织红细胞计数甚至更高。使用等量的PER.C6TM-EPO，网织红细胞计数明显增加较少。当使用1 eU的Eprex和25 eU的PER.C6TM-EPO时观测到网织红细胞计数相似增加，表明PER.C6TM-EPO在刺激红细胞生成中的活性比Eprex至少低25倍。Eprex与PER.C6TM-EPO在刺激红细胞生成的潜力之间的差异在较高剂量甚至更明显（即5 eU Eprex和125 eU PER.C6TM-EPO）。

实施例10：PER.C6TM-EPO在实验性蛛网膜下腔出血之后对脑缺血的作用

为示出PER.C6TM-EPO在脑缺血期间的神经保护作用比血清型EPO更有效，我们对比了系统性施用PER.C6TM产生的脑型EPO与血清型EPO在兔蛛网膜下腔出血诱导的急性脑缺血模型中的作用。因此，将32只动物分为4组（8只/组）进行研究。

- 1组：蛛网膜下腔出血；
- 2组：蛛网膜下腔出血加上安慰剂；
- 3组：蛛网膜下腔出血加上重组人血清型EPO；
- 4组：蛛网膜下腔出血加上重组PER.C6TM-产生的EPO。

实验性蛛网膜下腔出血通过在将动物麻醉后将其自身血液经皮肤注射入脑大池而产生。在注射后，将兔腹部侧卧位15分钟以使腹部血块形成。在诱导蛛网膜下腔出血后5分钟为2，3和4组的动物分别注射稀释缓冲液，Eprex和纯化的PER.C6TM产生的脑型EPO，并在之后8，16和24小时继续注射。所有注射均经腹膜内施用。稀

释缓冲液由血清白蛋白(2.5 mg/ml), 氯化钠(5.84 mg/ml), 无水柠檬酸(0.057 mg/ml, H₂O)组成。将动物在蛛网膜下腔出血后 24 小时行安乐死, 取出其脑。之后将其脑在冷冻显微切片机中切成 10—25 μ m 的冠状切片, 从前囟开始持续向后直至包括小脑(IrE1And andMacLeod 1993)。为观测及评估缺血诱导的神经元损伤数, 将切片用苏木精和伊红染色。每个高倍显微镜视野下(100 $\times$)含有固缩核的嗜酸性神经元的数目在五个随机选择的在前囟后一些冠状水平获得的侧面皮质切片中确定。

PER.C6TM-EPO 处理的动物与未处理或者用安慰剂处理的动物相比, 预期损伤的神经元数较少。

实施例 11: 在缺氧/再供氧之后促红细胞生成素受体在新生大鼠心肌细胞中的表达

如先前所述(Simpson and Savion 1982), 新生大鼠心肌细胞的原代培养物从 1 天龄的 Sprague-Dawley 大鼠的心室中制备。将心肌细胞在具有<1% O₂ 和 5% CO₂/95% N₂ 的密闭的 Plexiglas 室中, 在 37 $^{\circ}$ C 使用 Gas Pak Plus (BBL)温育 2 小时产生缺氧状态。通过更换用 95%空气和 5%CO₂ 饱和的介质, 将细胞暴露于含氧量正常的气氛中(再供氧)。

将心肌细胞用冰冷的 PBS 洗涤两次, 使用 Trizol (GIBCO)分离, 通过氯仿提取及通过异丙醇沉淀总 RNA。针对 Northern 分析, 将 15 μ g 的总 RNA 在 1.5%甲醛 /MOPS-琼脂糖凝胶上分离, 印迹于硝基纤维素上, 与一个 ³²P 标记的 EPO 受体探针($\pm$ 400 bp cDNA 片段)杂交。在 65 $^{\circ}$ C 在磷酸盐缓冲液 pH7.2 中杂交过夜, 随后在室温在 2 $\times$ SSC 中洗涤 2 次, 在 65 $^{\circ}$ C 在 0.2 $\times$ SSC/0.1% SDS 中洗涤两次及在室温在 2 $\times$ SSC 中洗涤两次。杂交信号通过将此膜在 X 光胶片(Kodak)上曝光而观测。表达水平折算为 GAPDH mRNA 水平。

实施例 12: 脑型 PER.C6™-EPO 和血清型 EPO (Eprex)对在缺氧条件下培养的新生大鼠心肌细胞的编程性细胞死亡的作用

如先前所述(Simpson and Savion1982), 新生大鼠心肌细胞的原代培养物从 1 天龄的 Sprague-Dawley 大鼠心室中制备。通过将心肌细胞在具有<1% O₂ 和 5%CO₂/95% N₂ 的 Plexiglas 密闭室中, 在 37℃用 Gas Pak Plus (BBL)温育 2 小时而产生缺氧状态。通过更换用 95%空气和 5%CO₂ 饱和的介质, 将细胞暴露于含氧量正常的气氛中(再供氧)。实验分成 4 组:

A) 心肌细胞在含氧量正常条件下培养(95%空气/5% CO₂);

B) 心肌细胞在缺氧/再供氧条件下在存在 30 pM 纯化的 PER.C6™产生的 EPO 情况下培养;

C)心肌细胞在缺氧/再供氧条件下在存在 30 pM 纯化的 Eprex 的情况下培养;

D)心肌细胞在缺氧/再供氧条件下在无 EPO 的情况下培养。

所有实验均一式三份进行。编程性细胞死亡通过形态学分析, DNA 梯化及通过末端脱氧核糖核苷酸转移酶介导的 dUTP 切口末端标记 (TUNEL) 而量化。针对形态学分析, 将肌细胞单层用 Hoechst 33324 固定并染色。编程性细胞死亡的形态学特点(细胞收缩, 染色质浓缩, 及片段化) 通过荧光显微镜监测。计数了来自每个平皿 12 个随机选择的区域的至少 400 个细胞。

为确定 DNA 梯化(编程性细胞死亡的特征), 将心肌细胞在裂解缓冲液中裂解并在 2%琼脂糖凝胶中电泳。将该凝胶用溴化乙锭染色, 在紫外光下观测 DNA 片段。使用原位细胞死亡检测试剂盒 (Boehringer Mannheim)通过 TUNEL 进行心肌细胞的编程性细胞死亡原位检测。

实施例 13: PER.C6™-EPO 和血清-EPO 在大鼠心肌缺血/再灌注模型中对梗塞大小的作用

将成熟的雌性 Sprague-Dawley 大鼠(300—400 g)用戊巴比妥钠(20mg/kg IP)和盐酸克他命(ketamine)(60 mg/kg IP)麻醉。将导管插入颈静脉和气管,通过啮齿动物用通气机用 100%氧气保持通气,维持呼出的 CO₂ 在 3.5%—5%之间。行左胸廓切开术,从左冠状动脉起始 3—4mm 处缝合。在缺血前 5 分钟,随机给予动物各种浓度的 PER.C6™-EPO,血清型 EPO 或盐水(6 只/组)。将冠状动脉周围的缝合处系紧开始缺血(30 分钟),随后再灌注 4 小时。除了缝合处不系紧之外,相同制备假手术大鼠(n=6)。

在再灌注后,通过用紫罗兰色专利蓝(5%)和氯化三苯基四唑(TTC)差示染色确定梗塞大小。将冠状缝合带再系紧,经静脉内注射给予紫罗兰色专利蓝以染色心脏的正常灌注区。然后将心脏取出,在冰冷的盐水中水浴,之后切除心房,大血管和右心室。将左心室切成薄片,将未染色的危险区(AAR)从正常灌注的蓝色切片中分离,切成 1—2mm³ 的切片,与 TTC 温育。使用解剖显微镜从 TTC 阳性区(砖红色染色)中分离坏死区(AN,灰白色)。然后将所有心肌区域单独称重并计算梗塞大小。

实施例 14: 分离及分级分离含有高含量 α 1,3-连接的岩藻糖的 PER.C6™-EPO 糖形式

使用岩藻糖特异性 Aleuria aurantia 凝集素(AAL)优先纯化具有高含量 Lewis x 和/或唾液酸-Lewis x 的 PER.C6™-EPO 糖形式(glycoforms)。通过使用特异于人 EPO 的单克隆抗体经亲和柱层析进行(见实施例 2),将由产生 EPO 的 PER.C6™ 细胞分泌入培养基中的 EPO 首先从细胞碎片及其它污染物中分离。之后,将大约 270 μ g(或 27,000 eU)纯化的 EPO 进行第二次层析,其中 EPO 分子以 0.1 ml/分

钟与含有固定 AAL 的柱结合 (AAL Hitrap 柱 1 ml, Bio Med Labs)。携带岩藻糖的 EPO 糖形式通过使用 L-岩藻糖(Sigma)作为与 AAL 结合的竞争剂从该柱中洗脱。通过应用一个于 PBS(Gibco, 含有 154mM NaCl, 1.05 mM KH_2PO_4 及 3.0 mM Na_2HPO_4 , pH = 7.4)中的梯度步骤获得四种 EPO 亚部分, 从 60 μM 岩藻糖开始(部分 1), 随后为 200 μM 岩藻糖 (部分 2), 随后为 400 μM 岩藻糖(部分 3), 最后为 1000 μM 岩藻糖(部分 4)。该梯度的第一个步骤持续 10 分钟, 其它步骤持续 5 分钟, 流速为 0.5 ml/分钟。层析图中 214nm 的 UV 信号示出在每种部分中从柱中洗脱的物质(见图 9)。收集 0.5 ml 部分并集合两或三个峰部分(见图 9)。

将这些部分的缓冲液使用 10kDa microcon (Millipore)更换为 20 mM 磷酸盐, 并将这些部分在相同 microcon 上浓缩为 20-30 μl 。通过 N-聚糖酶 F 处理 N 联聚糖从 EPO 集合中释放, 通过神经氨酸酶处理脱唾液酸化。各种 EPO 样品的代表性 MALDI-TOF MS 谱示于图 10A。还示出了每个集合中不同寡糖的相对丰度(见表 IX)。数据表明从 AAL 柱中较晚洗脱的部分含有相对更多的岩藻糖残基。例如, 较晚从柱中洗脱的部分含有丰富的聚糖, 峰为 2507.9 和 2978.1 Dalton, 其含有 3 或 4 个岩藻糖残基, 而质量为 1891.7 和 2215.8 只含有 1 个岩藻糖残基的聚糖在这些部分中相对未充分表现。因此, 这些部分含有丰富的具有所谓 Lewis x 结构的 N-聚糖。针对这个实验使用 PNGase F 释放及用 MALDI-TOF MS 检测的每个 EPO 分子 N-联聚糖上的 Lewis x 结构的平均数是: 部分 1 为 2.2, 部分 2 为 2.7, 部分 3 为 3.6, 部分 4 为 4.1。起始物质含有每个 EPO 分子 2.6 个 Lewis x 结构。在使用克隆 C25 的一个单独实验中, 获得部分 4 (图 10B 中质谱), 其含有更多的 Lewis x 结构, 每个 EPO 分子 N 联聚糖上有 5.7 个 Lewis x 结构。这个方法使得可以从培养基中纯化促红细胞生成素, 这通过利用翻译后修饰的特异性特征如生产该蛋白质的细胞带来的 Lewis x 结构而进

行。然而这非意味着其它方法不能用于正确纯化具有所述（预定）翻译后修饰的蛋白质。

在部分 4 中洗脱的物质代表 EPO 的一种新形式；其主要含有质量~2185kDa 的 N-联聚糖，其相应于在两个触角上均具有 GalNAc-Lewis x 结构的一个复杂双触角 N-联糖。部分 4 含有大约 8% 的部分 1—4 中洗脱的总 EPO。这表明主要具有双触角 GalNAc-Lewis x 结构的这一新形式 EPO 代表一种低丰度的 EPO，其可以使用上述方法富集。

实施例 15：分离及分级分离具有高含量 LacdiNAc 的 PER.C6™-EPO 糖形式

携带所谓 lacdiNAc 寡糖结构的 PER.C6™-EPO 糖形式通过使用这些 lacdiNAc 结构的单克隆抗体而特异性分离。小鼠单克隆抗体如 99-2A5-B，100-2H5-A，114-2H12-C，259-2A1 和 273-3F2 (Van Remoortere et al. 2000) 特异性识别 lacdiNAc 结构，它们根据本领域技术人员已知的方法纯化及与 CNBr-活化的琼脂糖 4B 珠连接。由人生产 EPO 的 PER.C6™ 细胞分泌入培养基中的 PER.C6™-EPO 首先通过使用特异于人 EPO 的单克隆抗体经亲和柱层析从细胞碎片及其它污染物中粗分离。之后，将纯化的 EPO 进行第二次层析，其中携带 lacdiNAc 结构的 EPO 分子与含有固定的 lacdiNAc-特异性单克隆抗体的柱结合。没有 lacdiNAc 结构的 EPO 糖形式不与该柱结合，在流经液中收集。携带 lacdiNAc 结构的 EPO 糖形式在低 pH 从柱中洗脱，或者使用 GalNAc 或合成的 lacdiNAc 寡糖作为与 lacdiNAc 特异性抗体结合的竞争剂而从柱中洗脱。携带相对高百分比 lacdiNAc 结构的 EPO 糖形式单独从柱中洗脱，这通过在洗脱期间逐步或逐渐提高 GalNAc 或 lacdiNAc 浓度而进行。具有相对高百分比 lacdiNAc 结构的 EPO 糖形式与具有相对低百分比 lacdiNAc 结构的 EPO 糖形式相

比, 在较高浓度的 GalNAc 或 lacdiNAc 下洗脱。根据上述方法, 这个方法也使得可以通过应用翻译后修饰的特异性特征如生产该蛋白质的细胞带来的 Lewis x 和 lacdiNAc 结构而从培养基中纯化促红细胞生成素。

实施例 16: 分离及分级分离具有高含量 GalNAc-Lewis x 的 PER.C6™-EPO 糖形式

携带所谓 GalNAc-Lewis x 寡糖结构的 PER.C6™-EPO 糖形式通过使用这些 GalNAc-Lewis x 结构的单克隆抗体而特异性分离。小鼠单克隆抗体如 114-5B1-A, 176-3A7, 290-2D9-A 和 290-4A8 (Van Remoortere et al. 2000) 特异性识别 GalNAc-Lewis x 结构, 它们根据本领域技术人员已知方法纯化并与 CNBr-活化的 Sepharose 4B 珠连接。由人生产 EPO 的 PER.C6™ 细胞分泌入培养基中的 PER.C6™-EPO 首先通过使用特异于人 EPO 的单克隆抗体经亲和柱层析而从细胞碎片及其它污染物中粗分离。之后, 将纯化的 EPO 进行第二次层析, 其中携带 GalNAc-Lewis x 结构的 EPO 分子与含有固定的 GalNAc-Lewis x 特异性单克隆抗体的柱结合。没有 GalNAc-Lewis x 结构的 EPO 糖形式不与附着于柱的抗体结合, 在流经液中收集。携带 GalNAc-Lewis x 结构的结合的 EPO 在低 pH 从柱中洗脱, 或者使用合成的 GalNAc-Lewis x 作为与 GalNAc-Lewis x 特异性抗体结合的竞争剂而洗脱。携带高含量 GalNAc-Lewis x 的 EPO 糖形式可以单独从柱中洗脱, 这通过在洗脱期间逐步或逐渐提高 GalNAc-Lewis x 竞争剂的浓度而进行。具有高 GalNAc-Lewis x 含量的 EPO 糖形式与具有低含量 GalNAc-Lewis x 的 EPO 糖形式相比, 在较高浓度 GalNAc-Lewis x 洗脱。同样, 根据上述方法, 这个方法也使得可以通过应用翻译后修饰的特异性特征如生产该蛋白质的细胞带来的 Lewis x, lacdiNAc 或 GalNAc-Lewis x 结构而从培养基中纯化 EPO。然而这并

非意味着具有（预定）翻译后修饰的其它修饰不能用于正确纯化蛋白质。

本领域技术人员能意识到，尽管已经例证了关于 EPO 的详细实施例，但本发明不限于生产和/或纯化具有脑型特征的 EPO。通过本发明的方式和方法可以生产发现可用于治疗脑及中枢和周围神经系统的其它部位的病变和/或其它缺血/再灌注损伤的组织的各种其它（人）治疗和/或诊断肽和蛋白质，。

实施例 17: 具有低含量唾液酸的 EPO 与具有高含量唾液酸的 EPO 相比，在大鼠大脑中动脉闭塞后降低梗塞大小中具有相似效力

使用与 Siren 等于 2001 公布的方法相似的方法，在重量为 200—250g 的 F344/Ico 雄性大鼠中研究 PER.C6TM-EPO 和 Eprex 对脑梗塞大小的作用，所述大鼠通过闭塞大脑中动脉(MCA)实验性诱导脑梗塞。将动物的右颈总动脉永久闭塞，而 MCA 使用金属夹可逆性闭塞 60 分钟。将纯化的具有唾液酸平均含量 < 6 个唾液酸/分子的 PER.C6TM-EPO 或者具有唾液酸平均含量大于 9 个唾液酸/分子的 Eprex (Jansen-Cilag; 可商购的 EPO)，在进行 MCA 闭塞之前 5 分钟经静脉内应用，剂量为 5000 eU (ELISA 单位)/kg 体重。特别地，PER.C6TM-EPO 制剂的唾液酸含量在 0—9 个唾液酸/分子范围，而 Eprex 含有 > 8 个唾液酸/分子。在 60 分钟后，去除围绕 MCA 的金属夹结束闭塞。在除去结束夹后通过显微镜观测再灌注情况。24 小时后，使用 MRI 检测存活大鼠的脑部，以揭示表观扩散系数(ADC)和 T2 图。这些图用于量化梗塞值(图 7A 和 7B)。

图 7A 和 7B 所示结果示出与未处理的大鼠相比，用 PER.C6TM-EPO 和 Eprex 制剂处理的大鼠表现相似的梗塞面积缩小。因为 PER.C6TM-EPO 制剂具有比 Eprex 制剂更低的唾液酸含量，因此这个结果表明高唾液酸含量不是 EPO 在体内的神经保护活性所必需

的。

实施例 18：确定 EPO 在大鼠内的半寿期

为确定 Eprex 在体内的半寿期，将雄性 Wag/Rij 大鼠静脉内注射于 PBS/0.05t Tween-80 中稀释的 150 eU Eprex，终体积为 500 μ l。就在施用底物之前，使用 Lab. Animals 34, 372 所述方法取 200 μ l 的 EDTA 血样作为阴性对照。在注射后 5, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360, 420, 480 和 540 分钟，使用同样方法取 200 μ l 的 EDTA 血样。在最后一次取样后，将动物处死。将样品在室温在 760 $\times$ g 离心 15 分钟，在 30 分钟内收集。将血浆样品在 EPO 特异性 Elisa (R & D)中测试以确定每个样品中 EPO 的浓度。

如图 8 所示，血浆中 Eprex 浓度降低显示一种双相曲线，代表分布相和清除相。基于这些结果可以估计 Eprex 在清除相期间半寿期为大约 180 分钟。使用同样方案测定 PER.C6TM-EPO 的半寿期。

实施例 19：在 HT1080 细胞中 E1A 表达对 EPO 糖基化的作用

将 HT1080 细胞用编码腺病毒 5 型 E1A 基因的表达载体(pIg. E1A. neo)或者编码腺病毒 5 型 E1A + E1B 基因的表达载体 (pIg.E1A. E1B; 这两个质粒均见于美国专利 5,994, 128 所述)稳定转染，以确定腺病毒 5 型 E1A 和/或 E1A + E1B 基因的表达对糖基化的作用。为进行一种标记蛋白的糖基化，将细胞用编码 EPO 的表达载体(pEPO2001/neo)共转染。对照 HT1080 细胞仅用 EPO 表达载体转染。

当细胞达到 70—90%铺满时，用脂转染胺试剂(Gibco)进行转染，每 7.85cm² 平皿使用 1.0 μ g pE1A.neo 或者 pE1A.E1B 及 1.0 μ g pEPO2001. neo。将培养基在第 2, 3, 7, 10 和 13 天用含有 DMEM, 1% NEAA (非必需氨基酸, Invitrogen), 250g/ml Geneticin (Gibco)和 10% FBS 的选择培养基置换。用 E1A 稳定转染的 HT1080 细胞进行

的初步实验表明 E1A 表达导致细胞形态改变。与 Frisch 等(1991)所述观测结果相一致, 我们观测到 E1A 基因的 stable 表达诱导一种扁平形态学。根据这个认识, 我们通过挑取扁平的克隆粗选 E1A 表达克隆。在第 14 天挑取克隆并在 37°C/10%CO₂ 条件下在具有选择培养基的 24 孔平板中培养。

当细胞达到亚铺满状态时, 基于培养基中 EPO 的存在选择生产 EPO 的细胞。使用 EPO- 特异性 ELISA(Quantikine®IVD 人 EPO-ELISA, R&D 系统)测定 EPO。按比例扩大生产 EPO 培养物并分析 E1A 表达情况。因此, 将细胞在每 10ml 补加 1 片 Complete Mini 蛋白酶抑制剂(Roche Diagnostics)的裂解缓冲液(1% NP40, 0.5%脱氧胆酸, 0.5% SDS, 150 mM NaCl, 20 mMTris-HCl, pH7.5)中裂解。将裂解物通过在 14,000g 离心 10 分钟而澄清。将等量的(基于蛋白质含量)澄清细胞裂解物在还原条件下通过 10% BisTris 凝胶(NuPAGE, Invitrogen)电泳。之后使用 NuPAGE 的 Trans-Blot 系统(Invitrogen)将蛋白质移至 PDVF 膜(P-Immobilon)上。将印迹在室温用于 TBST 中 5% Protifar (Nutricia)封闭 1 小时或者过夜, 随后与在 5% Protifar/TBST 中 1:400 稀释的单克隆小鼠抗人 E1A IgG2 (克隆 M73, Santa Cruz)在室温温育 1 小时或在 4°C温育过夜。将印迹用 TBST 洗涤, 与在 5% Protifar/TBST 中 1:1000 稀释的过氧化酶缀合的山羊抗小鼠 IgG (Biorad)在室温温育 45 分钟。在用 TBST 洗涤后, 将印迹用 ECL plus 系统染色。55%的 EPO 阳性 E1A 克隆和 68%的 EPO 阳性 E1A.E1B 克隆显示 E1A 的清晰表达(表 X)。高水平表达 E1A 的 HT1080/E1A-EPO 和 HT1080/E1A.E1B-EPO 克隆表现出一种扁平形态(如图 11)。

将 HT1080/EPO, HT1080/E1A-EPO 和 HT1080/E1A.E1B-EPO 克隆产生的 EPO 进行聚糖分析。为此, 将 HT1080/E1A. EPO 克隆 008, HT1080/E1A.E1B.EPO 克隆 072 和 HT1080/EPO 克隆 033 (表 X)种植

在 175 cm² 培养瓶中, 传代数(pn)为 7。24 小时后, 当细胞达到 60—80%铺满时, 用生产培养基(DMEM, 1% NEAA)代替选择培养基。3 天后收获这个培养基并将细胞用裂解缓冲液裂解。根据实施例 2 所述从培养基中纯化 EPO。

通过 N-聚糖酶 F 处理释放各种 EPO 制剂的 N-联聚糖, 随后通过具有脉冲电流检测设备的高效阴离子交换层析(HPAEC-PAD; Dionex)进行分析。在这个特殊的层析系统中, EPO 衍生的聚糖链在碱性条件下基于其电荷而分离。如图 12 所示, HT1080/E1A-EPO 细胞产生的 EPO 的聚糖与对照 HT1080/EPO 细胞产生的 EPO 的聚糖相比电荷较少, 这表明后者细胞产生的 EPO 与 E1A 表达细胞产生的 EPO 相比是更广泛唾液酸化的。关于 N-聚糖结构的更详细信息通过对 EPO 制剂的糖链进行 MALDI-MS 分析而获得。N-链聚糖通过 N-聚糖酶 F 处理从 EPO 制剂中释放, 并通过神经氨酸酶处理而脱唾液酸化。各种代表性 EPO 制剂的质谱见于图 13 所示。使用 GlycoMod 软件(www.expasy.ch/tools/glycomod)基于观测到的质谱预测糖组成(表 XI)。数据示出由对照 HT1080/EPO 细胞产生的 EPO 的聚糖质谱与 HT1080/E1A-EPO 和 HT1080/E1A.E1B-EPO 细胞产生的 EPO 的聚糖质谱不同。质谱表明由后两种细胞产生的 EPO 与对照细胞产生的 EPO 相比具有相对较少的己糖和相对较多的脱氧己糖。另外, 质量相对较低的含有相对高量己糖胺和脱氧己糖胺的聚糖结构在 HT1080/E1A-EPO 和 HT1080/E1A.E1B-EPO 细胞产生的 EPO 中发现。其中有一些在对照细胞产生的 EPO 中不存在。由表达 E1A 和 E1A+E1B 的 HT1080 细胞产生的 EPO 的聚糖质谱与在 PER.C6™细胞中产生的 EPO 的聚糖质谱相似(见实施例 3), 提示由前两种细胞产生的 EPO 的聚糖含有 Lewis x 和 LacdiNAc 结构, 及含有缺乏末端半乳糖的结构。为证实由表达 E1A 和 E1A + E1B 的 HT1080 细胞产生的 EPO 与对照 HT1080 细胞产生的 EPO 相比含有更多的岩藻糖和

GalNAc, 进行单糖分析。为此, N-联聚糖通过 N-聚糖酶 F 神经氨酸酶处理从 EPO 制剂中释放, 随后水解并通过 HPAEC-PAD 分析。图 14 示出 EPO 聚糖的单糖谱, 根据甘露糖的量标准化。数据示出由表达 E1A 和 E1A + E1B 的细胞产生的 N-联聚糖确实具有相对较高量的岩藻糖和 GalNAc。

质谱及单糖数据强烈提示由表达 E1A 和 E1A + E1B 的细胞产生的 EPO 含有多个岩藻糖残基。为支持这些数据, 将 EPO 制剂用裂解末端 α 1-3 和 α 1-4 岩藻糖残基的 α -岩藻糖苷酶(Almond meal)处理。之后, 将样品通过 Maldi-MS 分析并将结果与得自未进行 α -岩藻糖苷酶处理的 EPO 制剂的结果相对比。图 15 示出在经 α -岩藻糖苷酶处理后, 代表具有触角岩藻糖的 N-聚糖的峰降低, 而衍生自这些结构的峰增加。例如, 具有 m/z 值为~2038 和~2184 的峰降低, 而~1892 峰增加。

总而言之, 这些数据示出单独的腺病毒 E1A 或者与 E1B 一起的表达可改变细胞的糖基化状况。观测到的单独 E1A 的表达足以达到这种改变表明 E1A 与这种改变相关。糖基化中的变化典型包括 Lewis x, LacdiNAc 和 GalNAc-Lewis x 结构形成。对许多表达 E1A 和 E1A + E1B 的 HT1080 细胞已经加以定性, 而且这些细胞的大多数产生具有这些特征性聚糖结构的聚糖。然而与 HT1080 亲代细胞产生的聚糖结构相比, 这些结构的丰度发生变化(数据未示出)。聚糖结构的丰度很大程度上与 E1A 的表达相关。这表明糖基化受 E1A 的影响程度很大程度上依赖于 E1A 基因的表达水平。

实施例 20: 对比高剂量的 PER.C6™-EPO 和 CHO-EPO 的造血活性

在大鼠中测定 PER.C6™-EPO 的造血活性并与衍生自中国仓鼠卵巢细胞的 EPO(CHO-EPO)的活性相对比。选择两种 CHO-EPO 制剂: (1) Eprex (Jansen Cilag), 其是一种可商购的具有高唾液酸含量的重组 CHO-EPO, (2) frCHO-EPO, 其是一种具有较低唾液酸含量(与

PER.C6TM-EPO 相似)的 CHO-EPO 制剂(见图 16),其通过 CHO 产生 EPO 并随后通过如实施例 2,3 和 EP0428267 所述的层析方法纯化这些低唾液酸化的同种型而获得。

用 4 组 WAG/Rij 大鼠(6 只/组)进行研究。在阴茎静脉中静脉内注射单剂量的 5000 eU (ELISA 单位,通过可商购的 EPO 特异性 R&D Elisa 试剂盒测定)/kg 体重的 Eprex, frCHO-EPO, PER.C6-EPO 或稀释缓冲液(作为对照)。将所有 EPO 制剂在稀释缓冲液(PBS, 0.03% Tween-80, 0.5%甘氨酸)中稀释为合适浓度,总体积为 500 μ l。4 天后,通过刺破舌取 250 μ l EDTA 血样。同一天使用自动血细胞计数器分析血样的血细胞比容及总红细胞群中网织红细胞的百分比。

测定血细胞比容水平并表示为通过离心血液获得的压积红细胞的体积百分比(图 17)。结果表明 PER.C6TM-EPO 和 frCHO-EPO 不诱导血细胞比容增加,而 Eprex 诱导血细胞比容增加。

如图 18 所示,与只接受稀释缓冲液的大鼠相比,EPO 诱导网织红细胞计数明显增加。Eprex 和 frCHO-EPO 表现相似的刺激,这种刺激显著高于($p < 0.001$) PERC6-EPO 处理的动物。

评估网织红细胞中 RNA 含量使得我们可以确定其成熟程度。幼网织红细胞部分(IRF)示于图 19。Eprex 处理的大鼠与对照大鼠相比显示明显较高的幼网织红细胞百分比。这表明由 Eprex 刺激的网织红细胞形成在注射 4 天后仍在进行。这种作用在 frCHO-EPO 和 PER.C6TM-EPO-分别处理的大鼠中不明显或不存在(图 19)。总而言之,数据示出所有三种 EPO 制剂均诱导网织红细胞形成,然而该作用的持续时间在 Eprex 最长,在 PER.C6TM-EPO 最短,而 frCHO-EPO 显示中等作用。这提示 PER.C6TM-EPO 的低造血作用不只是其低唾液酸含量所致,而且还与其它聚糖特点相关。

实施例 21: 对 PER.C6TM-EPO 的 N-聚糖结构的详细结构分析

由于可存在各种同分异构体,因此通过质谱获得的质量信号不能总是明确指定某一糖结构。为获得 PER.C6TM-EPO 的 N-联聚糖结构的进一步信息,对 PER.C6TM-EPO 进行内切糖苷酶和外切糖苷酶处理。

首先,使用内切糖苷酶 F2。这个酶在高甘露糖的三甘露糖基核心或双触角复合型 N-联聚糖的 GlcNAc 残基之间进行裂解(图 20)。与 PNGase F 相反,内切糖苷酶 F2 不裂解三或四触角聚糖并因此用于区别双触角与三/四触角聚糖结构。图 21 中示出用 PNGase F 或内切蛋白酶 F2 处理的 PER.C6TM-EPO 的 MALDI 谱。当对比这些图谱时,应记住由内切糖苷酶 F2 释放的聚糖比由 PNGase F 释放的聚糖小。这是 GlcNAc 和岩藻糖残基(349 Da)之间的不同,由于酶的裂解位点不同所致(见图 20)。

在 $m/z > 2185$ 的 PNGase F 消化物所观测到的所有结构均是三或四触角结构,因为这些聚糖无一在内切糖苷酶 F2 消化物中观测到。较低质量的即 m/z 1485, 1648, 1689, 1835, 1851, 1997, 2038 和 2185 的大多数结构,在内切糖苷酶 F2 消化中具有相应的峰而且是双触角的。可能也存在一些三或四触角结构的同分异构体,但不是特别多,因为图 21 中两个质谱中峰比在很大程度上类似。内切糖苷酶 F2 消化谱没有相应于 PNGase F 谱中 m/z 1892 和 2054 的峰。这证实这些峰代表非双触角的聚糖,而是分别无或有一个半乳糖残基的四触角聚糖。这些数据证实 PER.C6TM-EPO 含有具有末端 GlcNAc 的聚糖。

接下来使用外切糖苷酶进一步研究 N-聚糖结构。聚糖通过 PNGase F 处理从 PER.C6TM-EPO 中释放并使用神经氨酸酶脱唾液酸化。随后,将样品用以下不同的外切糖苷酶组合处理:

1) β -半乳糖苷酶,其裂解非还原的末端 Gal β 1-4GlcNAc (和 Gal β 1-4GalNAc 及在较高酶比率裂解 Gal β 1-3 键)。

2) 牛肾 α -岩藻糖苷酶,其从 N-和 O-聚糖中裂解 α -2, 3, 4 和 6

连接的岩藻糖。与裂解其它 α -岩藻糖键相比，其更有效裂解 N-联聚糖的三甘露糖基核心上的 α -6 连接的岩藻糖。

3)杏仁粉 α -岩藻糖苷酶，其裂解非还原的末端 α 1-3 或 α 1-4 岩藻糖苷酶残基。

4) β -N-乙酰葡萄糖胺糖苷酶(GlcNAc-ase)，其从复杂的碳水化合物中裂解非还原的末端 β 1-2, 3, 4, 6 连接的 N-乙酰葡萄糖胺。其不裂解 N-乙酰半乳糖胺残基。

图 22 示出 PER.C6TM-EPO 聚糖上预期的键类型。同时进行半乳糖苷酶和岩藻糖苷酶温育，即在岩藻糖苷酶温育期间还存在活性半乳糖苷酶。当半乳糖苷酶和岩藻糖苷酶丧失其活性时，进行进一步 GlcNAc-ase 处理。

在图 23 中，示出的结果是针对半乳糖苷酶处理的。在这个图中给出了质谱中所有峰的 m/z 值和相对强度，其具有 5%或更高的相对强度（即峰高度除以所有峰的总高度）。另外表明了推测的聚糖结构。指定为半乳糖基化结构的峰在经半乳糖苷酶处理后改变，虽然不总是完全改变。当岩藻糖存在于邻近 GlcNAc 残基上时，发现半乳糖苷酶不释放半乳糖。在经半乳糖苷酶处理后似乎出现一些三触角聚糖(m/z 1689)。这是由于污染 GlcNAc-ase 所致，通过使用标准聚糖表明所述酶存在于半乳糖苷酶制剂中（数据未示出）。

然后将半乳糖苷酶处理的聚糖进行岩藻糖苷酶处理(图 24 和 26)。在牛肾岩藻糖苷酶情况中，在质谱的所有峰中均产生一个 146Da 移位。这是岩藻糖残基的质量。由于这个岩藻糖苷酶优选裂解 α -6 连接的岩藻糖残基，而且因为所有峰均只丧失一个 146 Da 单位，因此这表明所有聚糖均含有一个核心岩藻糖。

半乳糖苷酶处理的聚糖集合随后与杏仁粉岩藻糖苷酶温育，给出一个相对简单的谱（图 25 和 26）。所有岩藻糖残基均从触角中除去，仅剩下单独的（核心）岩藻糖基化的聚糖。剩余的末端半乳糖残基也

被除去，因为半乳糖苷酶在岩藻糖苷酶温育期间仍是活性的。在经 GlcNAc-ase 处理脱岩藻糖基化的聚糖后，只剩下 4 个峰。主峰在 m/z 1079 观测到，代表岩藻糖基化的三甘露糖基核心。在 m/z 1485 和 m/z 1891 的峰证实在触角中存在 GalNAc 残基，因为这个残基未被 GlcNAc-ase 除去。在 m/z 1444 的峰证实存在乳糖胺重复：在半乳糖苷酶处理期间半乳糖肯定已经由 GlcNAc 屏蔽。

参考文献

Anchord DT, Brot FE, Bell CE and Sly WS (1978) Human beta-glucuronidase: in vivo clearance and in vivo uptake by a glycoprotein recognition system on reticuloendothelial cells. *Cell* 15: 269

Barbone AG, Aparicio B, Anderson DW, Natarajan J and Ritchie DM (1994) Reticulocyte measurements as a bioassay for erythropoietin. *J Pharm Biomed Anal* 12: 515-522

Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, De Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM and Cerami A (2000) Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 10526- 10531

Buemi M, Allegra A, Corica F, Floccari F, D'Avella D, Aloisi C, Calapai G, Iacopino G and Frisina N (2000) Intravenous recombinant erythropoietin does not lead to an increase in cerebrospinal fluid erythropoietin concentration. *Nephrol Dial Transplant* 15: 422-423

Buerke N, Weyrich AS, Zheng Z, Gaeta FCA, Forrest MJ and Lefer AM (1994) Sialyl Lewis^x-containing oligosaccharide attenuates myocardial reperfusion injury in cats. *J Clin Invest* 93: 1140-1148

Chikuma M, Masuda S, Kobayashi T, Nagao M and Sasaki R (2000) Tissue-specific regulation of erythropoietin production in the murine kidney, brain, and uterus. *Am J Physiol Endocrinol Metabol* 279:E1242-E1248

Dame C, Juul SE and Christensen RD (2001) The biology of erythropoietin in the central nervous system and its neurotrophic and neuroprotective potential. *Biol Neonate* 79: 228-235

Foxall CS, Watson SR, Dowbenko D, Fennie C, Lasky LA et al. (1992) The three members of the selectin receptor family recognize a

common carbohydrate epitope: the sialylLewisX oligosaccharide. *J Cell Biol* 117: 895-902

Goto M, Akai K, Murakami A, Hashimoto C, Tsuda E, Ueda M, Kawanishi G, Takahashi N, Ishimoto A, Chiba H and Sasaki R (1988) Production of recombinant erythropoietin in mammalian cells: host-cell dependency of the biological activity of the cloned glycoprotein. *Bio/Technology* 6: 67-71

Grinnell BW, Hermann RB, Yan SB (1994) Human Protein C inhibits selectin-mediated cell adhesion: role of unique fucosylated oligosaccharide. *Glycobiol* 4: 221-225.

Hoffmann A, Nimtz M, Wurster U and Conradt HS (1994) Carbohydrate structures of β -trace protein from human cerebrospinal fluid: evidence for "brain-type" N-glycosylation. *J Neurochem* 63: 2185-2196

Hoffmann A, Nimtz M, Getzlaff R and Conradt HS (1995) brain-type N-glycosylation of asialo-transferrin from human cerebrospinal fluid. *FEBS Lett* 359: 164-168

Ireland WP and MacLeod WS (1993) A method for finding stereotaxic coordinates from brain sections. *J Neurosci Methods* 49: 93-96

Jourdain GW, Dean L and Roseman S (1971). The sialic acids. XI. A periodate-resorcinol method for the quantitative estimation of free sialic acids and their glycosides.

Juul SE, Harcum J, Li Y and Christensen RD (1997) Erythropoietin is present in the cerebrospinal fluid of neonates. *J Pediatr* 130: 428-430

Konishi Y, Chui D-H, Hirose H, Kunishita T and Tabari T (1993) Trophic effect of erythropoietin and other hematopoietic factors on

central cholinergic neurons in vitro and in vivo. *Brain Res* 609: 29-35

Koretz B, Von B Ahern K, Wang N, Lustig HS and Greenberg DA (1994) Pre-and postsynaptic modulators of excitatory neurotransmission: comparative effects on hypoxia/ hypoglycemia in cortical cultures. *Brain Res* 643:334-337

Lou J, Dayer J-M, Grau GE and Burger D (1996) Direct cell/cell contact with stimulated T lymphocytes induces the expression of cell adhesion molecules and cytokines by human brain microvascular endothelial cells. *Eur J Immunol* 26: 3107-3113

Margolis RU and Margolis RK (1989) *Neurobiology of glycoconjugates*. Plenum Press, New York

Marti HH, Gassmann M, Wenger RH, Kvietikova I, Morganti-Kossmann C, Kossmann T, Trentz0 and Bauer C (1997) Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin in the brain. *Kidney Int* 51: 416-418

Masland RH (2001) The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 4:877-886

Masuda S, Nagao M and Sasaki R (1999) Erythropoietic, neurotrophic, and angiogenic functions of erythropoietin and regulation of erythropoietin production. *Int J Hematol* 70: 1-6

Misaizu T, Matsuki S, Strickland TW, Takeuchi M, Kobata A and Takasaki S (1995) Role of antennary structure of N- linked sugar chains in renal handling of recombinant human erythropoietin. *Blood* 86: 4097-4104

Morimoto K, Tsuda E, Said AA, UchidaE, Hatakeyama S, Ueda M and Hayakawa T (1996) Biological and physicochemical characterization of recombinant human erythropoietins fractionated by Mono Q column

chromatography and their modification with sialyltransferase.

Glycoconjugate J 13: 1013-1020

Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham S, Jin K and Greenberg DA (1999) Cannabinoids and neuroprotection from global and focal cerebral ischemia and in vitro. J Neurosci 19: 2987-2995

Nimtz M, Martin W, Wray V, Kloppel K-D, Augustin J and Conradt HS (1993) Structures of sialylated oligosaccharides of human erythropoietin expressed in recombinant BHK-21 cells. Eur J Biochem 213 : 39-56

Rahbek-Nielsen H, Roepstorff P, Reischl H, WoznyM, Koll H and Haselbeck A (1997) Glycopeptide profiling of human urinary erythropoietin by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. J Mass Spectrom 32: 948-958

Sadamoto Y, Igase K, SakanakaM, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S and Sasaki R (1998) Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. Biochem Biophys Res Commun 253: 26-32

Sasaki R, Masuda S and Nagao M (2001) Pleiotropic functions and tissue-specific expression of erythropoietin. News Physiol Sci 16:110-113

Simpson P and Savion S (1982) Differentiation of rat myocytes in single cell cultures with and without proliferating nonmyocardial cells Circ Res 50: 101-116

Siren A-L, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H and Ghezzi P (2001) Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. Proc Natl Acad Sci USA 98: 4044-4049

Stahl PD, Rodman JS, Miller MJ and Schlesinger PH (1978) Evidence for receptor-mediated binding of glycoproteins, glycoconjugates, and lysosomal glycosidases by alveolar macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 1399

Storring PL and Gaines Das RE (1992) The international standard for recombinant DNA-derived erythropoietin: collaborative study of four recombinant DNA-derived erythropoietins and two highly purified human urinary erythropoietins. *J. Endocrinol.* 134: 459-484

Takeuchi M, Takasaki S, Miyazaki H, Kato T, Hoshi S, Kochibe N and Kobata A (1988) Comparative study of the asparagine-linked sugar chains of human erythropoietins purified from urine and the culture medium of recombinant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 263: 3657-3663

Takeuchi M, Inoue N, Strickland TW, Kubota M, Wada M, Shimizu R, Hoshi S, Kozutsumi H, Takasaki S, and Kobata A (1989) Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in Chinese hamster ovary cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 7819-7822

Takeuchi M and Kobata A (1991) Structures and functional roles of the sugar chains of human erythropoietins. *Glycobiol* 1: 337-346

Toyoda T, Itai T, Arakawa T, Aoki KH and Yamaguchi H (2000) Stabilization of human recombinant erythropoietin through interactions with the highly branched N-glycans. *Japan Biochem Soc* 128: 731-737

Tsuda E, Goto M, Murakami A, Akai K, Ueda M, Kawanishi G, Takahashi N, Sasaki R, Chiba H, Ishihara H, Mori M, Tejima S, Endo S and Arata Y (1988) Comparative structural study of N-linked oligosaccharides of urinary and recombinant erythropoietins.

Biochemistry 7: 5646-5654

Tsuda E, Kawanishi G, Ueda M, Masuda S and Sasaki R (1990) The role of carbohydrate in recombinant human erythropoietin. *Eur J Biochem* 188: 405-411

Van den Nieuwenhof IM, Koistinen H, Easton RL, Koistinen R, Kamarainen M, Morris HR, Van Die I, Seppala M, Dell A and Van den Eijnden DH (2000) Recombinant glycodeclin carrying the same type of glycan structures as contraceptive glycodeclin-A can be produced in human kidney 293 cells but not in Chinese hamster ovary cells. *Eur J Biochem* 267: 4753- 62

Van Eijk HG, Van Noort WL, DubElAarM-L and Van der Heul C (1983) The microheterogeneity of human serum transferrins in biological fluids. *Clin Chim Acta* 132:167-172

Van Reemoortere A, Hokke CH, Van Dam GJ, Van Die I, Deelder AM and Van den Eijnden DH (2000) Various stages of *Schistosoma* express Lewis x, LacdiNAc, GalNAc β 1-4 (Fuc α 1-2Fuc α 1-3) GlcNAc carbohydrate epitopes: detection with monoclonal antibodies that are characterized by enzymatically synthesized neoglycoproteins. *Glycobiol* 10: 601-609

Wasley LC, Timony G, Murtha P, Stoudemire J, Dorner AJ, Caro J, Krieger M and Kaufman RJ (1991) The importance of N- and O-linked oligosaccharides for the biosynthesis and in vitro and in vivo biological activities of erythropoietin. *Blood* 77: 2624-2632

Watson E, Bhidé A and Van Halbeek H (1994) Structure determination of the intact major sialylated oligosaccharide chains of recombinant human erythropoietin expressed in Chinese hamster ovary cells. *Glycobiol* 4: 227- 237

White MJ, DiCaprio MJ and Greenberg DA (1996) Assessment of neuronal viability with Alamar blue in cortical and granule cell cultures. *J Neurosci Meth* 70: 195-200

Wiessner C, Allegrini PR, Ekatodramis D, Jewell UR, Stallmach T and Gassmann M (2001) Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab* 21:857-864

Wong D, Prameya R and Dorovini-Zis K (1999) In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selection and PECAM-1. *J Neuropath Exp Neurology* 58: 138-152

表 I

标记蛋白	描述
Pan-keratin	检测几乎全部细胞角蛋白 标记角化角膜表皮, 内部器官的复层扁平上皮, 复层上皮, 过度增殖的角质细胞以及简单上皮
EMA	上皮膜抗原 标记正常和肿瘤性转化上皮
S100	EF 带型 Ca^{2+} 结合蛋白 在神经组织和其它组织中表达
波形蛋白	细胞骨架中间丝 (= 结构蛋白) 是源自间充质的细胞的通用标记 在骨骼肌发育过程中表达
结蛋白	细胞骨架中间丝 (= 结构蛋白) 在骨骼肌发育过程中表达
s.m.肌动蛋白	平滑肌细胞肌动蛋白 染色平滑肌细胞和肌上皮细胞
突触泡蛋白	与神经内分泌细胞反应
嗜铬粒蛋白	在内分泌、神经内分泌和神经组织的分泌粒中广泛表达的酸性糖蛋白
NSE	神经元特异性烯醇化酶
神经丝	与磷酸化神经丝蛋白反应并标记神经过程和周围神经以及 symphataetic ganglion 细胞和肾上腺髓质
GFAP (polycon)	胶质原纤维酸性蛋白 GFAP 特异性地在对神经学攻击高度反应的星形胶质中发现。发现 Astroglisis 是机械外伤、艾滋病性痴呆和朊病毒感染的结果, 并伴有 GFAP 表达的增加。用于定位中枢神经系统中良性星形细胞和胶质来源的增生性细胞的免疫组织化学标记
CD31	与 PECAM-1 反应 存在于血小板、单核细胞、粒细胞、淋巴细胞、内皮细胞上
CD34	识别 O-糖基化跨膜糖蛋白 在造血干细胞、血管 EC、胚胎成纤维细胞、胎儿成人神经组织的一些细胞上表达
N-CAM	神经元细胞粘着分子 N-CAM 参与生长过程中的细胞-细胞相互作用

表 II

标记蛋白	对照组织
Pan-keratin	结肠癌
EMA	结肠癌
S100	胰腺
波形蛋白	扁桃体
结蛋白	结肠
s.m.肌动蛋白	扁桃体
突触泡蛋白	胰腺
嗜铬粒蛋白	胰腺
NSE	胰腺
神经丝	结肠
GFAP (polycon)	脑
CD31	结肠
CD34	扁桃体
N-CAM (CD56)	结肠

表 III

标记蛋白	供应商	抗体	目录号	抗体稀释度
Pan-keratin	Biogenex	小鼠 IgG1	MU071-UC	1:200
EMA	Dako	小鼠 IgG2a	M0613	1:50
S100	Dako	兔	Z0311	1:3000
波形蛋白	Biogenex	小鼠 IgG1	MU074-UC	1:3200
结蛋白	Sanbio	小鼠 IgG	MON 3001	1:50
s.m.肌动蛋白	Biogenex	小鼠 IgG2a	MU128-UC	1:150
突触泡蛋白	Dako	小鼠 IgG1	M0776	1:50
嗜铬粒蛋白	Biogenex	小鼠 IgG1	MU126-UC	1:150
NSE	Dako	小鼠 IgG1	M0873	1:250
神经丝	Sanbio	小鼠 IgG	MON 3004	1:300
GFAP (polycon)	Dako	小鼠 IgG1	M0761	1:200
CD31	Dako	小鼠 IgG1	M0823	1:60
CD34	Biogenex	小鼠 IgG1	MU236-UC	1:20
N-CAM (CD56)	Neomarkers	小鼠 IgG1	MS.204.P	1:10

表 IV

标记蛋白	记录
Pan-keratin	阴性
EMA	阴性
S100	阴性
波形蛋白	阳性
结蛋白	阴性
s.m.肌动蛋白	阴性
突触泡蛋白	阳性
嗜铬粒蛋白	阴性
NSE	阴性
神经丝	阳性
GFAP (polycon)	阳性
CD31	阴性
CD34	阴性
N-CAM (CD56)	阳性

表 V

克隆及培养 条件	标准化为 3 个甘露糖残基的中性单糖的摩尔比				
	Man	Fuc	GalNAc	GlcNAc	Gal
P8-DMEM	3	0.5(0.9)	0.4(0.4)	2.2(2.7)	1.7(1.3)
P8-JRH	3	1.5(1.4)	0.7(0.8)	6.1(6.4)	3.5(3.9)
P7-DMEM	3	1.5(1.4)	0.4(0.3)	5.5(6.1)	2.3(3.3)
P7-JRH	3	1.8(1.7)	0.4(0.4)	6.1(6.8)	3.6(4.2)
C25-DMEM	3	2.0	1.0	6.0	2.2
Eprex	3	0.7	-	5.4	4.1

表VI

P7 质量 (m/z)	总数百分比			比例 Hex:HexNAc:dHex
	集合A	集合B	集合C	
1809.64	2.34	2.99	2.44	5:4:1
1850.67	2.57	5.31	2.49	4:5:1
1891.69	5.06	10.39	1.31	3:6:1
1955.70	-	1.95	2.16	5:4:2
1996.72	6.37	7.96	6.38	4:5:2
2037.75	6.33	5.16	5.39	3:6:2
2053.74	3.70	4.11	1.98	5:5:1
2142.78	2.19	3.68	2.45	4:5:3
2174.77	6.53	3.63	8.04	6:5:1
2183.81	6.69	5.02	7.57	3:6:3
2199.80	3.78	4.65	1.58	4:6:2
2215.80	4.13	4.95	4.15	5:6:1
2256.82	-	1.30	-	4:7:1
2320.83	2.54	2.04	3.29	6:5:2
2361.86	4.35	3.30	3.23	5:6:2
2377.85	3.77	3.79	2.86	6:6:1
2507.91	1.62	2.32	1.32	5:6:3
2523.91	2.09	2.60	1.61	6:6:2
2539.90	11.89	4.81	19.32	7:6:1
2580.93	3.32	1.53	1.69	6:7:1
2612.94	-	-	1.78	6:5:3
2669.97	1.95	2.34	-	6:6:3
2685.96	6.21	3.11	5.81	7:6:2
2726.99	1.62	1.38	1.36	6:7:2
2832.02	3.64	1.55	3.08	7:6:3
2905.04	1.79	-	2.45	8:7:1
2978.08	2.23	1.65	-	7:6:4

表VII

P8 质量(m/z)	总数百分比			比例 Hex:HexNAc:dHex
	集合A	集合B	集合C	
1809.64	-	1.03	-	5:4:1
1850.67	3.36	2.05	-	4:5:1
1891.69	5.11	2.11	3.04	3:6:1
1955.70	1.46	1.22	1.08	5:4:2
1996.72	5.05	4.61	6.54	4:5:2
2012.72	1.34	1.38	1.35	5:5:1
2037.75	14.62	14.34	12.48	3:6:2
2053.74	3.73	2.76	4.29	4:6:1
2142.78	2.57	1.97	2.06	4:5:3
2158.78	1.43	1.91	-	5:5:2
2174.77	2.40	2.53	5.58	6:5:1
2183.81	16.91	15.79	14.90	3:6:3
2199.80	1.74	3.18	4.90	4:6:2
2215.80	4.23	4.20	3.08	5:6:1
2256.82	2.08	3.04	2.17	4:7:1
2320.83	1.67	1.88	2.23	6:5:2
2361.86	3.25	2.25	3.02	5:6:2
2377.85	1.50	1.84	2.73	6:6:1
2402.88	2.05	2.20	4.26	4:7:2
2418.88	0.97	1.54	-	5:7:1
2466.89	1.03	-	-	6:5:3
2507.91	2.04	2.48	-	5:6:3
2523.91	1.58	1.73	1.47	6:6:2
2539.90	2.48	4.79	9.56	7:6:1
2548.94	1.26	1.14	0.66	4:7:3
2580.93	1.87	2.07	2.48	6:7:1
2685.96	2.74	3.39	4.30	7:6:2
2726.99	2.55	3.12	-	6:7:2
2768.01	1.35	-	-	5:8:2
2832.02	2.14	3.06	1.91	7:6:3
2873.05	1.70	1.81	1.63	6:7:3
2889.04	1.14	0.67	-	7:7:2
2978.08	0.89	0.99	2.39	7:6:4
3019.10	1.09	1.26	-	6:7:4

表 VIII

FT 活性

(nmol/hr/mg 蛋白质)

	α 1,2 FT	α 1,3 FT	α 1,6 FT	GalT
CHO	<0.01	0.03	4.31	12.5
PER.C6	<0.01	0.65	3.62	3.41

表 IX

质量 (m/z)	Hex	HexNAc	dHex	部分1	部分2	部分3	部分4
1631.6	3	4	2	ND	ND	ND	1.16
1688.6	3	5	1	3.22	3.09	2.22	2.82
1793.7	4	4	2	1.29	1.15	ND	0.83
1809.6	5	4	1	ND	1.50	2.10	2.82
1834.7	3	5	2	1.71	1.77	1.73	1.41
1891.7	3	6	1	10.98	7.96	5.19	4.31
1955.7	5	4	2	0.86	3.36	0.87	1.33
1996.7	4	5	2	2.40	2.65	2.47	2.32
2037.8	3	6	2	4.03	4.86	4.82	3.65
2053.7	5	5	1	6.43	5.39	3.89	2.65
2101.8	5	4	3	1.29	1.55	ND	DN
2142.8	4	5	3	1.71	2.03	1.36	2.98
2174.8	6	5	1	1.29	1.95	1.36	0.00
2183.8	3	6	3	8.57	11.05	16.44	22.54
2199.8	4	6	2	4.54	5.04	4.94	3.81
2215.8	5	6	1	5.66	4.60	2.84	2.32
2256.8	4	7	1	1.97	1.77	0.87	1.33
2320.8	6	5	2	1.03	1.27	0.87	1.49
2361.9	5	6	2	4.46	4.86	4.39	3.31
2377.9	6	6	1	5.23	2.21	2.10	1.66
2507.9	5	6	3	1.65	1.68	3.71	5.47
2523.9	6	6	2	3.43	2.21	2.22	1.82
2539.9	7	6	1	10.72	6.19	4.94	4.47
2580.9	6	7	1	2.14	2.21	1.85	1.16
2670.0	6	6	3	0.86	1.68	2.47	2.82
2686.0	7	6	2	6.69	6.90	5.93	3.81
2727.0	6	7	2	2.70	3.36	2.72	1.82
2832.0	7	6	3	2.83	4.60	6.43	3.81
2873.1	6	7	3	1.29	1.55	4.57	2.98
2978.1	7	6	4	1.03	1.55	3.58	3.73
3019.1	6	7	4	ND	ND	2.47	2.90
3124.1	7	6	5	ND	ND	0.62	2.49

表 X

	克隆	形态学	E1A 表达
E1A.EPO 克隆	004	扁平	++
	008*	扁平	++
	025	扁平	+++
	028	小针状	-
	034	扁平	±-
	056	扁平+亲本的	-
	062	扁平	+++
	066	扁平	++
	076	亲本的	-
E1A.E1B.EPO 克隆	002	扁平	++
	003	扁平+亲本的	++
	005	扁平	++
	023	扁平	+++
	025	扁平+亲本的	-
	026	扁平	+++
	028	扁平+亲本的	+
	031	扁平	+
	033	扁平	+++
	035	亲本的	-
	049	扁平	++
	051	扁平+亲本的	+
	057	扁平, 不规则	+
	058	扁平	++
	062	扁平	++
	067	扁平	++
	072*	扁平, 不规则	++
	076	扁平	+++
	077	扁平	+++

表XI

[M+Na] ⁺	1647.6	1809.6	1891.7	1996.7	2037.8	2174.8	2183.8	2215.6	2361.9
HexNAc	2	2	4	3	4	3	4	4	4
Hex	1	2		1		3		2	2
dHex				1	1		2		1
推测的结构									
克隆 033						11%			
克隆 008	2%	2%		1%	4%	4%	8%	4%	3%
克隆 072		1%	6%	2%	9%	4%	8%	2%	2%
其它可能结构									

[M+Na] ⁺	2377.9	2402.9	2539.9	2580.9	2686.0	2727.0	2832.0	2873.1	2905.0
HexNAc	4	?	4	5	4	5	4	5	5
Hex	3		4	3	4	3	4	3	5
dHex					1	1	2	2	
推测的结构									
克隆 033	3%		78%		4%				4%
克隆 008		3%	28%	6%	14%	6%	8%	3%	3%
克隆 072		3%	26%	11%	9%	7%	6%	3%	2%

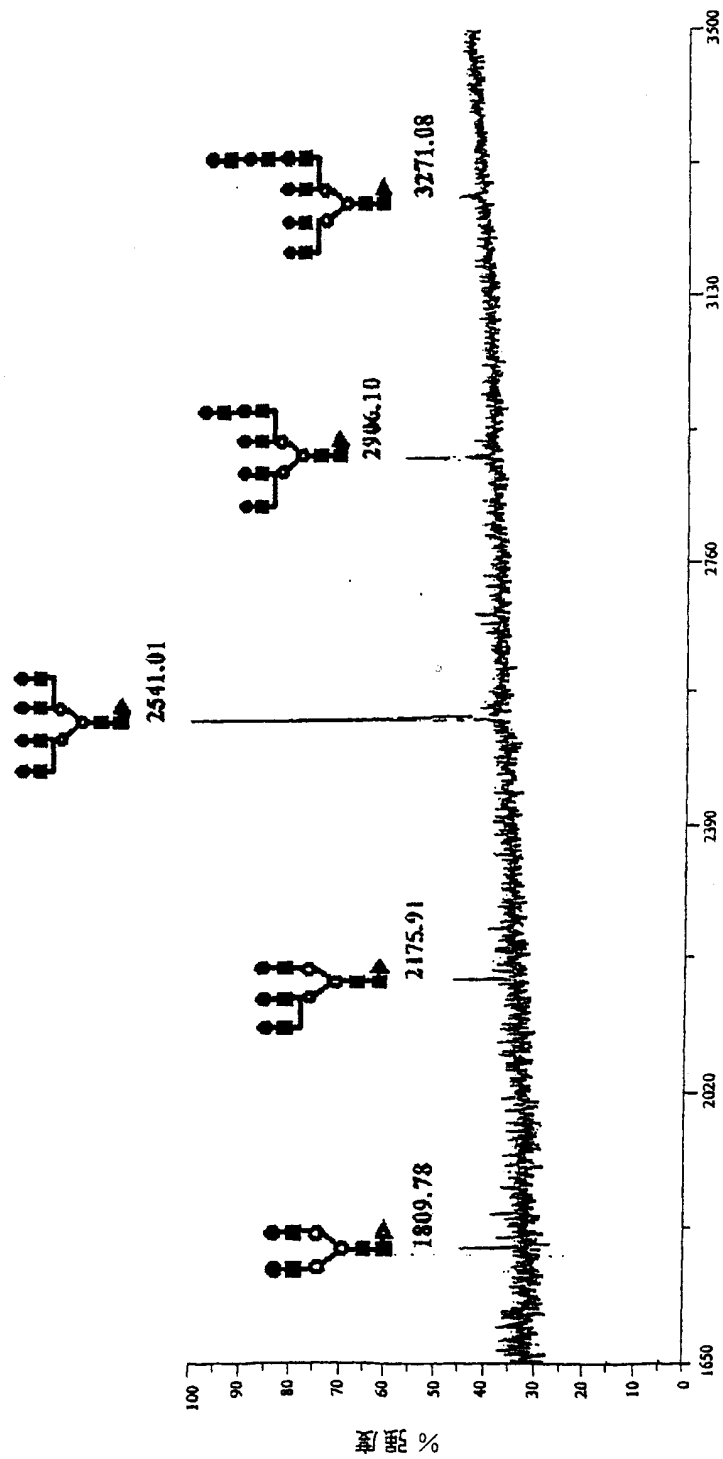


图1A

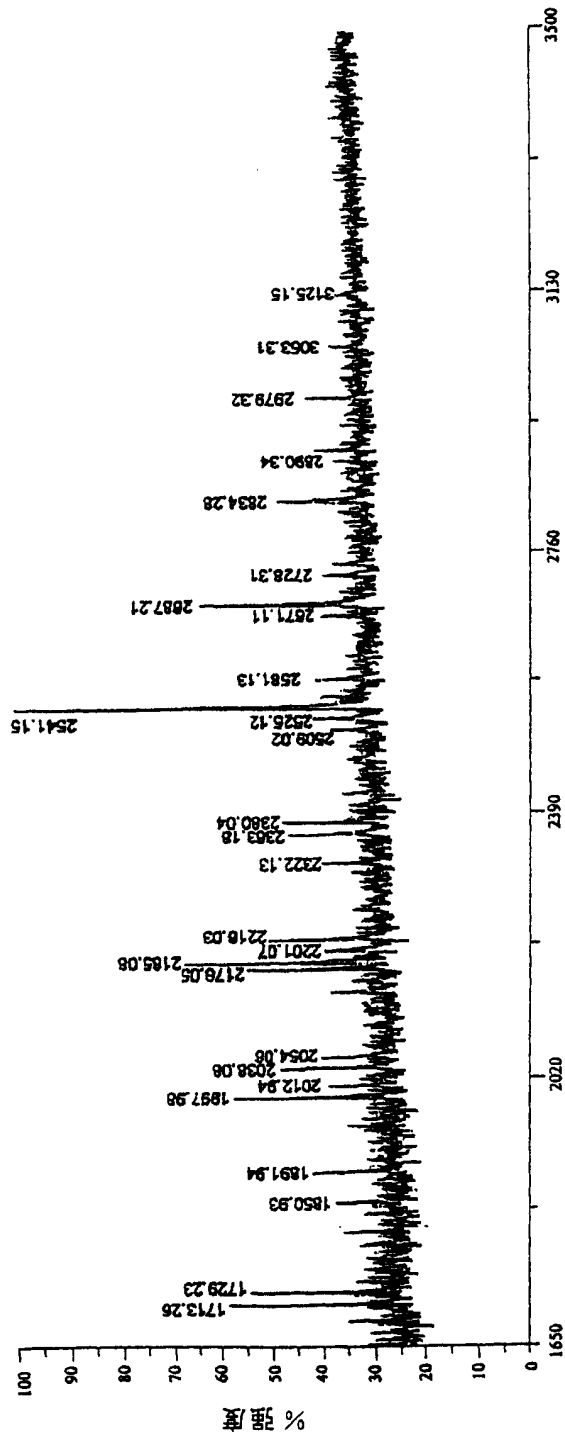
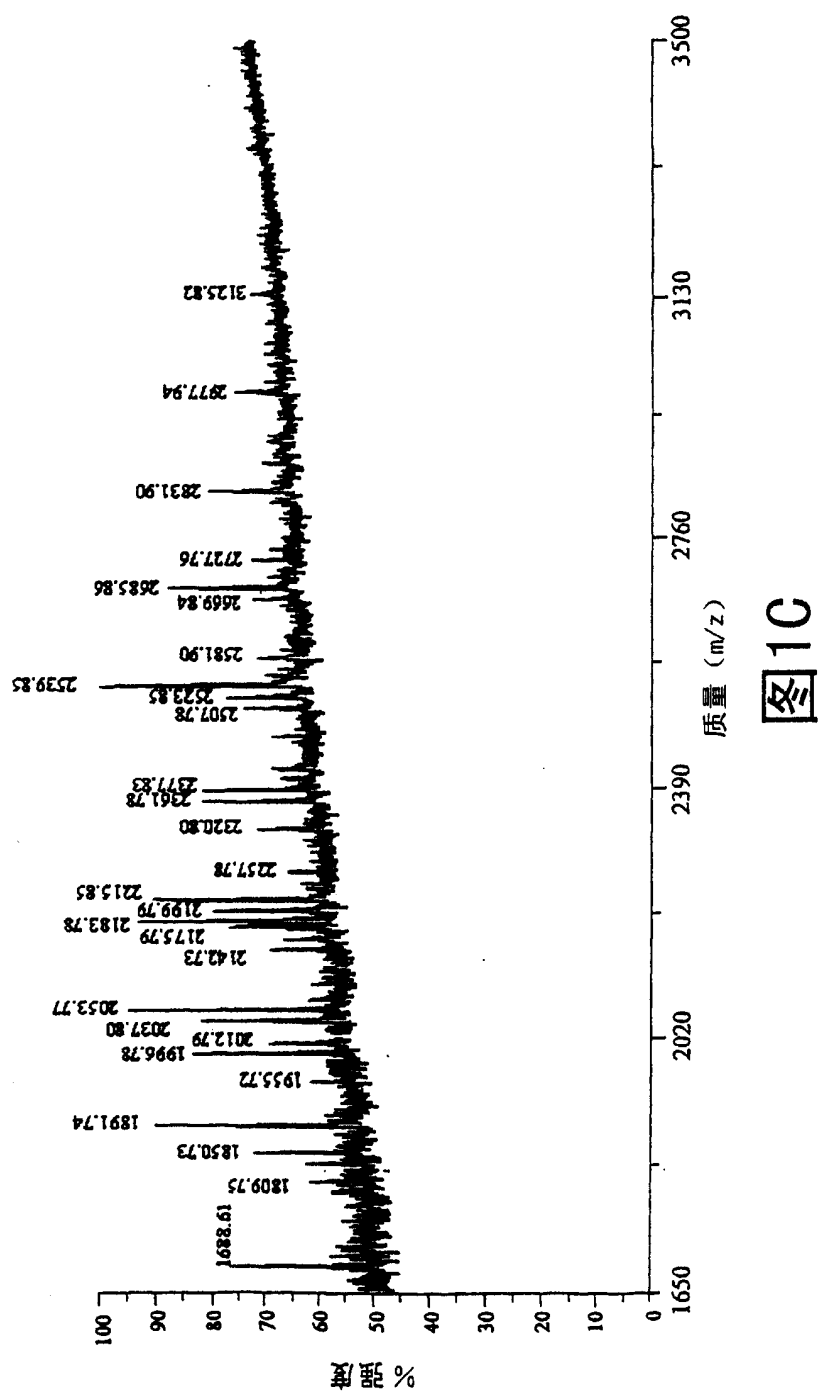


图1B



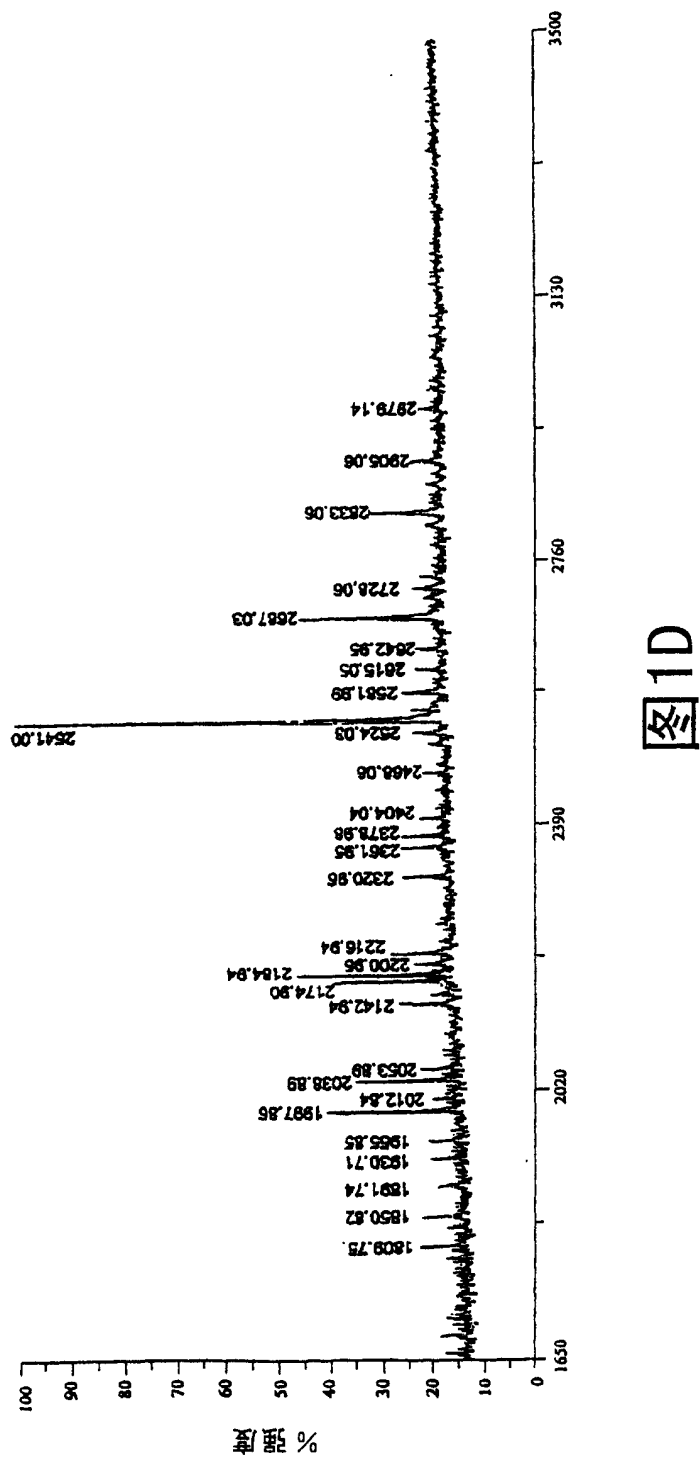
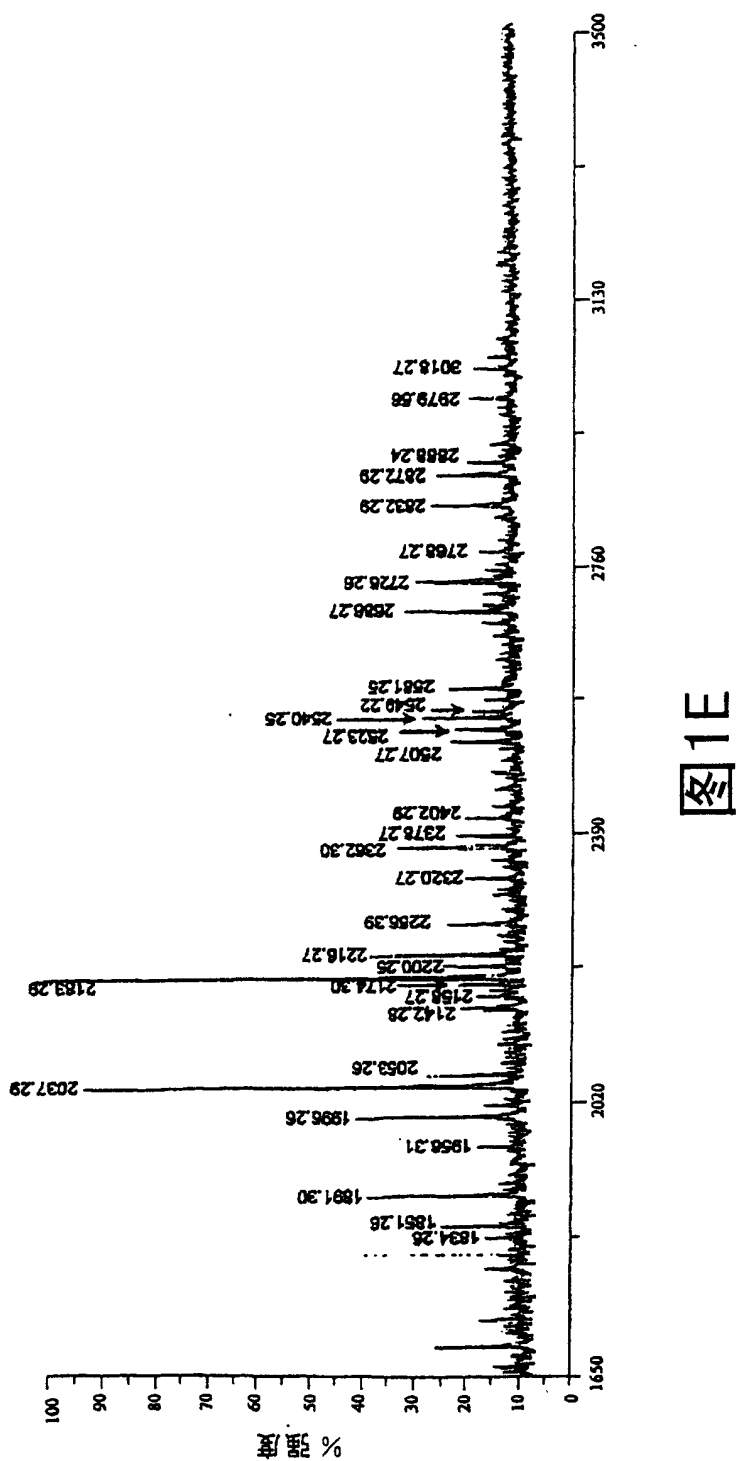


图1D



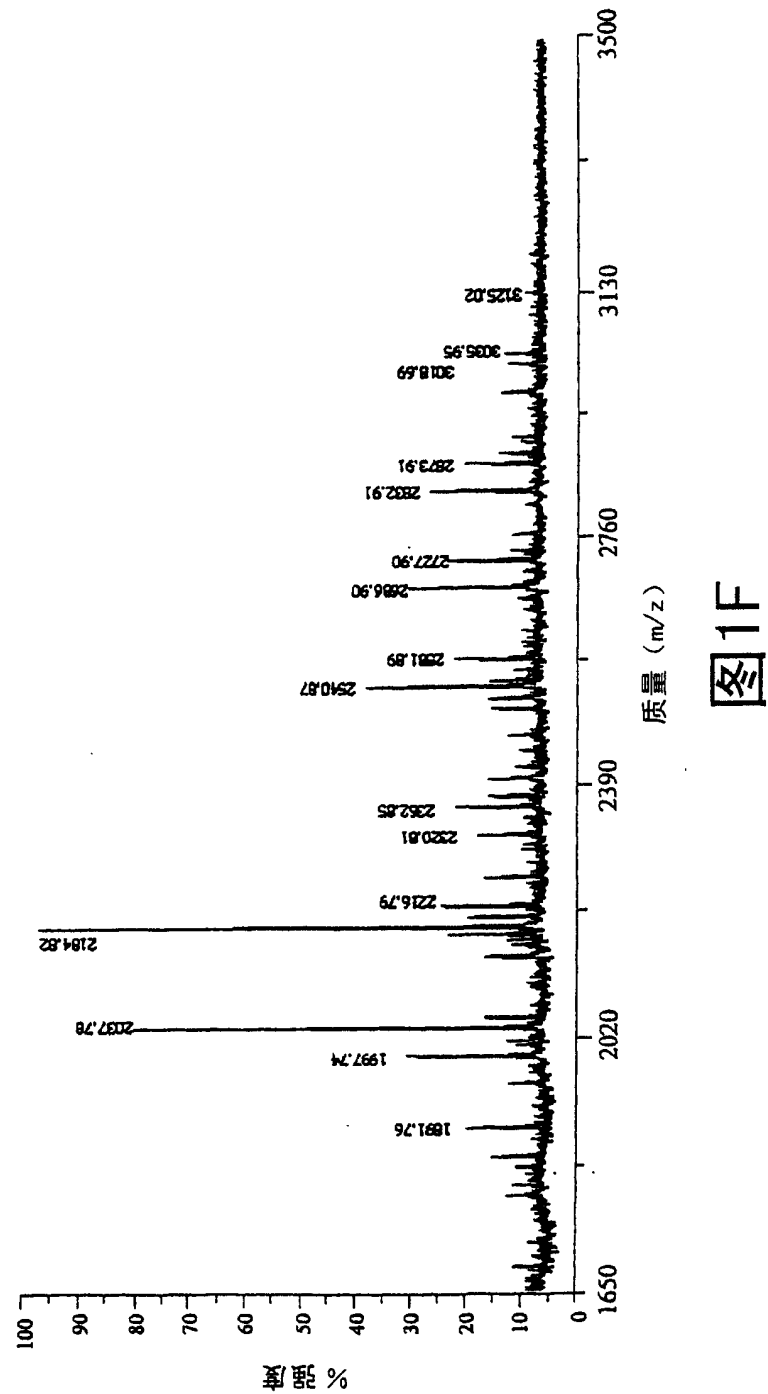
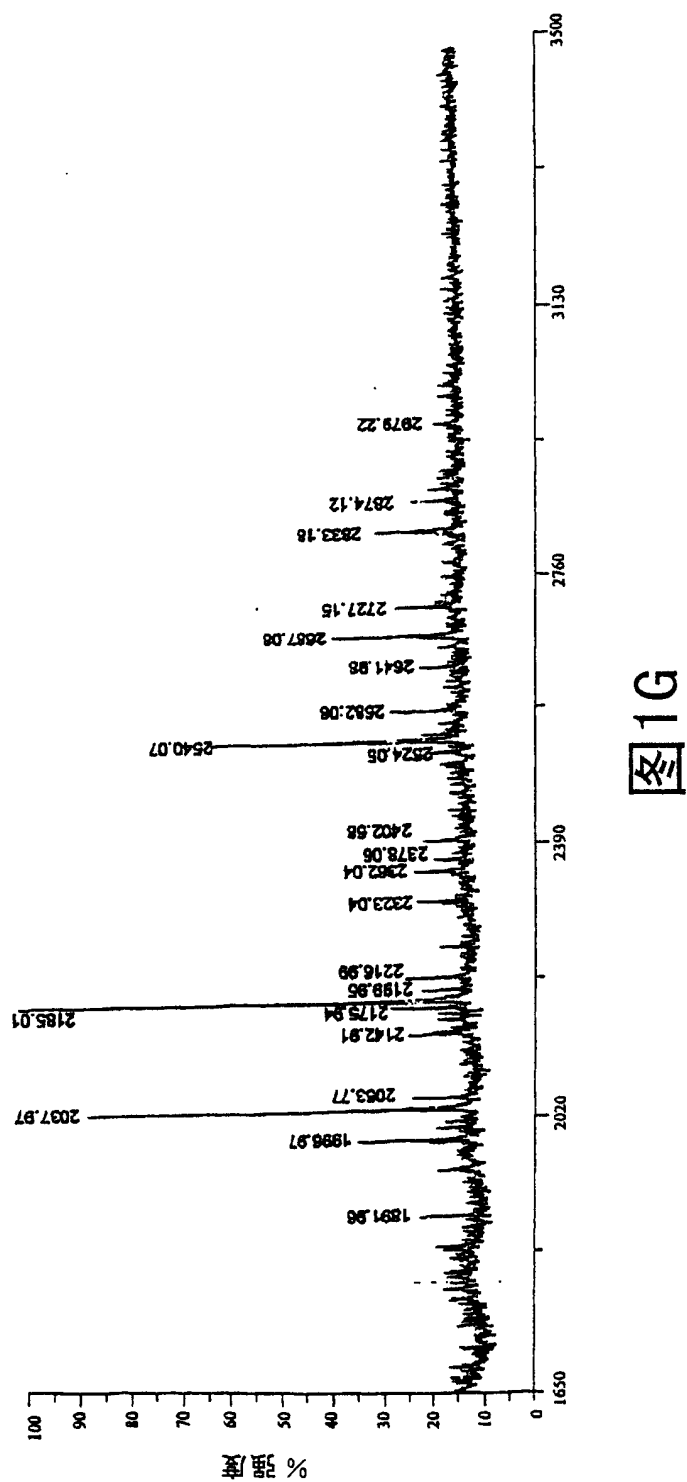


图1F



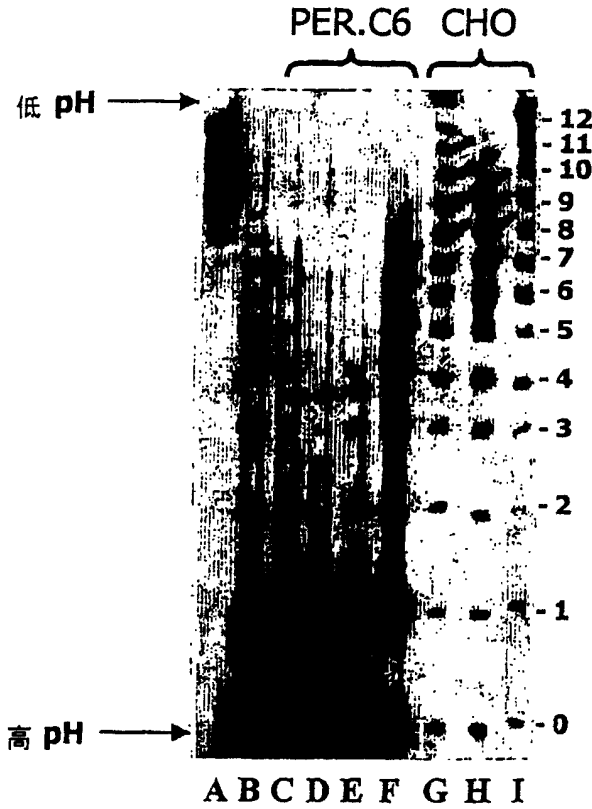


图2

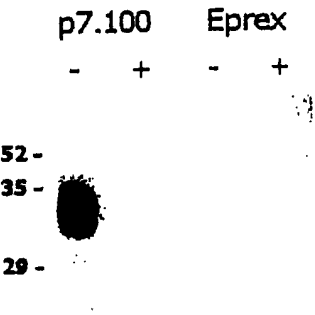


图3

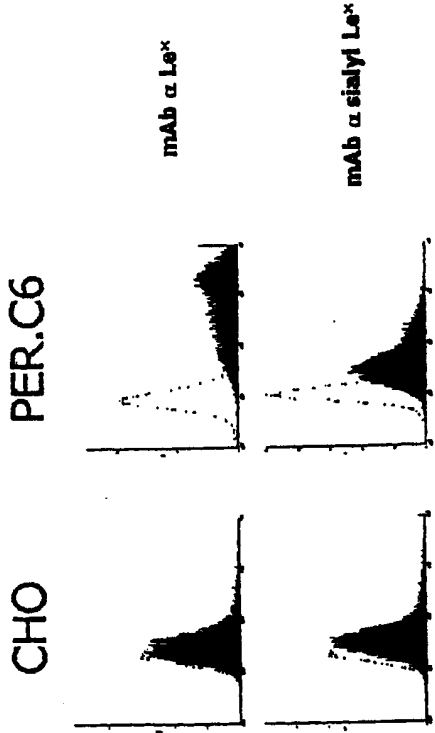
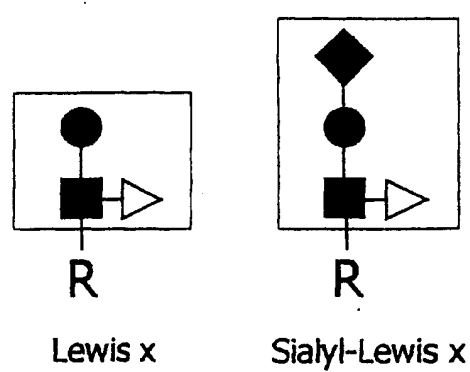


图4



- 唾液酸
- 半乳糖
- N-乙酰葡萄糖胺
- 岩藻糖
- R N-联糖亚结构

图5

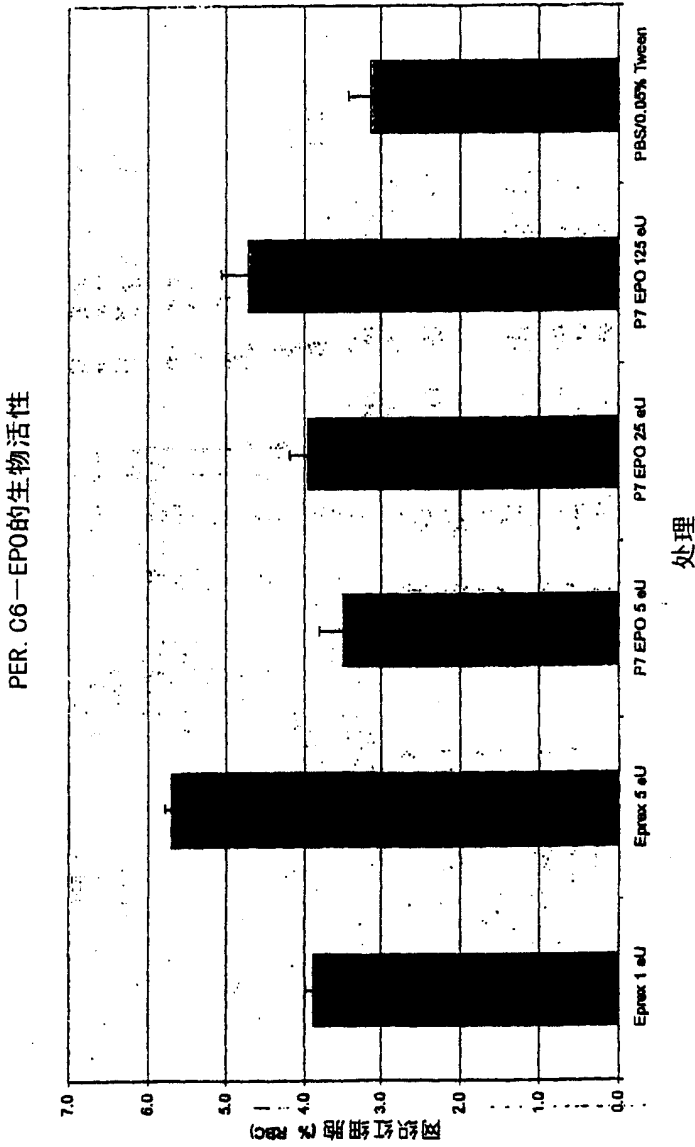


图6

中风后24小时的ADC图

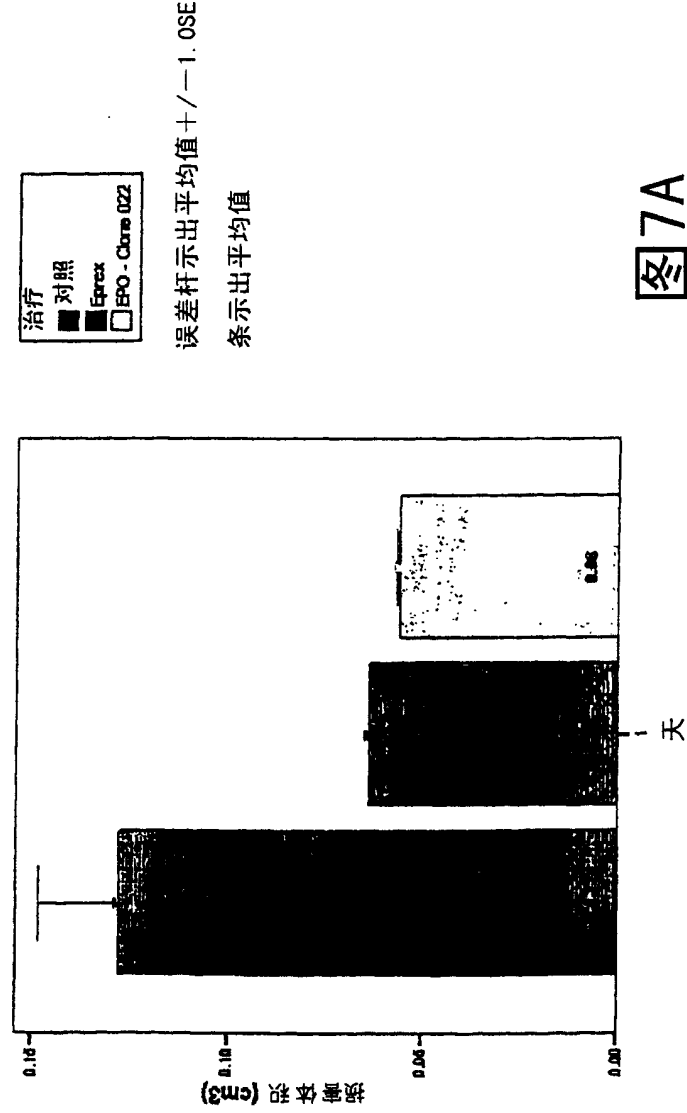


图7A

中风后24小时的T2图

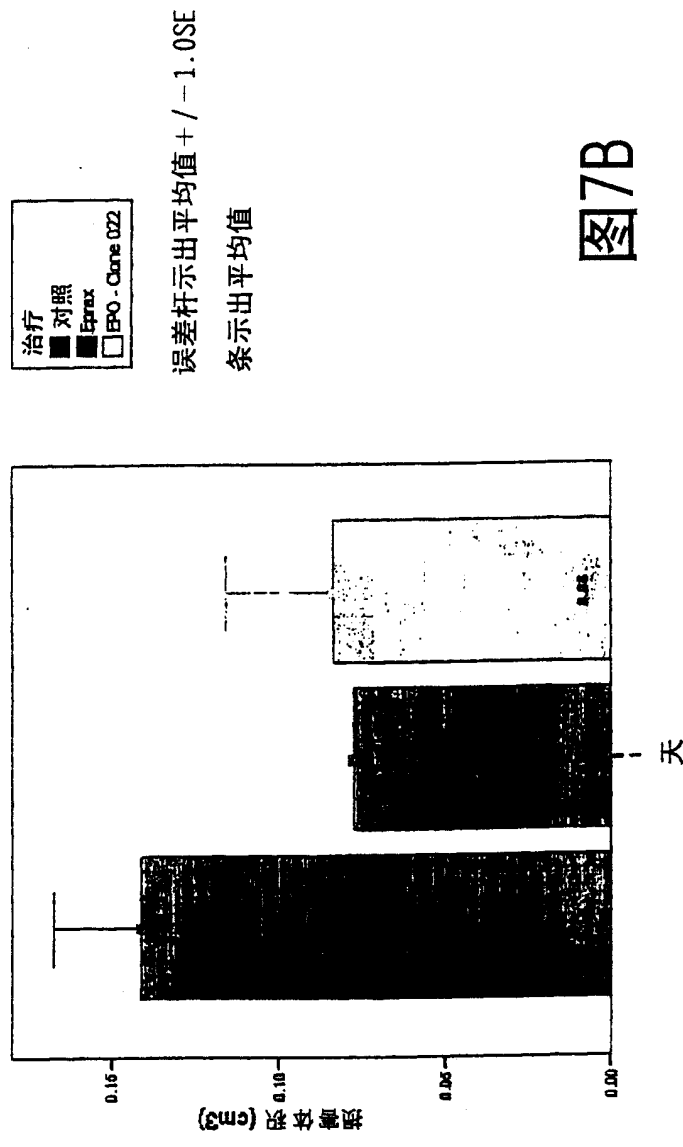


图7B

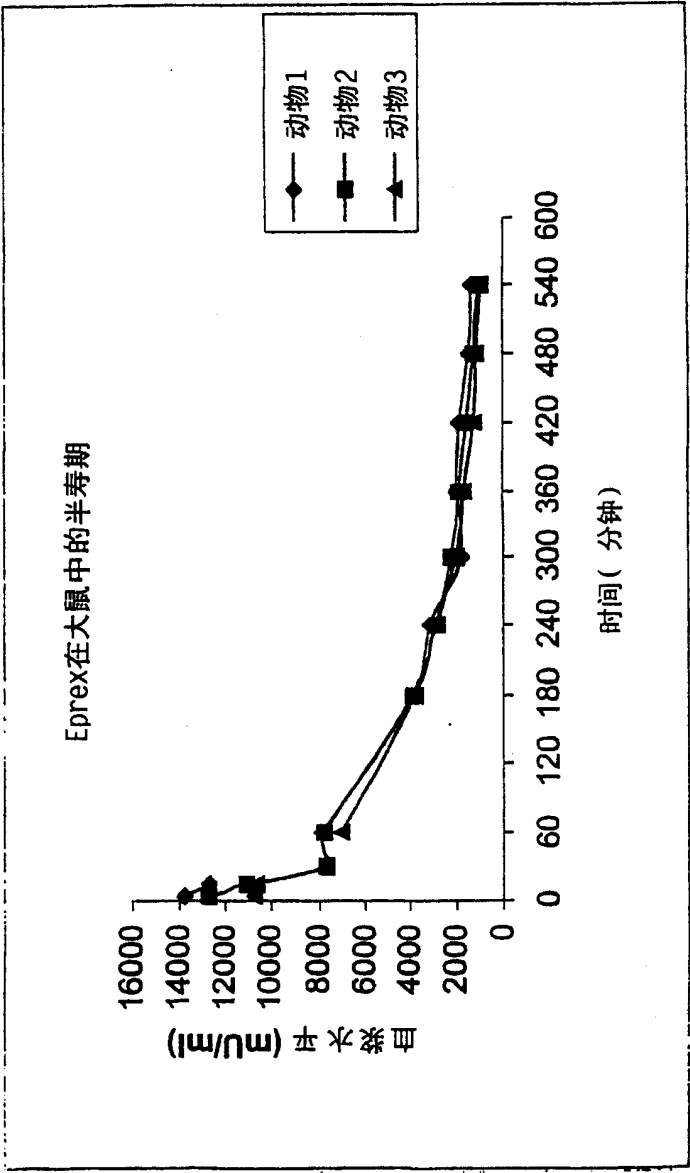


图8

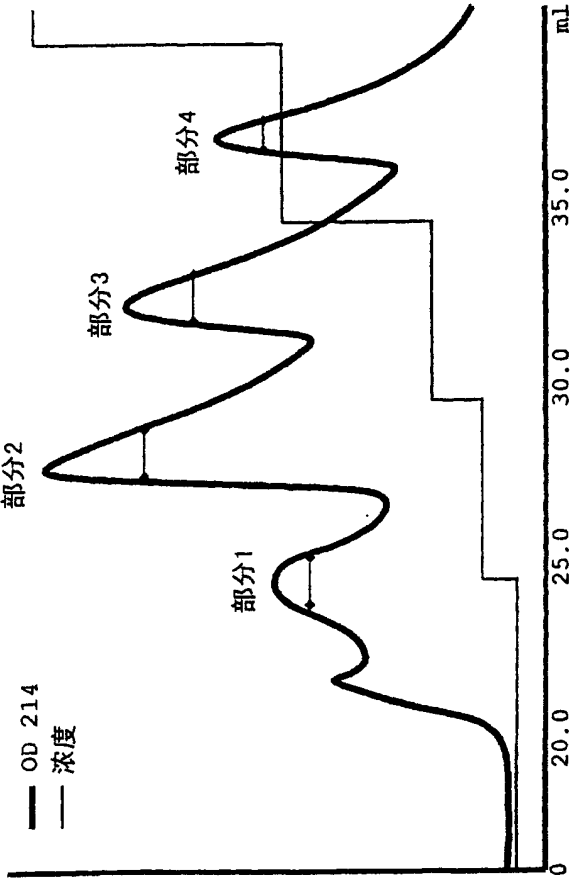


图9

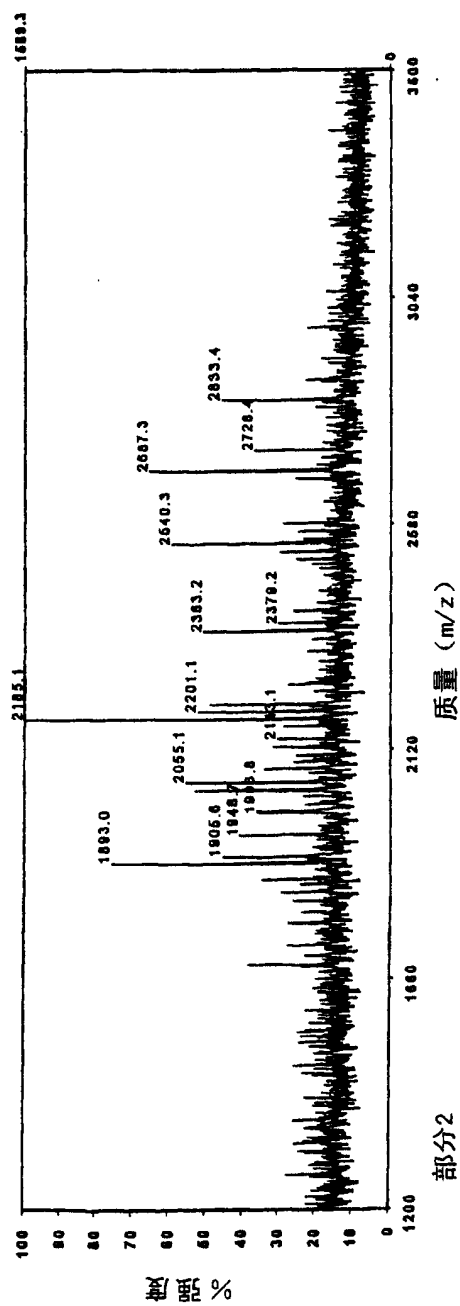
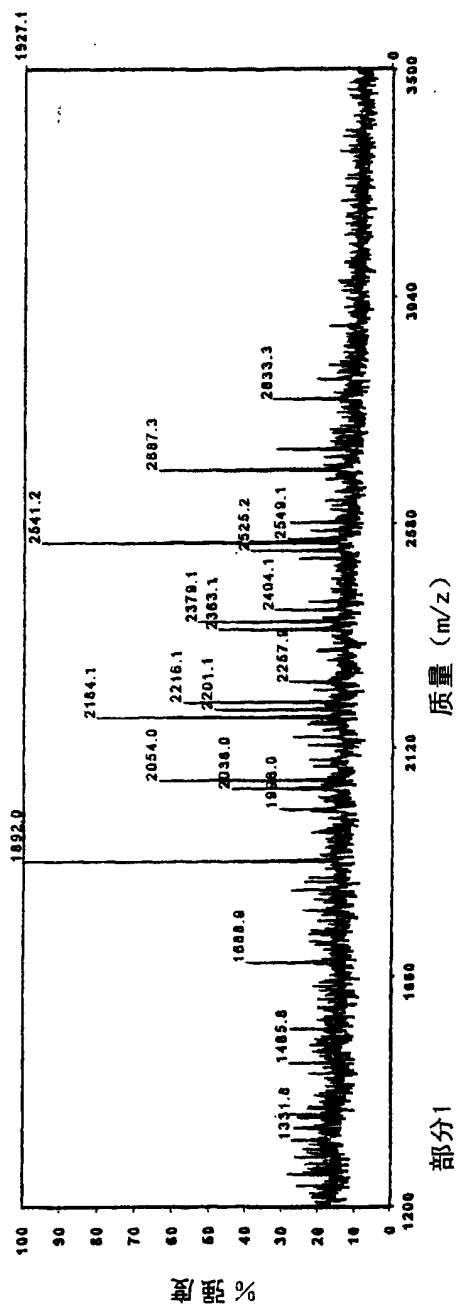


图10A

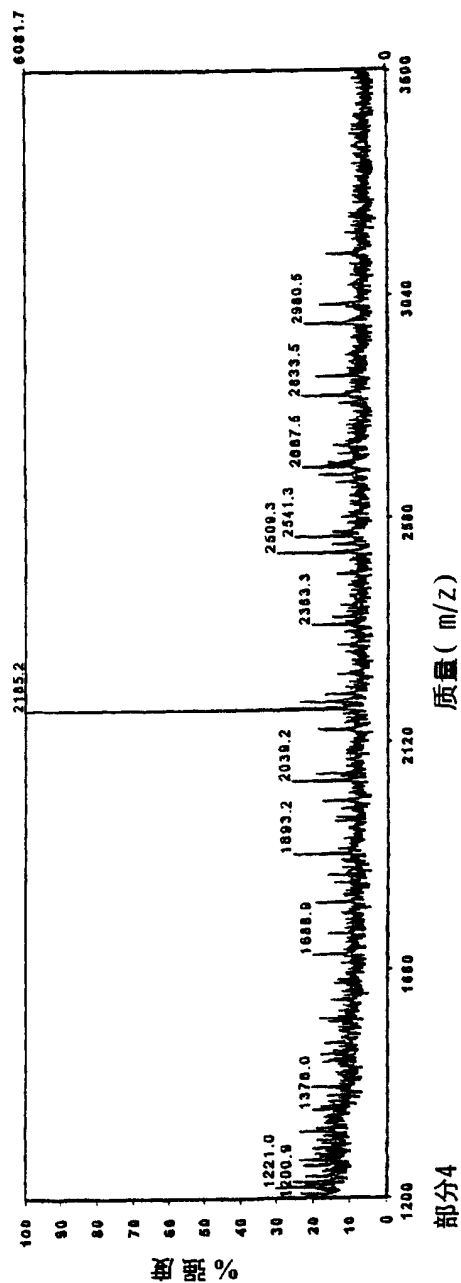
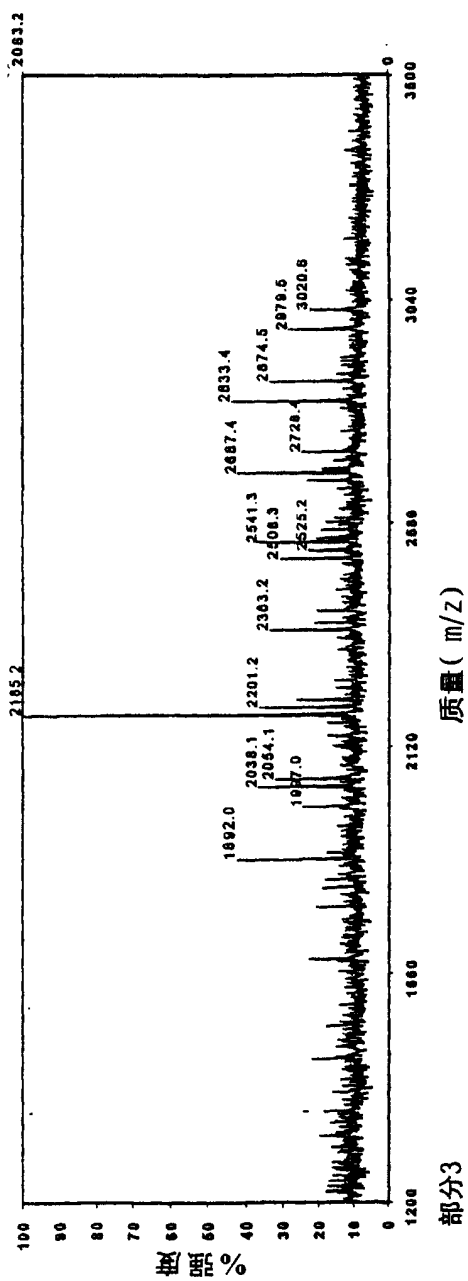


图10A续

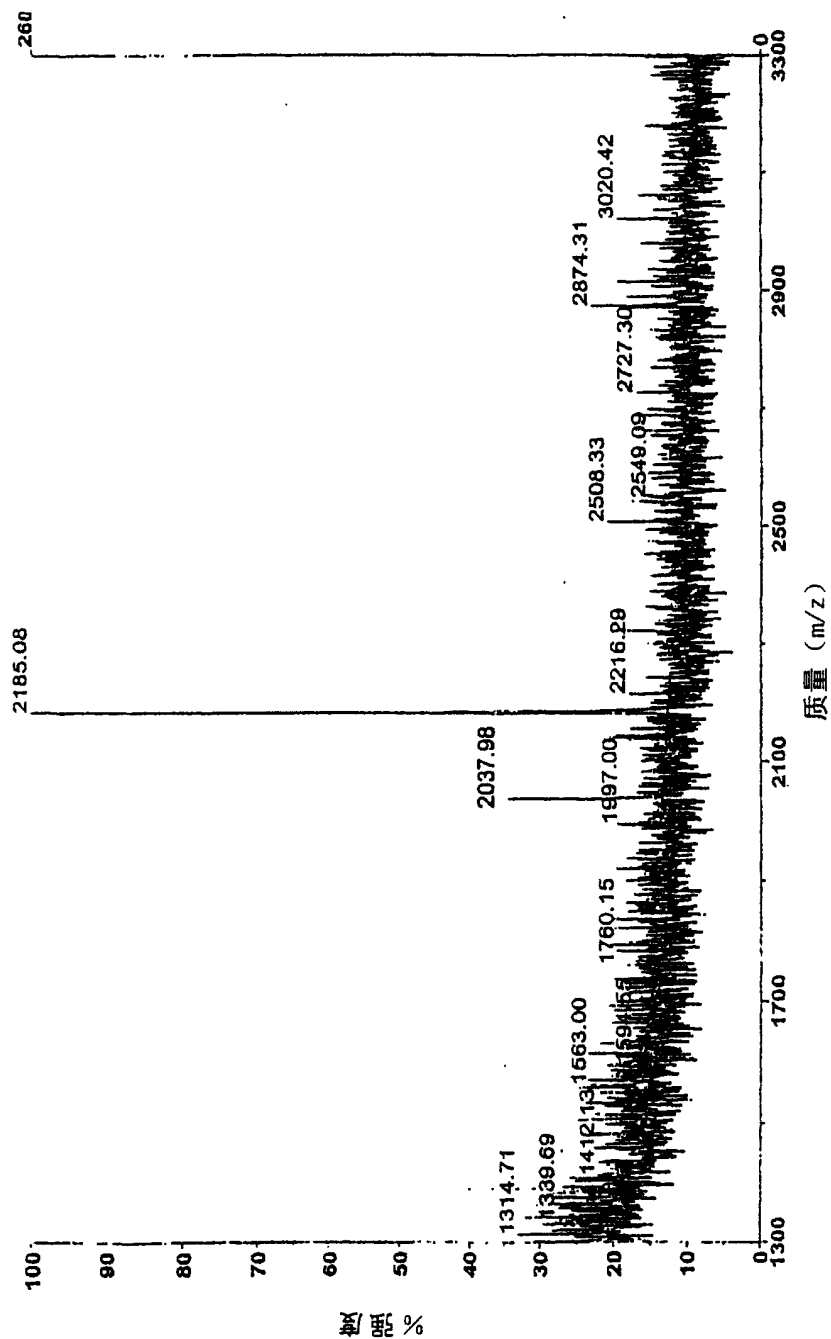


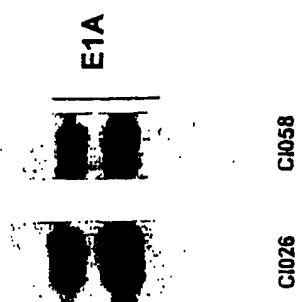
图10B



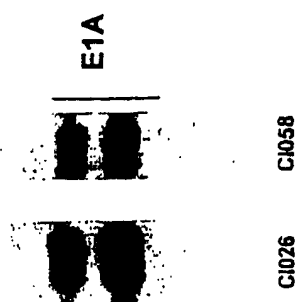
A



B



C



D

图11

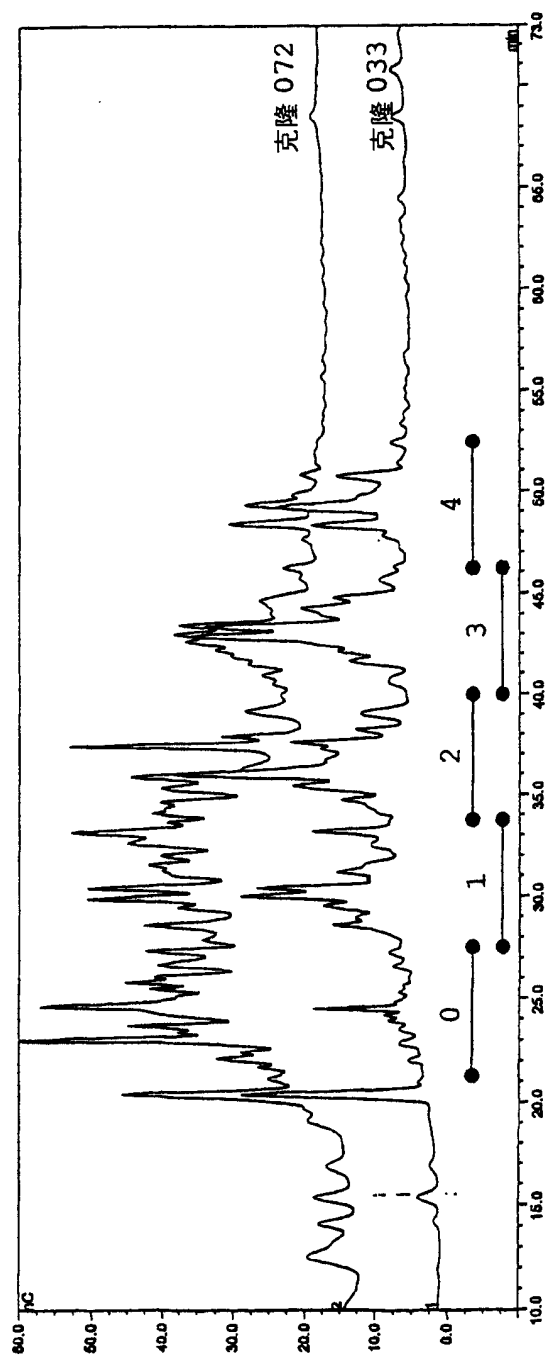


图12

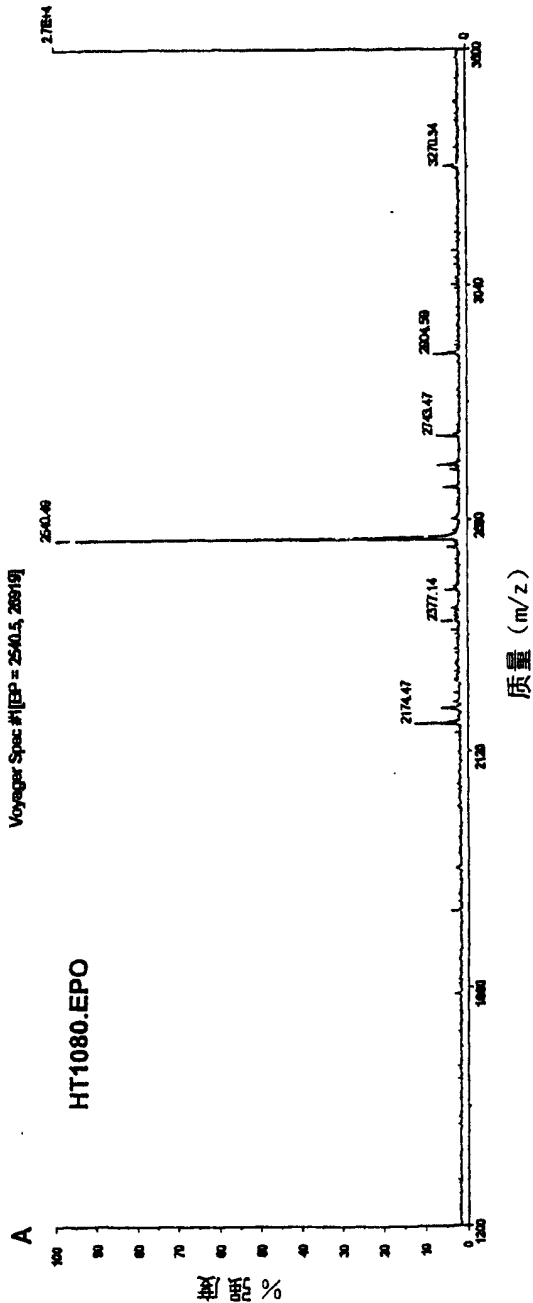


图13

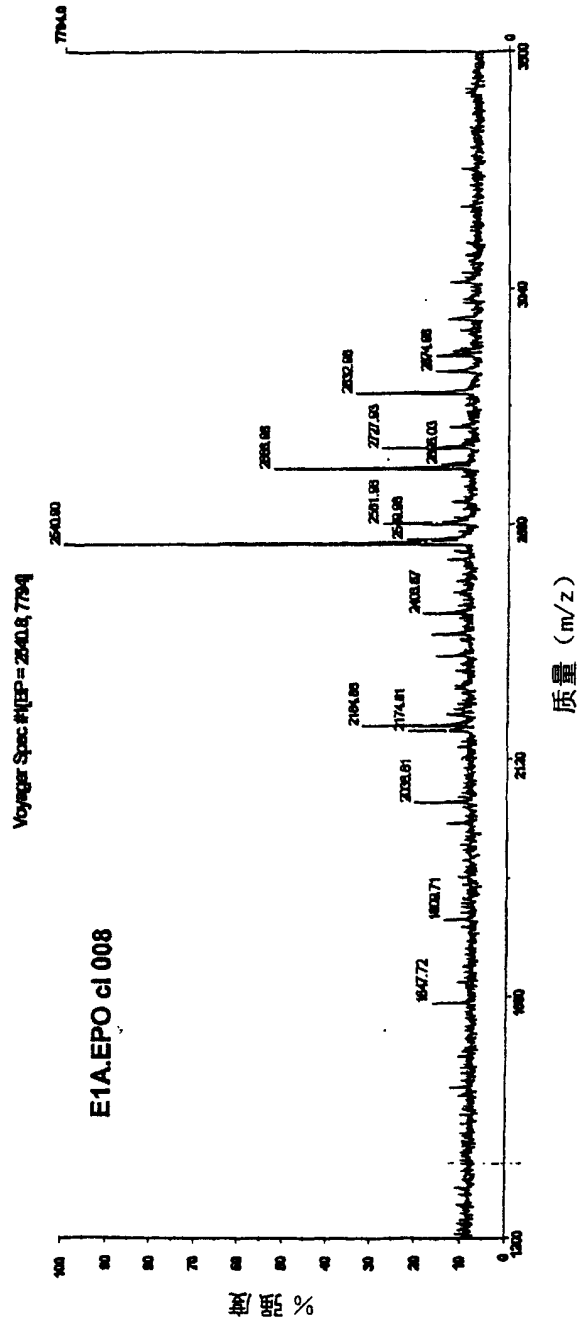


图13续

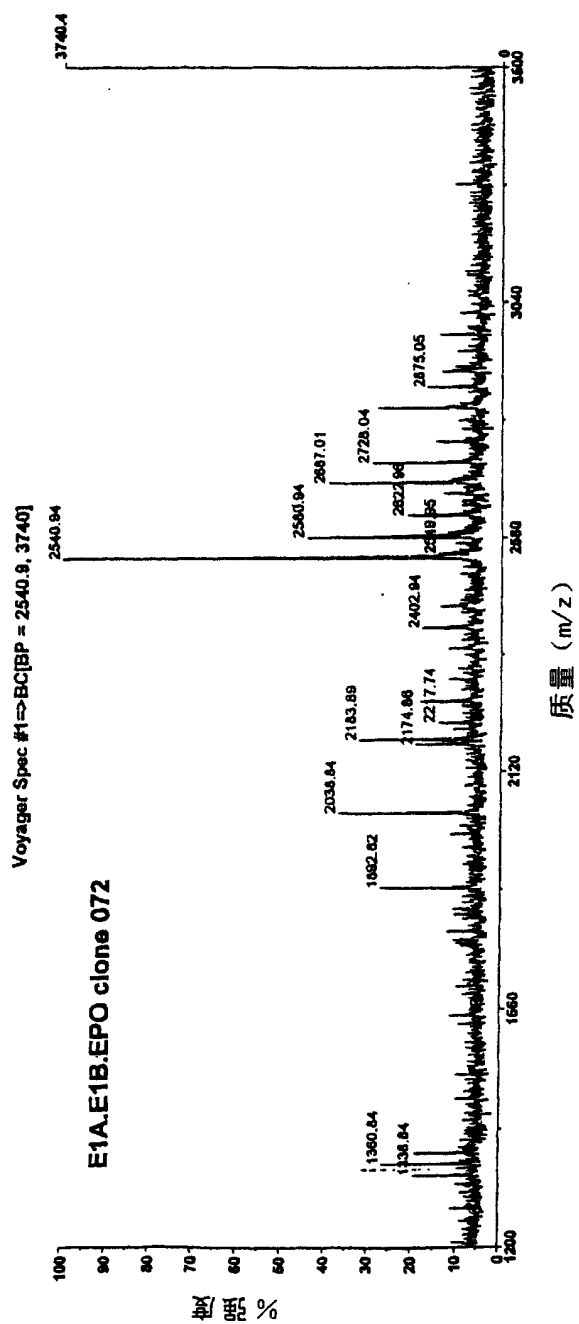


图13续

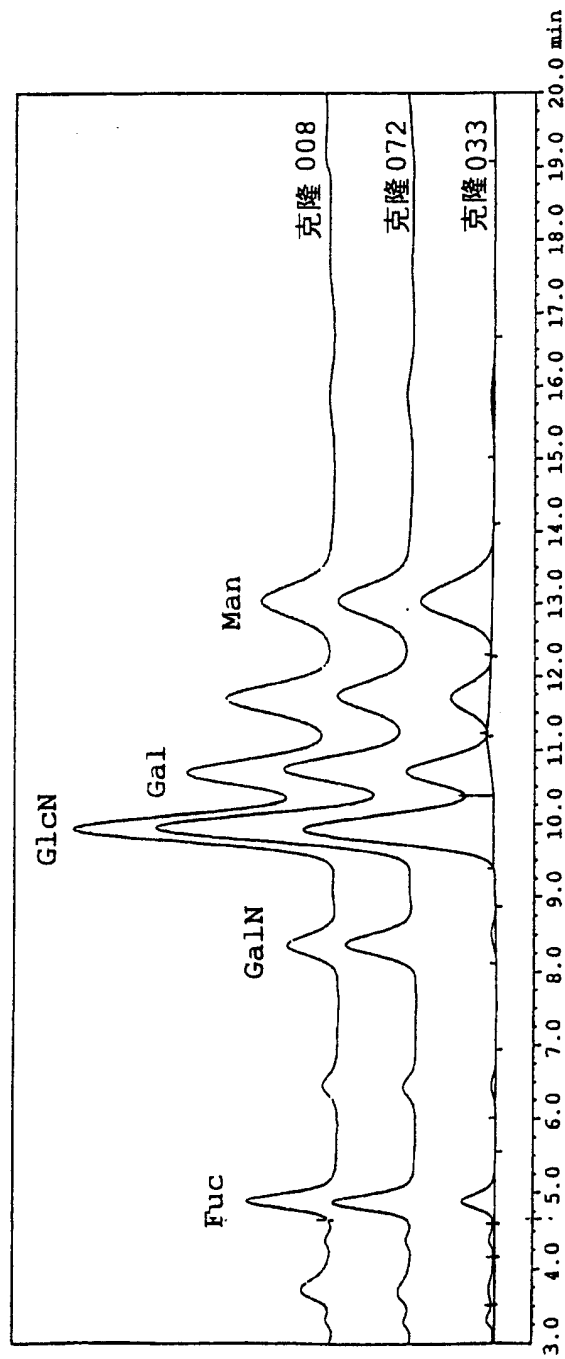


图14



质量 (m/z)

图15A

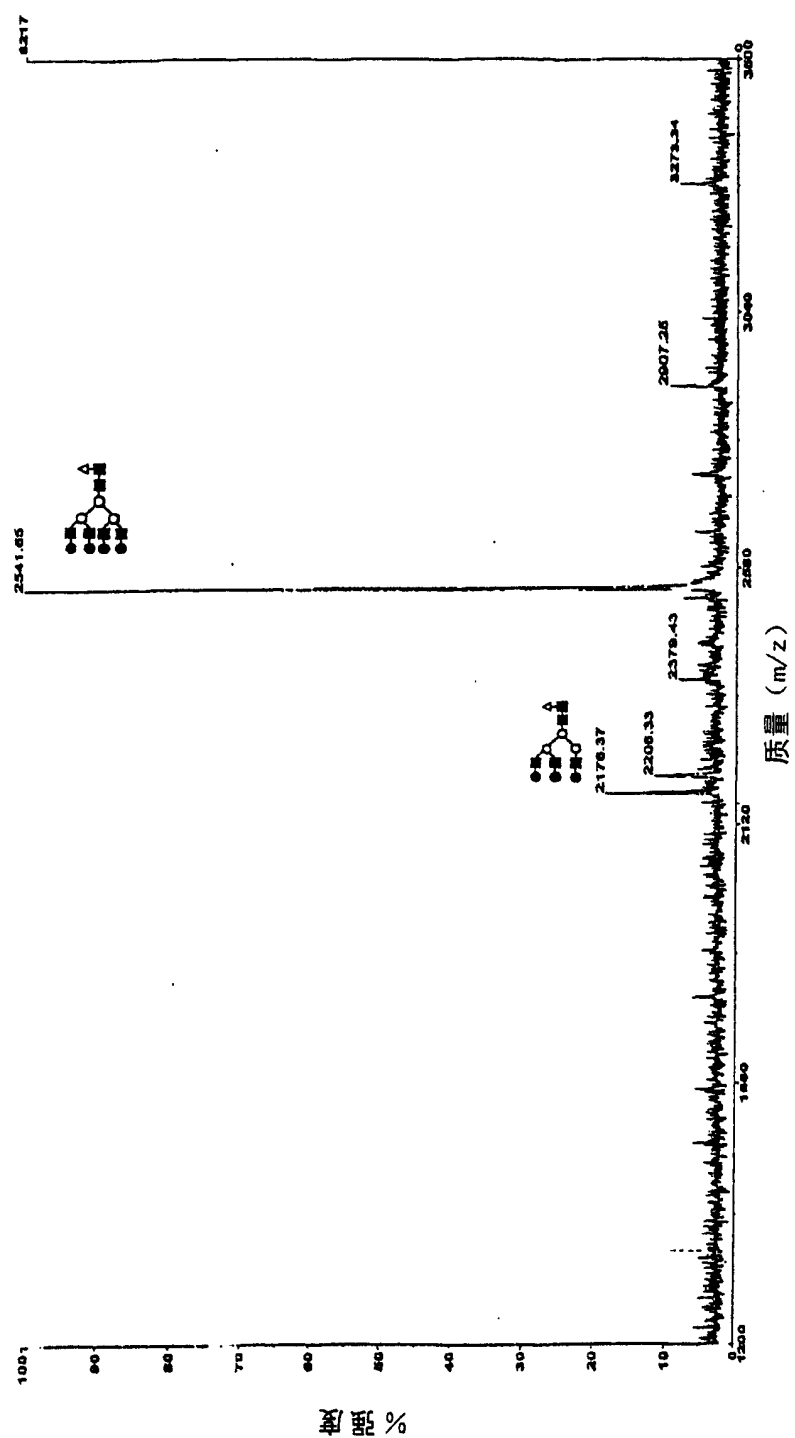


图15B

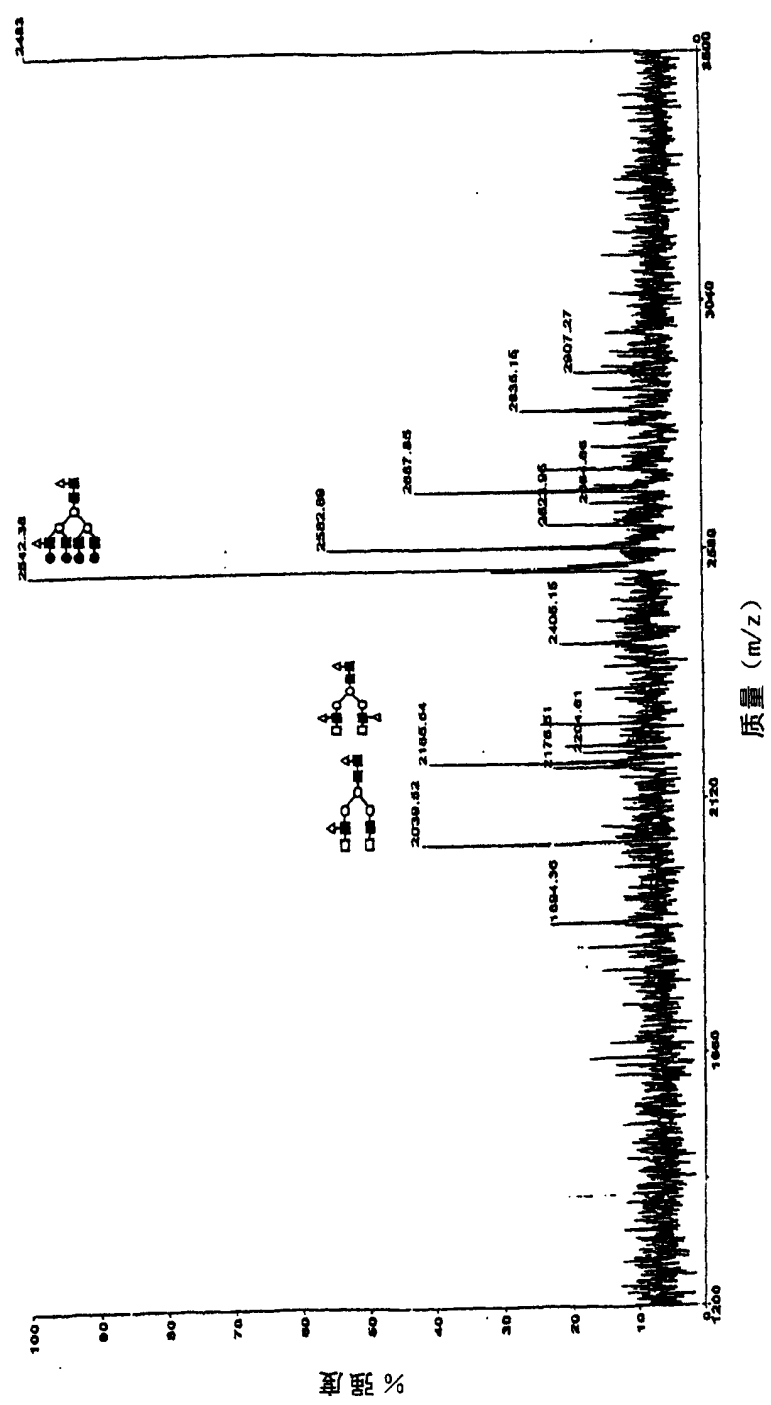


图15C

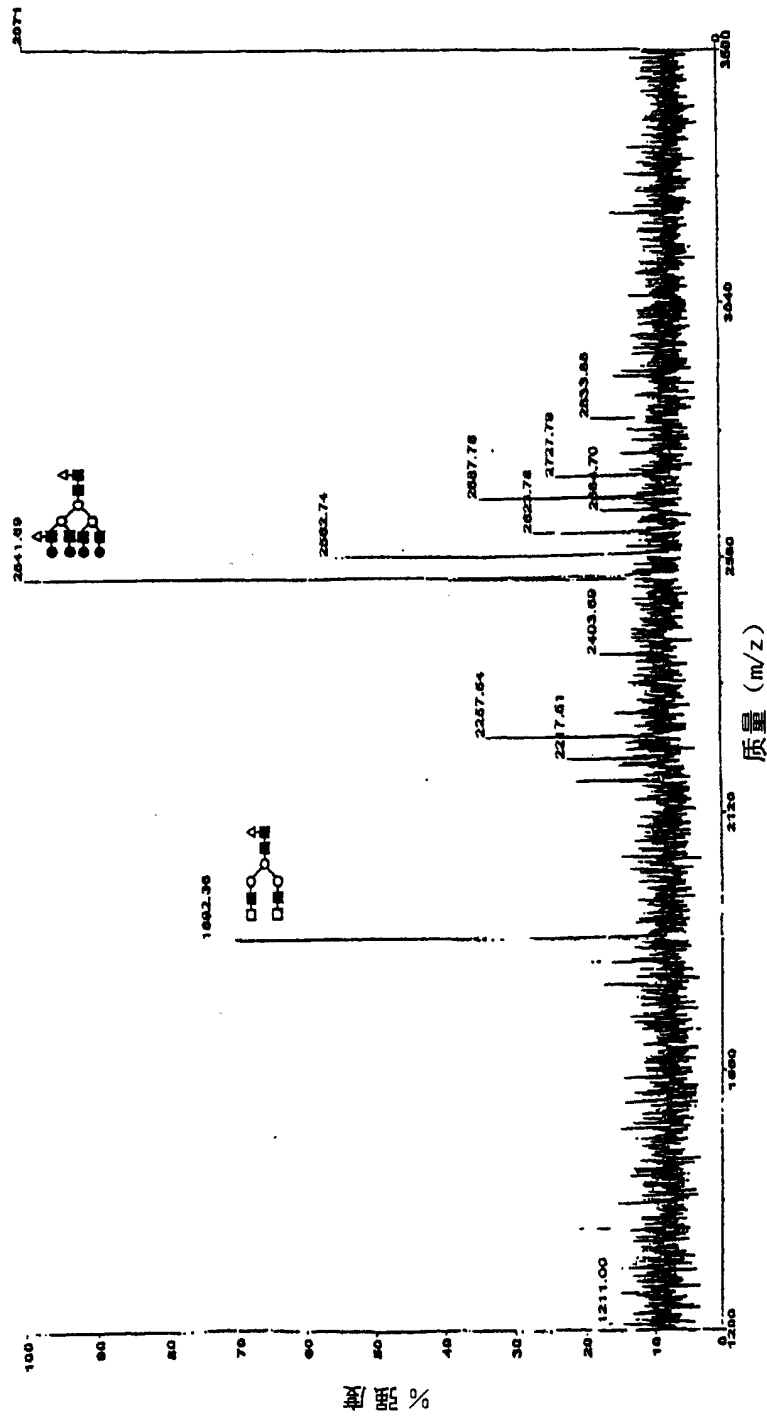


图15D

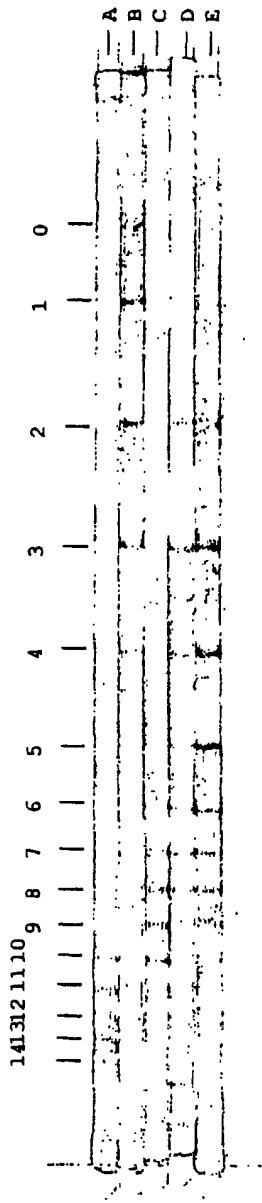


图16

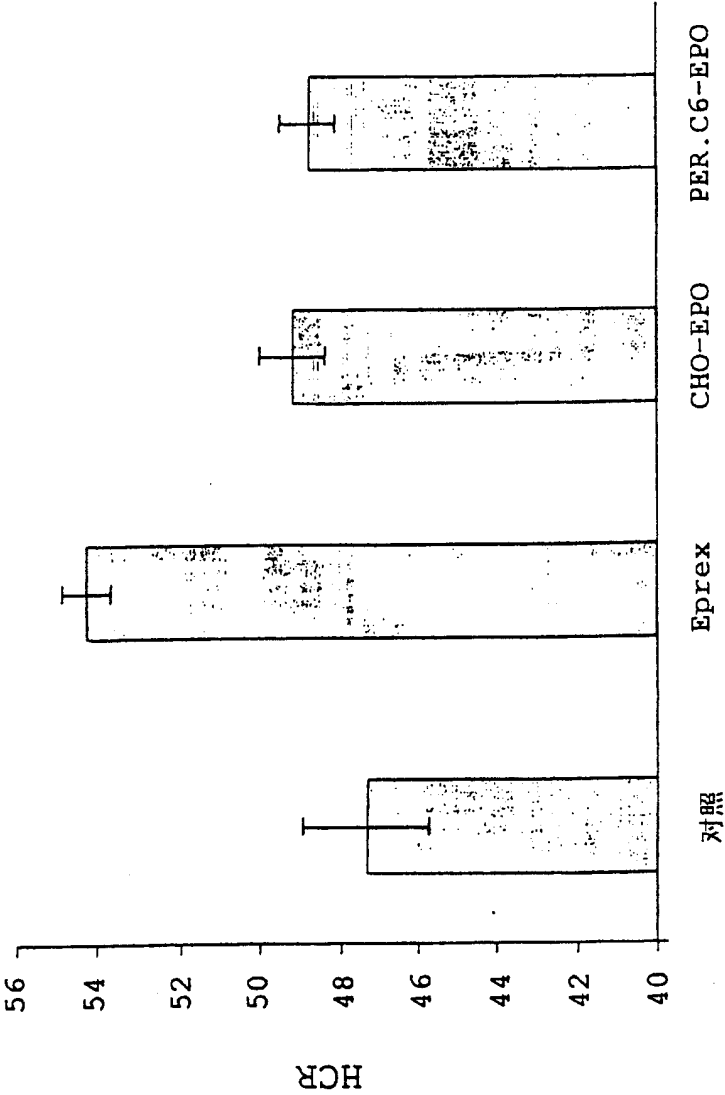


图17

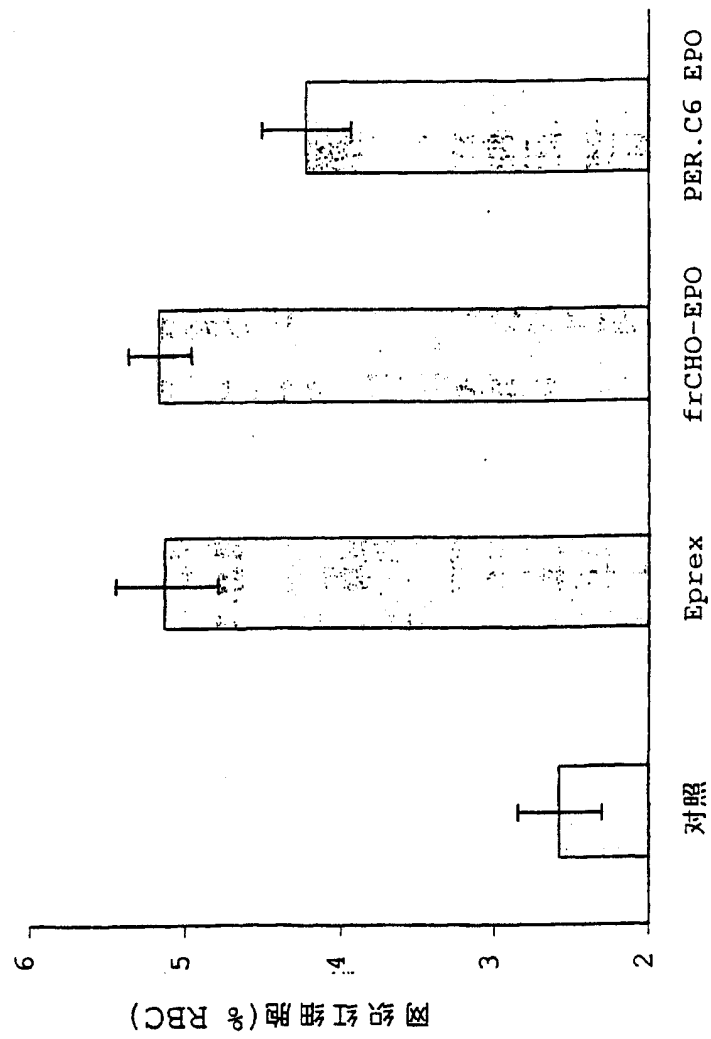


图 18

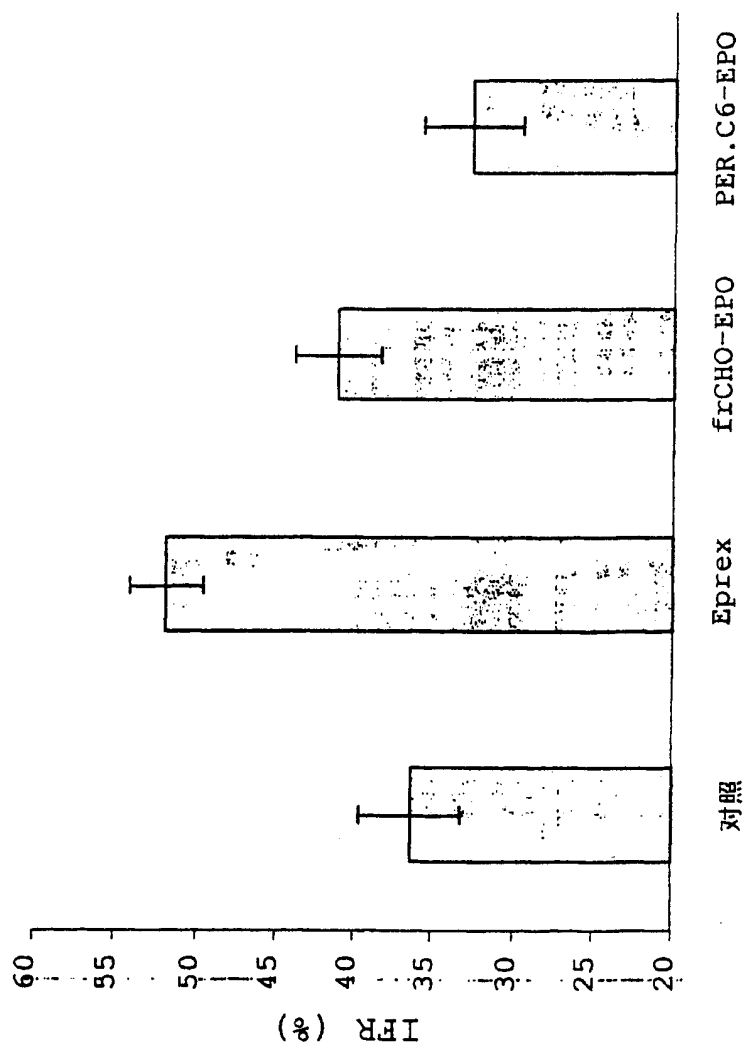


图19

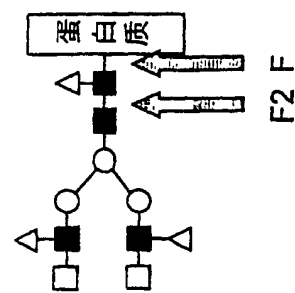


图20

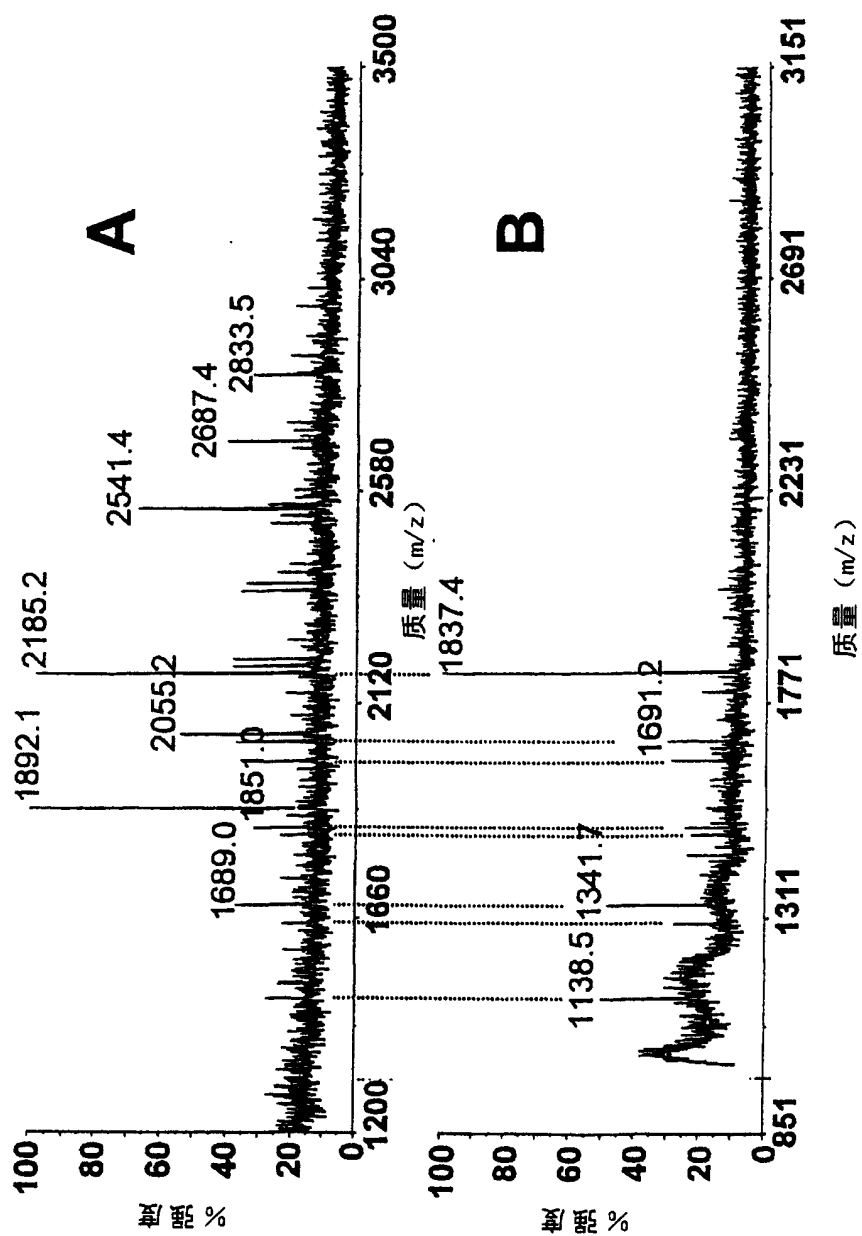


图21

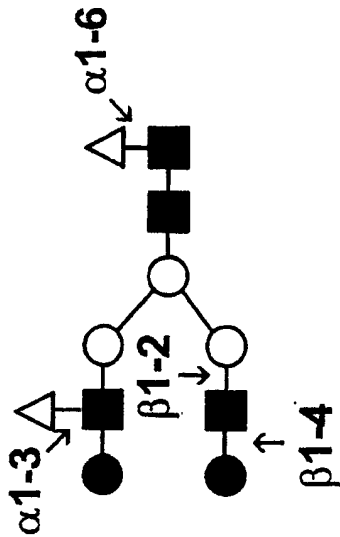


图 22

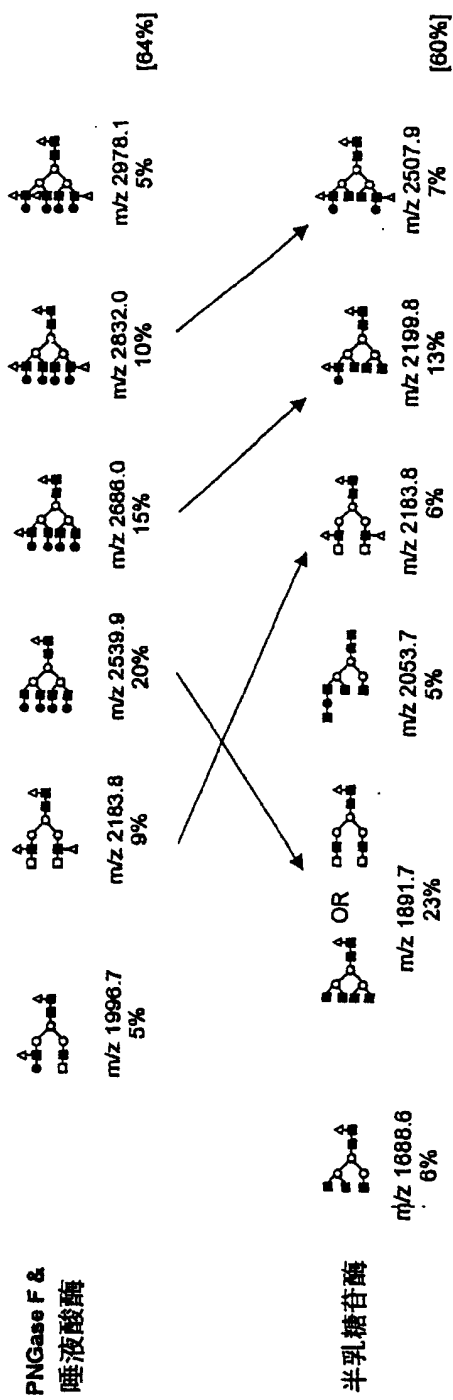


图23

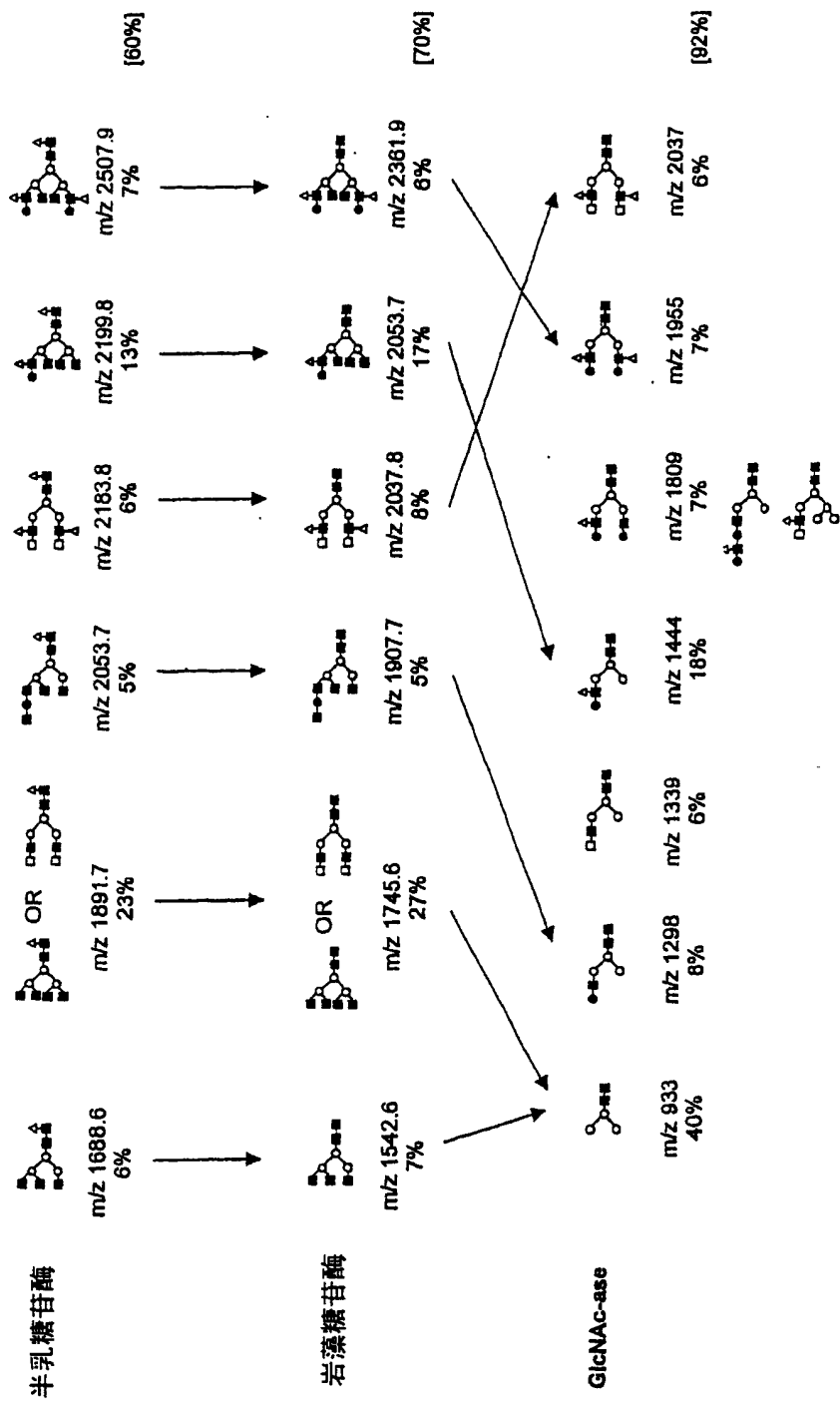


图24

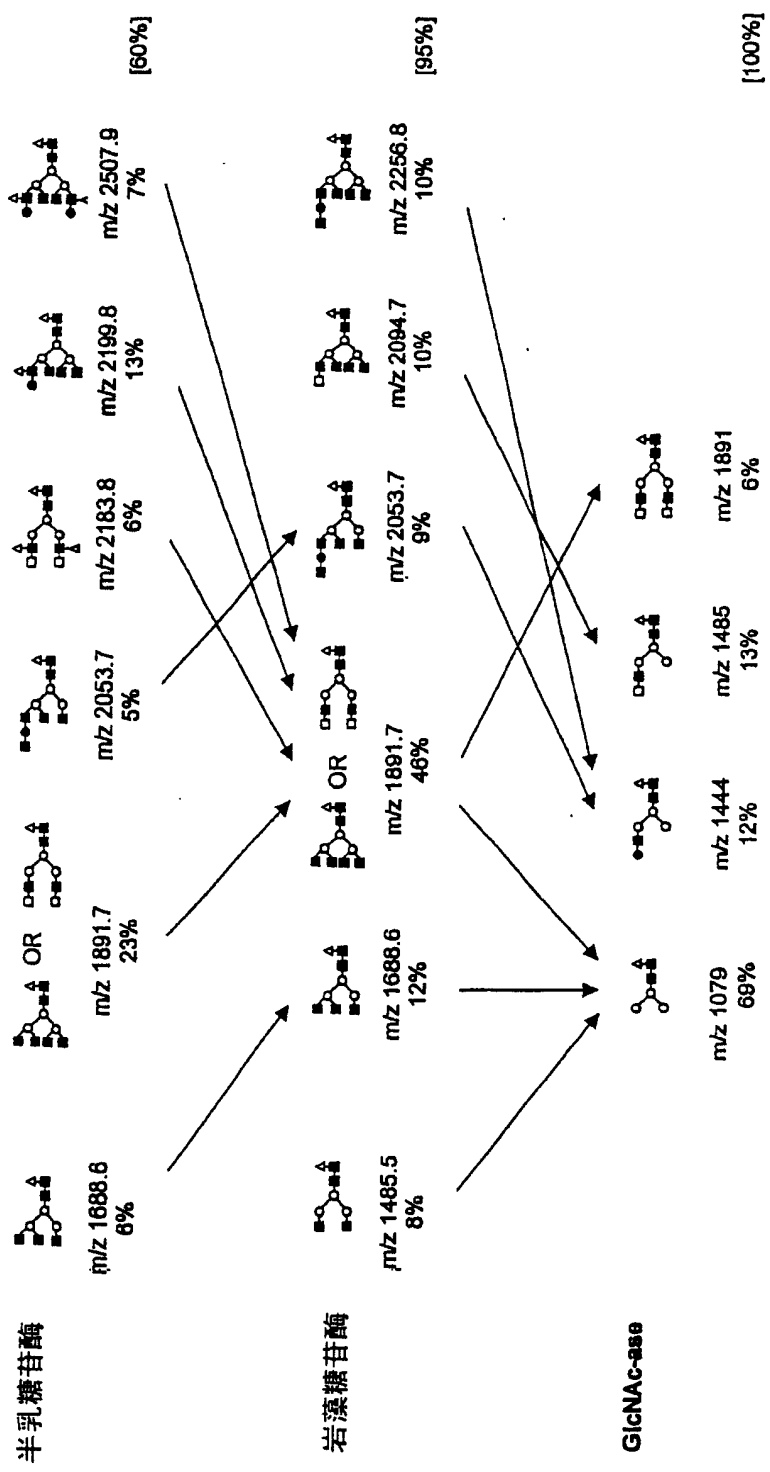


图25

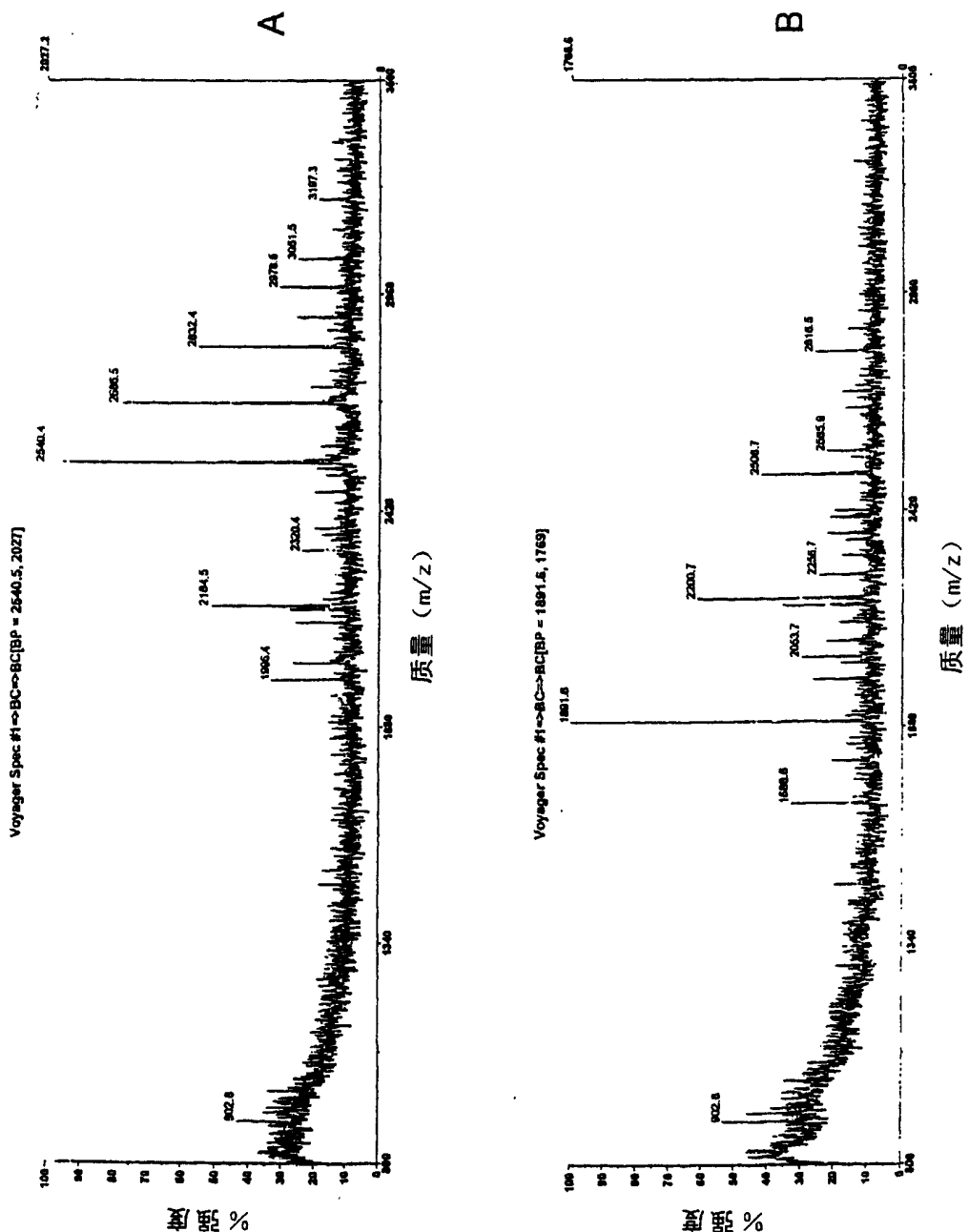


图26

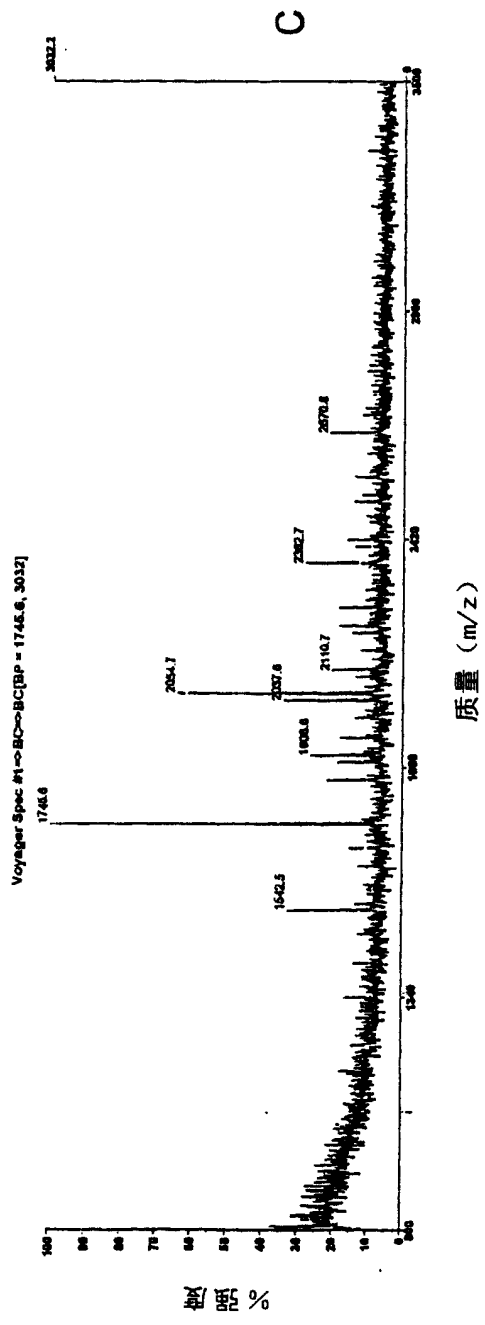


图26续

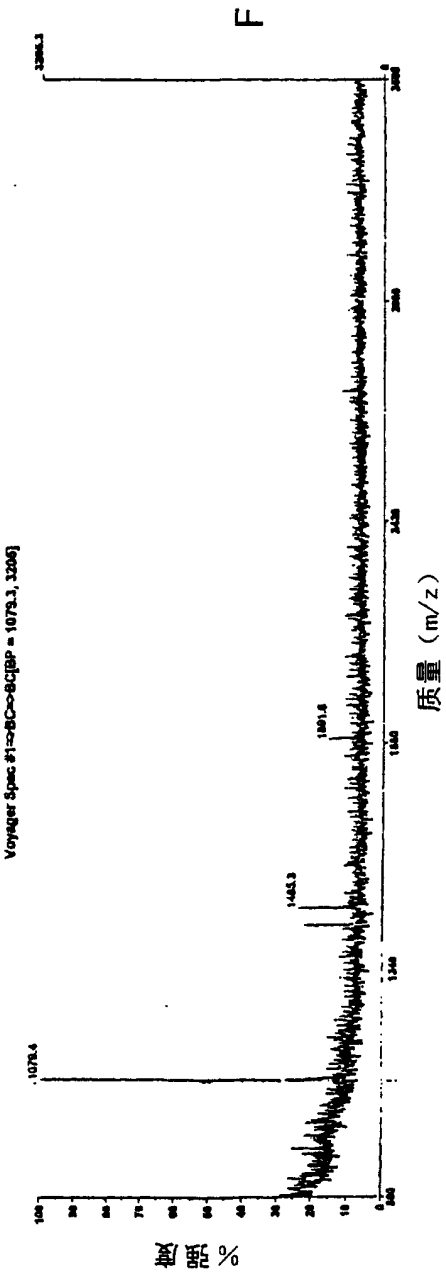
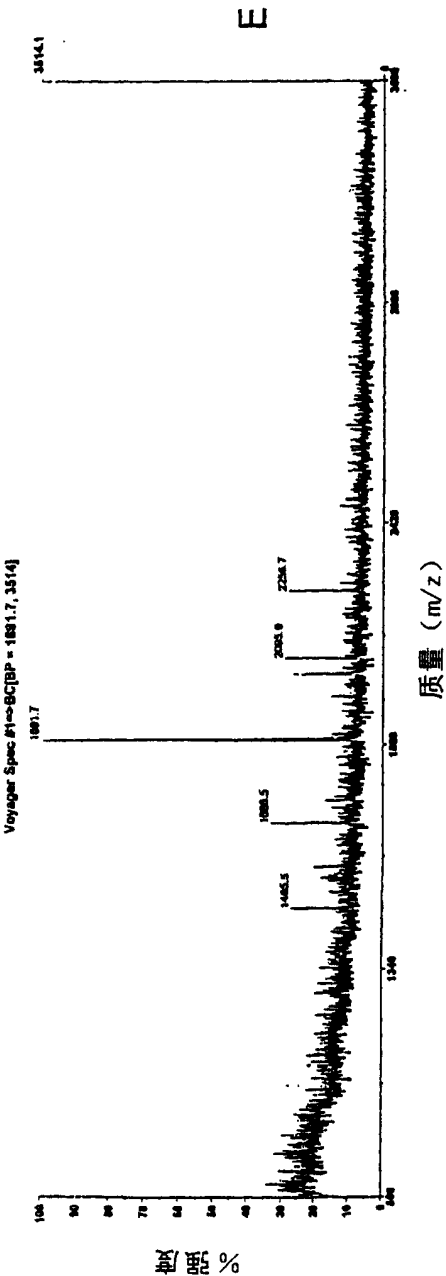


图26续