[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 1/10 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810231593.7

[43] 公开日 2009 年 6 月 3 日

[11] 公开号 CN 101445560A

[51] Int. Cl. (续)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01)

[22] 申请日 2008.12.31

[21] 申请号 200810231593.7

[71] 申请人 河南省生物工程技术研究中心

地址 450001 河南省郑州市高新技术开发区银屏路 38 号

[72] 发明人 王云龙 李玉林 陈小科 李智涛 韩 洁

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

一种畜禽用融合蛋白的制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种利用畜禽血清白蛋白作为融合蛋白及其生产方法和使用方法。 属兽用生物制品领域中细胞因子的制备方法。 通过基因工程或化学偶联获得集血清白蛋白与细胞因子的特性为一体的血清白蛋白与细胞因子融合蛋白。 延长细胞因子血浆半衰期。 制造成用于治疗某些与细胞因子有关疾病的药物。

1、 一种畜禽血清白蛋白与细胞因子的融合蛋白及其生产使用方法。

2、 根据权利要求 1 所述的血清白蛋白与细胞因子的融合蛋白，其特征在于：所述融合蛋白包括与畜禽血清白蛋白至少 80%序列同源的第一区和与细胞因子至少 80%序列同源的第二区。

3、 根据权利要求 1 所述的血清白蛋白与细胞因子的融合蛋白，其特征在于：所述融合蛋白包括与畜禽血清白蛋白氨基酸残基序列相同的第一区和与细胞因子氨基酸残基序列相同的第二区，或上述二区的功能等同物。

4、 根据权利要求 3 所述的血清白蛋白与细胞因子的融合蛋白，其特征在于：所述功能等同物是在不改变所述融合蛋白特性的前提下，对融合蛋白个别氨基酸残基的取代、缺失或加入得到的多肽。

5、 根据权利要求 1 所述的血清白蛋白与细胞因子的融合蛋白，其特征在于：所述与细胞因子同源的第二区可位于融合蛋白的 N 末端或 C 末端，也可以同时位于融合蛋白的 N 末端或 C 末端。

6、 根据权利要求 1 所述的血清白蛋白与干扰素的融合蛋白，其特征在于：所述的细胞因子可以是任何一种细胞因子或多种细胞因子的串联物。

7、 根据权利要求 1-6 中任何一项所述的血清白蛋白与细胞因子的融合蛋白，其特征在于：所述与畜禽血清白蛋白同源的第一区与细胞因子同源的第二区之间可设有连接肽。

8、 根据权利要求 1 中所述的血清白蛋白与细胞因子的融合蛋白的生产方式，其特征在于：该融合蛋白可以是基因工程融合，也可以是采用化学方法将血清白蛋白与细胞因子偶联融合。

9、 根据权利要求 1 中所述的血清白蛋白与细胞因子的融合蛋白的使用方式，其特征在于：通过注射、喷射、口服、滴鼻、渗透、吸收、物理或化学介导的方法使上述融合蛋白进入机体，或是被其他物质包裹或混合后进入机体的。

一种畜禽用融合蛋白的制备方法

技术领域

本发明涉及一种融合蛋白，是一种用畜禽的 细胞因子与畜禽的血清白蛋白人工结合的融合蛋白，可用于畜禽相关疾病的防治，属生物工程制药领域。

背景技术

细胞因子（cytokine，CK)是由细胞合成、分泌的具有生物活性的低分子量蛋白质或多肽的统称，通常由淋巴细胞、单核巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞等免疫细胞或非免疫细胞细胞产生。按其功能及与免疫学的关系可分为：(1)具有抗病毒活性的细胞因子，如干扰素（interferon，IFN)；(2)具有免疫调节活性的细胞因子，包括白细胞介素（interleukin，IL）类的 IL2、IL4、IL5、IL7、IL9、IL10 和 IL12，以及 β 型转化生长因子（transforming growth factor β，TGF β）；(3)具有炎症介导活性的细胞因子，包括以肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）及 IL1、IL6 和 IL8 为代表的结构相似的小分子趋化因子；(4)具有造血生长活性的细胞因子，包括 IL3、IL11、集落刺激因子（colony-stimulating factor，CSF)、促红细胞生成素（erythropoietin，EPO)、干细胞因子（stem cell factor，SCF）和白血病抑制因子（leukemia inhibitory factor，LIF）等。

作为药物，细胞因子在治疗肿瘤、感染、造血障碍等方面有良好的疗效。但是，由于细胞因子分子量较小，易被肾小球滤过清除，因而临床应用时，血浆半衰期较短，为维持有效血药浓度，一般需要大剂量频繁用药，如每周 2—3 次，这种给药方式不仅增加了治疗费用和劳动强度，而且易对畜禽的生长产生负面影响。

白蛋白又称清蛋白，是一类呈球状、能溶于水的蛋白质，主要存在于哺乳动物、细菌、霉菌和植物中，卵白蛋白、乳白蛋白、豆白蛋白和血清白蛋白等都属此类。血清白蛋白是血清中含量最丰富的蛋白质，占血清总蛋白量的 50% 以上，半衰期约为 15-19 天，其生理功能是维持和调节血液的渗透压，并作为载体参与运送脂肪酸和其他多种内源因子，因为这一特性，血清白蛋白也可用作外源药物的载体。

血清白蛋白不含糖，在饱和硫酸铵溶液中沉淀析出，在细胞中以含有信号肽和前肽的形式合成，信号肽和前肽在转运和分泌过程被切除。在正常情况下，

血清白蛋白由于分子量较大，不易透过肾小球。利用这一特性，可将血清白蛋白与其他需要延长作用时间的药物进行偶连，在保持药物疗效和生物学特性的同时，降低血浆清除率，维持有效血药浓度，延长半衰期，减少给药次数。

本发明就是针对细胞因子血浆半衰期较短的缺陷来进行设计和实施的。

本发明的目的：利用生物技术对细胞因子和血清白蛋白进行融合，得到的融合蛋白既能保持细胞因子的生物学活性，又能延长细胞因子的血浆半衰期。

本发明的积极效果：对细胞因子进行了二次开发，并且采用毕赤酵母进行分泌表达，纯化较为简单，为畜禽相关疾病的防治提供了新的手段。

发明内容

本发明的目的是：针对目前细胞因子血浆半衰期较短的缺陷，设计一种既有生物学活性，又能降低血浆清除率，半衰期较长的融合蛋白。

本发明是这样实现的：

一种以细胞因子为主体，偶连了血清白蛋白的融合蛋白。

本发明的融合蛋白，包括与血清白蛋白至少 80%序列同源的第一区，和与细胞因子至少 80%序列同源的第二区，必要时，还有起辅助作用的第三区。

所述的序列同源，不仅包括了与该区的氨基酸残基序列相同，还包括了该区的功能等同物。所谓功能等同物，是在不改变该区生物学特性的前提下，对个别氨基酸残基的取代、缺失或加入得到的多肽。

本发明的融合蛋白中，第一区可以位于融合蛋白的 N 末端，也可以位于融合蛋白的 C 末端；相应的，第二区可以位于融合蛋白的 C 末端，也可以位于融合蛋白的 N 末端。

本发明的融合蛋白中，为了保留细胞因子的生物学活性，必须给第二区保留足够的作用空间。因此，在第一区与第二区直接偶连导致第二区的作用空间不足时，可以在第一区和第二区之间添加第三区，如连接肽、其他细胞因子等，使融合蛋白两部分间有较大的间隔。

本发明的细胞因子可以是任何一种畜禽细胞因子或与之同效的功能等同物。包括：(1)具有抗病毒活性的细胞因子，如干扰素（interferon，IFN）；(2)具有免疫调节活性的细胞因子，包括白细胞介素（interleukin，IL）类的 IL2、IL4、IL5、IL7、IL9、IL10 和 IL12，以及 β 型转化生长因子（transforming growth factor β，TGF β）；(3)具有炎症介导活性的细胞因子，包

括以肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor，TNF）及 IL1、IL6 和 IL8 为代表的结构相似的小分子趋化因子；(4)具有造血生长活性的细胞因子，包括 IL3、IL11、集落刺激因子（colony-stimulating factor，CSF）、促红细胞生成素（erythropoietin，EPO）、干细胞因子（stem cell factor，SCF）和白血病抑制因子（leukemia inhibitory factor，LIF）等。

本发明的融合蛋白的特征在于保留了细胞因子的生物学活性，因此，它既可以作为相应受体的激动剂，也可以作为相应受体的抑制剂。

本发明的另一个目的是提供编码本发明白蛋白融合蛋白的氨基酸序列及与细胞因子连接的化学方法。本发明的融合蛋白可以是畜禽白蛋白与畜禽细胞因子通过基因工程手段得到，也可以是结合化学手段如体外直接偶联或借助于连接臂偶联等方法得到。

本发明的又一个目的是提供携带编码本发明融合蛋白的DNA序列的重组表达载体。

本发明的重组表达载体包括植物载体、原核质粒、真核质粒、双穿梭质粒及病毒载体等。

本发明的再一个目的是提供表达本发明融合蛋白编码基因的宿主。

本发明的宿主可以是被重组表达载体或重组表达载体的一部分转化，含有本发明融合蛋白编码基因的细菌、酵母、动物细胞或植物细胞；其中优选的是原核表达，更优选的是酵母表达。

本发明将畜禽白蛋白分子，或其至少 85%序列同源的类似物与细胞因子，或其至少 85% 序列同源的类似物融合，所形成的融合蛋白既保留了与细胞因子受体结合的活性，同时与细胞因子相比，其血浆半衰期又得到了延长。本发明的融合蛋白既可以保留激活细胞因子受体的活性，作为该受体的激动剂，制造成细胞因子类药物，也可以仅保留与该受体结合的活性，作为该受体的抑制剂，制造成用于治疗某些与细胞因子或其受体过量表达有关疾病的药物。

畜禽血清白蛋白天然存在多态性，本发明融合蛋白中的畜禽血清白蛋白部分也包括所有这些多态型。

编码畜禽血清白蛋白的多聚核苷酸和编码细胞因子的多聚核苷酸可以用本领域周知的方法，如 PCR、RT-PCR 方法、人工合成的方法和构建筛选 cDNA 文库的方法等获得，用作 PCR 模板和用于构建 cDNA 文库的 mRNA 或 cDNA 可

以来源于任何含有相应mRNA或cDNA的组织、细胞、及文库等，如从肝胎cDNA文库获得。也可以用人工合成的方法获得，人工合成时可选用宿主偏爱的密码子，这样往往可以提高产物的表达。

编码细胞因子（包括干扰素、白细胞介素、β型转化生长因子、肿瘤坏死因子、小分子趋化因子、集落刺激因子、促红细胞生成素、干细胞因子和白血病抑制因子等。）的多聚核苷酸可以用PCR的方法从畜禽外周血白细胞的RNA制品中获得，或用人工合成的方法获得。若需要可用本领域公知的方法对多聚核苷酸进行突变、缺失、插入、和与其它多聚核苷酸连接等。编码白蛋白和编码细胞因子的多聚核苷酸的融合，在保持各自阅读框架不变的前提下，可以用本领域周知的各种方法，如通过PCR的方法，在编码序列的两侧引入限制性内切酶识别位点，从而获得编码融合蛋白的基因。如果需要可在本发明的编码融合蛋白基因的两侧引入多聚核苷酸，引入的多聚核苷酸可有限制性内切酶识别位点。可用本领域公知的方法将含编码融合蛋白序列的核酸克隆到各种表达载体中去。所用标准的分子克隆过程见J.萨姆布鲁克等(J.萨姆布鲁克等，《分子克隆实验指南》第二版，科学出版社，1995.）的叙述。

许多表达载体和其对应的宿主可以从公司购得。表达融合蛋白的宿主可以是酵母、哺乳动物细胞、细菌、动物、植物等。融合蛋白或多肽可以存在于宿主细胞内，也可以是从宿主中分泌出来，优选的，是从宿主中分泌出来。分泌所用的信号肽，优选的是天然的血清白蛋白的信号肽，或酵母信号肽，或这两种信号肽的类似物。更优选的用天然的血清白蛋白的信号肽，用该信号肽时融合蛋白表达水平较高。融合蛋白或多肽也可以不用信号肽，而在酵母中以胞内可溶形式表达。编码融合蛋白的核酸，可以插入至宿主染色体，或以游离质粒形式存在。

转化所需核酸至宿主细胞中去可用通常的方法，如：电穿孔，制备感受态的原生质球等。成功转化的细胞，即含有本发明DNA构建体的细胞，可通过人们熟知的技术加以鉴定，如细胞经收集并裂解，提取DNA,然后PCR方法鉴定。或者，细胞培养上清中或细胞破碎液中的蛋白可用抗HSA或抗IFN的抗体检测。可以通过培养含有本发明DNA构建体的宿主，如重组酵母、重组哺乳动物细胞、重组细菌、转基因动植物等，生产本发明的融合蛋白。具体的培养方法，可以用摇瓶或生物反应器等，生产时优选的为生物反应器。培养基应能提供菌体（或

细胞）生长和产物表达所需的物质，应包含氮源、碳源、pH 缓冲成分等，培养基配方一般应根据不同培养对象，通过试验获得。培养可分两个阶段，第一阶段主要用于菌体（或细胞）的生长，第二阶段主要用于合成产物。

可以用各种蛋白分离的方法自含有本发明 DNA 构建体的细胞培养物中分离、纯化融合蛋白。如盐析、沉淀、超滤、液相层析等技术及这些技术的组合。其中液相层析可以用凝胶排阻、亲和、离子交换、疏水、反相等层析技术。

本发明中的融合蛋白可以有各种衍生物，这些衍生物可以是但不局限于其不同形式的盐、修饰产物等。如在多肽的氨基、羧基、羟基、琉基上再进行修饰。所用修饰剂可以但不局限于聚乙二醇，葡聚糖等。

本发明中的融合蛋白及其衍生物可单独使用，优选的为与一个或多个药学上可接受的载体一起组成药物制剂。药物载体一般应与融合蛋白相容且不能对受体自身有害，典型的载体为水、盐水、糖类、醇类或氨基酸，它们需无菌且无致热原。药物制剂可以单位剂量的形式存在，并可通过任何本领域已知的方法制备。这些方法包括将融合蛋白与具有一种或多种辅助成分混合的步骤。优选的药物制剂包括含水的液体制剂和含水量低于 10%或不含水的冻干制剂。这些制剂可以含有缓冲剂，盐类，小分子糖类等，使药物的渗透性与受体血液中的渗透性相等或相似。药物制剂可存在于单元剂量或多剂量的容器中，如密封的安瓶，西林瓶或小管中。冻干制剂是将液体制剂冷冻干燥制备的，使用前加入无菌、无热原的液态载体，如注射用水。

本发明中的融合蛋白及其衍生物或其药物组合物可以通过任何已知的方法，包括注射（如皮下或肌肉）、静脉输注、透皮、吸入、口服等方法给药。优选的方法为静脉输注或注射给药。治疗包括在一段时间内使用单一剂量或复合剂量。

使用剂量可通过融合蛋白相对于细胞因子的效价计算出，同时考虑融合蛋白相对于天然工细胞因子延长的半衰期。按照摩尔数相当即意味着使用较大重量的融合蛋白，但使用频率可降低。