

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/52

C12N 5/10



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96197751.5

[45] 授权公告日 2004 年 8 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1161469C

[22] 申请日 1996.8.22 [21] 申请号 96197751.5

[30] 优先权

[32] 1995.8.22 [33] US [31] 60/002,621

[86] 国际申请 PCT/US1996/013627 1996.8.22

[87] 国际公布 WO1997/008324 英 1997.3.6

[85] 进入国家阶段日期 1998.4.20

[71] 专利权人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 阿兰·S·劳

审查员 沈志红

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南

权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 2 页

[54] 发明名称 在细胞培养中增强干扰素生产的方法

[57] 摘要

本发明描述了在动物细胞培养物中强化干扰素生产的方法。这些方法基于干扰素生产的某些诱导剂的细胞水平，尤其是双链 RNA 依赖性激酶 (dsRNA - PKR, 或 PKR) 的细胞水平的操作。在超量生产 PKR 的细胞培养中，诱导干扰素合成至高水平，并且无需传统的病毒诱导干扰素而可收获显著量的干扰素。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种生产 α -或 β -干扰素的方法，包括：

5 (a) 从人的细胞的一个群体中选出与其它未入选的细胞相比能过量生产 RNA 依赖性蛋白激酶 PKR 的细胞，其表现为入选细胞生产的 PKR 的水平高于其它未入选的细胞生产的 PKR ；

(b) 培养上述入选细胞或其后代，所用的培养条件可导致上述入选细胞或其后代与该群体中其它未入选细胞相比，能过量生产 PKR，其表现为入选细胞生产的 PKR 的水平高于其它未入选的细胞生产的 PKR；

10 (c) 用诱导剂处理上述入选细胞或其后代，所用的诱导剂足以诱导所述细胞或其后代表达 α -或 β -干扰素，其中所述细胞或其后代的 α -或 β -干扰素生产增加；并且

(d) 从经过培养并处理的细胞或其后代收获所产生的 α -或 β -干扰素。

15 2. 权利要求 1 的方法，其中所述诱导剂选自 Poly(I):Poly(C)，Polyr(I):Polyr(C)，仙台病毒，新城疫病毒，伴刀豆球蛋白 A，衣原体，立克次氏体，促细胞分裂剂或脂多糖。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述诱导剂为非病毒性诱导剂。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞或其祖先细胞选自成纤维细胞，B 细胞或单核细胞。

20 5. 权利要求 1 的方法，其中所述干扰素为 α -干扰素。

6. 权利要求 1 的方法，其中步骤(b)还包括用启动剂进行处理。

7. 权利要求 1 的方法，其中步骤(b)还包括用启动剂进行处理，该启动剂选自豆蔻酸乙酸佛波醇酯，钙离子载体或干扰素。

25 8. 权利要求 1 的方法，其中步骤(c)还包括对所述细胞或其后代所产生的干扰素进行纯化。

9. 权利要求 1 的方法，其中步骤(c)还包括测定由所述细胞或其后代产生的 α -或 β -干扰素的量。

30 10. 权利要求 1 的方法，其中所述诱导剂选自 Poly(I):Poly(C)，Polyr(I):Polyr(C)，仙台病毒，新城疫病毒，伴刀豆球蛋白 A，衣原体，立克次氏体，促细胞分裂剂或脂多糖，其中所述干扰素为 α -干扰素，并且其中步骤(c)还包括测定由所述细胞或其后代产生的 α -或 β -干扰素的量。

11. 权利要求 1 的方法，其中所述诱导剂为非病毒性诱导剂，其中所述干扰素为 α -干扰素，并且其中步骤(c)还包括测定由所述细胞或其后代产生的 α -或 β -干扰素的量。

12. 权利要求 1 的方法，其中所述诱导剂选自 Poly(I):Poly(C)，
5 Polyr(I):Polyr(C)，仙台病毒，新城疫病毒，伴刀豆球蛋白 A，衣原体，立克次氏体，促细胞分裂剂或脂多糖，其中所述干扰素为 α -干扰素，其中步骤(c)还包括测定由所述细胞或其后代产生的 α -或 β -干扰素的量，并且其中所述细胞或其祖先细胞选自成纤维细胞，B 细胞或单核细胞。

13. 权利要求 1 的方法，其中所述诱导剂为非病毒性诱导剂，其中所
10 述干扰素为 α -干扰素，其中步骤(c)还包括测定由所述细胞或其后代产生的 α -或 β -干扰素的量，并且其中所述细胞或其祖先细胞选自成纤维细胞，B 细胞或单核细胞。

14. 权利要求 1 的方法，其中所述细胞或其祖先细胞用载体转染，该载体包含在组成型或诱导型启动子控制下的 PKR 基因。

15 15. 权利要求 14 的方法，其中所述启动子是组成型启动子。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述组成型启动子选自 CMV，RSV 或 SV 40 启动子。

17. 权利要求 14 的方法，其中的启动子是诱导型启动子。

18. 权利要求 17 的方法，其中诱导启动子选自热休克启动子，金属硫
20 蛋白启动子或糖皮质激素启动子。

在细胞培养中增强干扰
素生产的方法

5

本发明涉及在细胞培养中增强干扰素生产的方法。

根据其基本序列可将干扰素(IFN)分成两大类。I型干扰素，IFN - α 和 IFN - β ，是由含 IFN - α 基因族和所组成的无内含子的基因超家族和单个 IFN - β 基因所编码的。II型干扰素，或 IFN - γ ，仅由单型构成并且只限于淋巴细胞(T 细胞和自然杀伤细胞)。I 型干扰素介导各种生物学过程，包括：诱导抗病毒活性，调节细胞生长和分化，并调节免疫功能(Sen， G.C. 和 Lengyel， P.(1992)生物化学杂志(J. Biol. Chem.)， 267， 5017 - 5020； Pestka， S.和 Langer， J.A.(1987)生物化学年鉴(Ann.Rev.Biochem.)， 56,727 - 777)。一般在病毒感染后测定包括 IFN - α 和 IFN - β 基因族的 I 型 IFN 的诱导表达。许多研究已鉴定和 I 型 IFN 表达调节相关的启动子元件和转录因子(Du， W.， Thanos， D.和 Maniatis， T.(1993)细胞(Cell)， 74， 887 - 898； Matsuyama， T.， Kimura， T.， Kitagawa， M.， Pfeffer， K.， Kawakami， T.， Watanabe， N.， Kundig， T.M.， Amakawa， R.， Kishihara， k.， Wakeham， A.， Potter， J.， Furlonger， C.L.， Narendran， A.， Suzuki， H.， Ohashi， P.S.， Paige， C.J.， Taniguchi， T.和 Mak， T.W.(1993)细胞(Cell)， 75， 83 - 97； Tanaka， N 和 Taniguchi， T.(1992)免疫学进展(Adv.Immurol.)， 52， 263 - 81)。然而，还不清楚是什么生化信号表示病毒感染了细胞和有关的信号传输机理(一个最近的有关干扰素系统的综述，见 Jaramillo 等，癌症研究(Cancer Investigation)， 1995， 13:327 - 337)。

IFN 属于一类阴性生长因子，其具有抑制包括正常的和转化的表型的广谱的细胞种类的生长的能力。已发现 IFN 治疗对人类恶性肿瘤如：长波济肉瘤，慢性骨髓性白血病，非何杰金淋巴瘤和多毛细胞白血病以及传染性疾病如乳头瘤病毒(生殖道疣)及乙肝和丙肝是有效的(综述于 Gutterman 的美国国家科学院院刊(Proc. Natl. Acad. Sci.)， 91： 1198 - 1205,1994)。最近已批准将由遗传工程细菌生产的 IFN - β 用于治疗多发性硬化，其是一种仅在美国就影响了至少 25,000 个病人的较常见神经病。

目前, 治疗用途的 IFN 生产有两大来源, 源自人白细胞或白细胞系的天然 IFN 和在细菌细胞中生产的重组 IFN。由于天然 IFN 由 IFN 的整个补体所组成并且有合适的结构, 所以认为它更优选, 但其生产费用昂贵且费时。细菌生产的重组 IFN 则较便宜且能更有效率地生产, 但研究表明细菌生产的蛋白有较高的排斥率, 尤其是在长期使用后。例如, 以前的医学研究表明由抗体生成所反映的排斥发生率在细菌生产的 IFN 中与天然的 IFN - α 的仅 1.2 % 相比高达 20 - 38 % (Antonelli 等, 传染病杂志(J. Inf. Disease), 163:882 - 885 1991; Quesad 等, 临床肿瘤学杂志(J. Clin. Oncology)3 : 1522 - 1528, 1985)。因此, 一个强化天然 IFN 生产以使之降低成本的方法是有用的。

10 IFN 的生物学活性是通过结合于其能识别的受体并随后通过信号传导而导致诱导 IFN - 刺激基因(ISGs)而诱发。已鉴定出一些 ISGs 并检测了其生物学活性。研究的最充分的 ISGs 的例子包括双链 RNA 依赖性激酶(dsRNA - PKR, 或者就是 PKR, 以前称为 p68 激酶), 2' - 5' - 连接的寡腺等酸(2 - 5A)合成酶, 和 Mx 蛋白(Taylor JL, Grossberg SE. 病毒研究(Virus Research), 15 1990 15 : 1 - 26.; Williams BRG. 欧洲生物化学杂志(Eur. J. Biochem.), 1991 200 : 1 - 11.)。

唯一鉴定出具有激酶活性的 dsRNA - 结合蛋白是 PKR(RNA 依赖性蛋白激酶的缩写)。PKR 是一种 Ser/Thr 激酶, 其酶活性需要 dsRNA 结合和随后的自身磷酸化(Galabru, J. 和 Hovanessian, A. (1987) 生物化学杂志(J. Biol. Chem.), 262, 15538 - 15544; Meurs, E., Chony, K., Galabru, J., Thomas, N.S., Kerr, I.M., Williams, B.R.G. 和 Hovanessian, A - G. (1990) 细胞, 62, 379 - 390)。PKR 在字面上也指 dsRNA - 激活的蛋白激酶, P1/eIF₂ 激酶, DAI 或 dsI(dsRNA - 激活的抵制剂), 以及 p68(人)或 p65(鼠)激酶。已描述有类似的酶存在于兔网织红细胞, 各种鼠组织, 以及人外周血单核细胞中(Farrel 等)(1977)细胞 11, 187 - 200; Levin 等, (1987) 美国国家科学院院刊, 75, 1121 - 1125; Hovanessian(1980)生物化学(Biochimie), 62, 775 - 778; Krust 等(1982)病毒学(Virology)120, 240 - 246; Buttfet - Janvresse 等(1986)干扰素研究杂志(J. Interferon Res.), 6, 85 - 96)。研究得最充分的 PKR 在体内的底物是真核起始因子 - 2 的 α -亚基(eIF - 2a), 其一旦磷酸化将最终导致抑制细胞和病毒蛋白合成(Hershey, J.W.B. (1991) 生物化学年鉴, 60, 717 - 755)。已建议将 PKR 的这种特殊功

能作为引起介导 IFN - α 和 IFN - β 的抗病毒和抗增殖活性的一个机理。PKR 的另一个生物学功能是推断的作为信号转导蛋白的作用。Kumar 等人证实 PKR 可以磷酸化 I κ B α 从而导致核因子 κ B(NF - κ B) 的释放和激活 (Kumar, A, Haque, J, Lacoste, J, Hiscott, J, 和 Williams, B.R.G.(1994)美国国家科学院院刊 91, 6288 - 6292)。鉴于已完全鉴定的 NF - κ B 位点在 IFN - β 启动子中,这可能代表一个 PKR 介导 IFN - β 转录的 dsRNA 活化的机理(Visvanathan, K.V.和 Goodbourne, S.(1989)欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J.)8, 1129 - 1138)。

5 本发明人惊讶地发现某些 ISG 的操纵表达可便于其应用于干扰素生产。他们发现 PKR 蛋白的超表达诱导 IFN - α 和 IFN - β 干扰素的超量生产,从而用于强化动物细胞培养中的干扰素生产。

目前,有两种大量生产干扰素的方法:在细菌或哺乳动物细胞中生产重组 IFN 或于用病毒或其它 IFN 诱导剂刺激后从人白细胞中产生天然 IFN。美国专利第 5,376,567 和第 4,966,843 号描述了在中国仓鼠卵巢细胞中生产重组人干扰素;美国专利第 5,196,323 号描述了在 E.coli 细胞中生产重组人 IFN - α 。许多专利描述了用各种方法从人白细胞中生产干扰素;例如,美国专利第 4,745,053 号描述了一个用病毒诱导剂从人全血中生产干扰素的方法,美国专利第 4,680,261 号描述了一个用抗坏血酸衍生物或无机钒化合物在哺乳动物细胞培养物中诱生干扰素的方法,而美国专利第 4,548,900 号描述了一个用多元醇在引发阶段诱导干扰素的方法。目前的干扰素生产方法的主要缺点是由于其它诱导剂不能产生足够高水平的用于商业目的的干扰素,所以一般用病毒作为 IFN 诱导剂。病毒必需要在使用前从该干扰素除去,从而增加了该生产方法的时间和成本。此外,使用病毒作为诱导剂最终导致干扰素生产细胞死亡,从而不可能循环和再利用该细胞。

25 本发明通过提高一个无需使用病毒诱导剂而能生产高水平的干扰素的干扰素生产系统。虽然病毒诱导剂可用于本发明的系统,其它无需在 IFN 使用前除去的诱导剂也能以商业可接受的水平产生 IFN。

本发明的一个目的是提供一个无需加入病毒作为诱导剂而在动物细胞培养物中强化干扰素生产的方法。

30 一般地,本目的是通过提供一个动物细胞培养物,其表达干扰素基因的水平比正常表达的要具有实质性提高而实现。这可以通过操作那些能在体内调

节干扰素水平的因子的表达水平而影响, 这些因子包括干扰素转录调节因子(例如 IRF1), 干扰素受体, 及干扰素刺激基因产物(如 PKR 和 2 - 5A 合成酶)。

因此, 增加的 IFN 生产和本发明的其它目的在这里明显是通过在动物细胞培养中进行干扰素生产而完成的, 而这些细胞培养中的干扰素调节蛋白, 尤其是双链 RNA 依赖性激酶(PKR)和 2' - 5'寡腺等酸合成酶(2 - 5A 合成酶)的活性水平比正常水平有显著增加。

附图简述

图 1.pCMV - PKR 和 pMT - PKR 的示意图。

1(A)是示由源于人巨细胞病毒(CMV)立即早期的基因的启动子序列控制的正向人 PKR cDNA 的 pCMV - PKR 的图。

1(B)是示由可被镉诱导的金属硫蛋白 II 启动子控制的正向人 PKR cDNA 的 pMT - PKR 图。

图 2 在 U937 - PKR + 细胞和对照 U937 - neo 细胞中诱导干扰素。U937 - PKR + 细胞和 U937 - neo 细胞($0.5 \times 10^6/m$)培养于补充有 5%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基。用或不用 10nM PMA 预处理(“引发”)20 小时, 随后用 $10 \mu g/ml$ Poly r(I): Poly r(C)或用 0.1 TCID₅₀/细胞 EMCV 诱导 20 小时。诱导 24 小时后, 收集培养物之清液并测定 IFN - α 。空白条表示 U937 - neo 细胞, 阴影条表示 U937 - PKR + 细胞。实验组表示各种处理: 1 - 未处理; 2 - 单独用 Poly r(I): Poly r(C)诱导; 3 - 单独用 EMCV 诱导; 单独用 4 - PMA 引发; 5 - PMA 引发和 Poly r(I): Poly r(C)诱导; 6 - PMA 引发和脑心肌炎病毒(EMCV)诱导。

本发明部分地源自本发明人的发现, 即细胞培养物中干扰素生产水平可以通过控制某些通常在体内调节干扰素表达的蛋白质的表达或活性而调节。这些因子包括干扰素特异性转录因子(尤其是 IRF1), 干扰素受体, 及某些干扰素刺激的基因的产物(也称为干扰素介导的抗病毒反应), 尤其是 PKR, 任何这些因子的表达或活性增强将导致比正常水平更高的干扰素基因表达。而这可产生的结果之一是可以以更高的效率和更低的成本进行干扰素生产。本说明书的下文中将以 PKR 为例, 但可以理解的是这里所述的其它干扰素增强因子可以代替 PKR。

通过在动物细胞中增加 PKR 蛋白水平(并因此的 PKR 活性), 可以增加干扰素生产。因此, 那些表达出更高的组成水平的 PKR 或其中的 PKR 表达

可被诱导到更高水平的动物细胞培养物可用于生产干扰素。本发明的方法解决了与细胞培养生产干扰素相关的常见问题，如收获率低和污染有用于诱导干扰素表达的病毒。因此，可以得到无需用病毒诱导的高收率的干扰素蛋白(虽然可用病毒)来以更高产量生产 INF)。

- 5 该方法基于利用 PKR - 超量生产细胞作为干扰素源，但任何已知的或最近发现的干扰素生产方法均可使用。除了使用了常用的非病毒性的干扰素诱导剂外，无需特别的干扰素生产方法。特别地，本方法包括(a)在足以超量产生 PKR 的条件下培养能超量生产 PKR 或其类似物或同系物的动物细胞培养物，以及(b)适当地处理该细胞培养物以诱导干扰素，尤其是 IFN - β 和 IFN - α 基因的表达。一般地，在这些步骤后进行所生产的干扰素的纯化。在某些情况下，超量生产的并非 PKR 本身，而是 PKR 类似物，即意味着能介导干扰素转录的 dsRNA 活化的非天然的蛋白激酶(通常通过编码一种特定的 PKR 的基因的遗传操作而获自选定的动物细胞系)。用于生产干扰素的细胞培养物可以超量生产源自任何用于生产干扰素的动物细胞素的 PKR，如常见于兔网织红细胞，各种鼠组织，或人外周血单核细胞的 PKR。通常，特定的细胞系的天然 PKR(相对于外源性 PKR)用于超量表达。鼠 p65 激酶和人 p68 激酶分别优选地和更优选地超量生产于相应的鼠或人细胞培养。
- 10
- 15

- 可以通过包括许多本领域周知的方法分离 PKR 基因能超量生产的动物细胞培养物。该方法包括选择表达较高水平 PKR 的细胞，用含一个 PKR 基因(或 cDNA)的载体在一个组成型启动子(如 CMV，RSV 或 SV40 启动子)的控制下转染，或者用一个含 PKR 基因或 cDNA 在可诱导的启动子(如，热激基因，金属硫蛋白启动子或者糖皮质激素启动子)的控制下转染。如前述进行转染并选择出超量生产 PKR 的转染子。PKR 的超量生产意味着比 PKR 活性的正常水平更高。正常指在所用细胞系的正常条件下(见，例如，建议的培养条件如市售细胞的目录所提供，特别是获自美国典型培养物保藏中心，Rockville, Maryland, USA 的 ATCC 品系目录，或者若非市售，则源自描述所用的细胞系科技出版物)，而在各种优选的实施方案中是指在其它相同的条件下于亲本细胞中生产 INF，由亲本细胞选择出生产细胞系或通过遗传工程产生出生产细胞系。比正常水平更高优选地意味着正常 PKR 水平的至少 150%，更优选地至少 200 或 300%，最优选地至少 500%。根据分离或制备该培养物的特定方法，PKR - 超量表达细胞培养物可能是 PKR 超量生产
- 20
- 25
- 30

所必需或可诱导 PKR 超量表达。优选地可诱发该 PKR - 超量表达细胞培养物超量生产 PKR 以便调节可诱导 IFN 的 PKR 水平。明显地, 若可诱导 PKR 超量生产细胞培养物的超量表达, 可在诱导条件下检测 PKR 的超量生产活性。PKR 活性可通过任何本领域已知的方法或者下列实施例所述的方法测定。

任何已知的细胞培养物可作为制备 PKR - 超量生产细胞培养物的亲本株。任何能正常地生产干扰素的细胞都适于作为亲本细胞, 尤其是衍生于成纤维细胞或包括 B 细胞和单核细胞的免疫细胞的细胞。特别合适的细胞培养物是前-单核 U937 细胞, Namalwa(淋巴母细胞 B)细胞和 MRC - 5(人成纤维细胞)细胞。合适细胞还有: WI - 38 细胞, Flow1000 细胞, Flow4000 细胞, FS - 4 和 FS - 7 细胞, MG - 63 细胞, CCRF - SB 细胞和 CCRF - CEM 细胞。

在 PKR - 超量生产细胞培养物生产干扰素可通过本领域周知的方法进行。一般地, 将该干扰素生产细胞在任何合适的培养基中培养, 用诱导剂诱导干扰素的表达(以及用一个 PKR 基因诱导剂, 在 PKR 中于可诱导的启动子控制下提供), 并在诱导干扰素生产后培养。然后, 分离该干扰素。该细胞可在诱导前加入启动剂而被启动。干扰素有多种且在本领域是周知的, 而几乎任何已知的干扰素诱导剂均可用于本发明。典型的诱导剂包括 Poly(I): Poly(C), 仙台病毒, 新城疫病毒, 伴刀豆球蛋白 A, 衣原体, 立克次氏体, 促细胞分裂剂和脂多糖。优选地, 该诱导剂为非病毒诱导剂。更优选地, 该诱导剂为 Poly(I): Poly(C)或 Poly r(I): Poly r(C)。由于细胞不遭受暴露于病毒所致的有害损伤并因此可以循环再利用从而可以使生产成本较低, 因而该诱导剂优选地为非病毒性的。典型的启动剂包括因豆蔻酸乙酸佛波醇酯 (PMA), 钙离子载体和干扰素。

用本领域周知的常用技术纯化 IFN。这些技术包括抗体 - 亲和柱层析, 离子交换层析, 蛋白沉淀和离心(美国专利第 5,391,713); 用 CM - 琼脂糖凝胶, con A - 琼脂糖凝胶, 和苯基 - 琼脂糖凝胶(美国专利第 4,658,017)的色谱, 用玻璃吸着剂柱的三步色谱(美国专利第 4,732,683); 免疫亲和色谱, 反相 HPLC, 阳离子交换柱, 和凝胶过滤(美国专利第 4,765,903 号); 盐酸胍作为溶剂和 HIC 柱色谱(美国专利第 4,845,032)。

制剂中 IFN - α 水平可通过滴定 L929(鼠成纤维细胞)抗“国家过敏性和

传染性疾病研究所”的 G - 023 - 901 - 527 标准品而测定其抗病毒活性(Lau 等人, 临床研究杂志, 82 : 1415 - 1421 1988)。在该技术中, 将 5×10^4 L929 细胞接种到 96 孔微量滴定板的每一孔, 然后, 用两倍系列的培养物上清液的稀释液培养 16 小时。随后, 用 EMCV 或仙台病毒(0.1 或 0.01TCID₅₀/细胞)攻击。通过显微镜检并通过用溶于 5 % 乙醇液的 0.1 % 结晶紫染细胞而测定病毒 - 诱导的致细胞病变效果。该 IFN 滴度定义为能保护 50 % 的细胞免于病毒 - 诱导的致细胞病变效果的培养物上清液的最高稀释度的倒数。

上述步骤的是体的例子如下列实施例如述。然而, 对本领域的普通技术人员来说明显的是, 可以进行许多修改, 而除了特别指出外, 实施例只是为
10 了说明的目的而非对本发明进行限制而提供。

实施例

实施例 1 : 超量表达结构性 PKR 的细胞培养制备

通过将源于 pBS - 8.6R 的 PKR cDNA 插入到 pRC/CMV 载体的 Hind III 位点而从 pRC/CMV 中制备质粒 pCMV - PKR 以便使编码 PKR 的序列的表
15 达在 CMV 启动子的控制之下。该 pRC/CMV 质粒(Invitrogen)一般用于真核表达。该载体提供了如下的适于 PKR 转录的特征: i) 源于人 CMV(巨细胞病毒)立即早期基因的用于高水平转录的启动子序列; ii) 源于牛生长激素(BGH)基因的多腺苷酸信号和转录终止序列以增强 RMA 稳定性; iii) 游离型复制和简单载体拯救的 SV40 起点; iv) 位于多重克隆位点侧翼的 T7 和 Sp6RNA 启动
20 子用于在体外转录有义和反义 RNA; 以及 v) 用于筛选和 E.coli 中维持的氨苄青霉素抗性基因(AMP)和 ColE1 起点。该载体还包括一个 G418 抗性标记(NEO)以便于在转染到真核细胞后筛选和鉴定该质粒。该 pCMV - PKR 结构如图 1A 所示。

在一台置于 500 μ F, 250V 的基因脉冲仪(BioRad)上, 用 10mg 的每种
25 质粒电穿孔 5×10^6 处于指数生长期的生长可含 DEAE - 葡聚糖(50mg/ml)的无血清 RPMT - 1640 的 U937 细胞而收致细胞病变稳定的转染体。用 400ug/ml 遗传霉素(GIBCO - BRL)筛选 3 周得到稳定的转染体集群。随后, 通过有限稀释克隆得到克隆系。在含 10 % 胎牛血清(完全培养基)和遗传霉素的 RPMI - 1640 中培养细胞系。筛选出一个代表性转染细胞系并称为 “U937
30 - PKR +”。检测 U937 - PKR + 中生产的 PKR 水平并发现比正常(亲本)水平增加了大约五倍。作为对照, 用 pRC/CMV 转染 U937 细胞, 并分离出一

个代表性的转染细胞系,称为“U937 - neo”。在有或无启动剂和/或诱导剂存在下测定该转染细胞系的IFN生产。

在补充有胎牛血清的RPMI 1640培养基中培养U937 - PKR + 细胞和U937 - neo细胞。用有或无豆蔻酰佛波醇乙酯(PMA)(10nM)预处理该细胞20
5 小时并随后用或不用Poly r(I): r(C)(10ug/ml)刺激20小时。用Poly r(I): r(C)刺激24小时后,收集培养上清液用于IFN检测。

如图2所示,两种转染细胞系在无启动剂或诱导剂存在下均不能自发地产生IFN。响应于Polyr(I): Polyr(C),对照U937 - neo细胞在有或无PMA启动(空白柱2和5)下均表现出最低的IFN - α 合成。相反,U937 - PKR
10 + 细胞在有或无PMA启动下响应于Polyr(I): Polyr(C)诱导而表现出增加的IFN生产,并且当用Polyr(I): Polyr(C)和PMA(阴影柱2和5)同时处理时可达到4000U/ml的水平,在无PMA启动时,EMCV在两个转染细胞系(超过1000U/ml)均诱导出高水平IFN,而在U937 - PKR + 细胞(柱3)中则只诱导出稍高水平的,在无EMCV或Polyr(I): Polyr(C)诱导剂时,U937 - PKR
15 + 细胞响应于只有PMA启动(柱4)而产出比U937 - neo细胞的更高的IFN水平。用PMA启动和EMCV诱导,两个细胞系均产生出超过4000U/ml IFN(柱6)。总之,这些结果表明用PMA启动后,以Polyr(I): Polyr(C)作为诱导剂时在IFN生产方面该U937 - PKR + 细胞在同对照细胞有以病毒作为诱导剂时一样有效。因此,当使用PKR - 超量表达细胞时,可以避免使用活病毒进行
20 IFN生产。

用Polyr(I): Polyr(C)诱导后,用台盼蓝排斥实验检测U937 - PKR + 细胞生存力。我们发现超过95%的细胞存活。相反,使用EMCV作为诱导剂导致了全部细胞的死亡。因此,U937 - PKR + 细胞可以循环利用来进行连续的IFN生产。

25 实施例2:可诱导超量表达PKR的细胞培养的制备

用镉-可诱导性金属硫蛋白II启动子代替pCMV - PKR中PKR克隆位点上游的CMV启动子而制备质粒pMT - PKR(Hewison等,免疫学杂志(J. Immunol.), 153: 5709 - 5719 1994)。pMT - PKR的结构示于图1B。如
30 实施例1中对pCMV - PKR转染子所述分离pMT - PKR对U937细胞的稳定的转染体。用锌或镉离子可诱导MT II启动子。在加入20 μ M氯化镉诱导该转染的PKR基因后,测定该转染体中PKR活性水平。

本说明书中涉及的所有出版物和专利申请均以每个出版物或专利申请单独引入的相同的程度而以参考文献的形式并入本发明。

现已充分描述了本发明，很明显地，对本领域的普通技术人员来说，许多改变和修改均可在未脱离所述的发明的精神和范围的条件下进行。

5

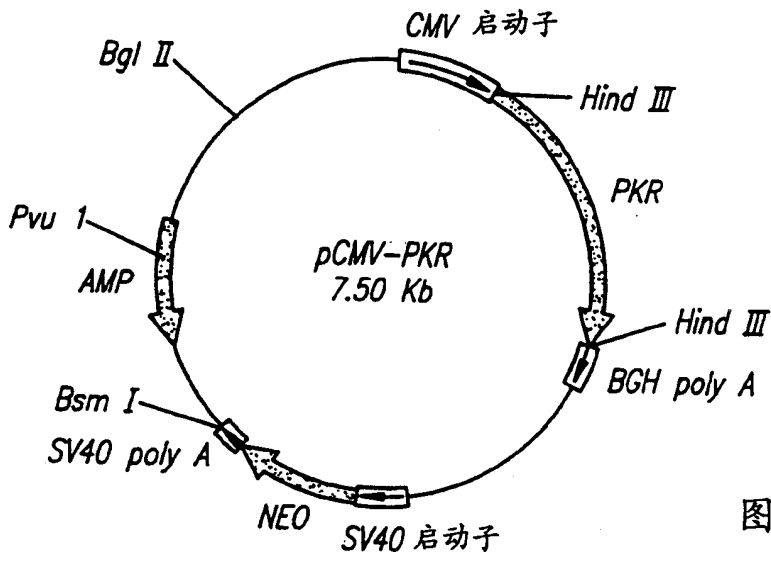


图 1A

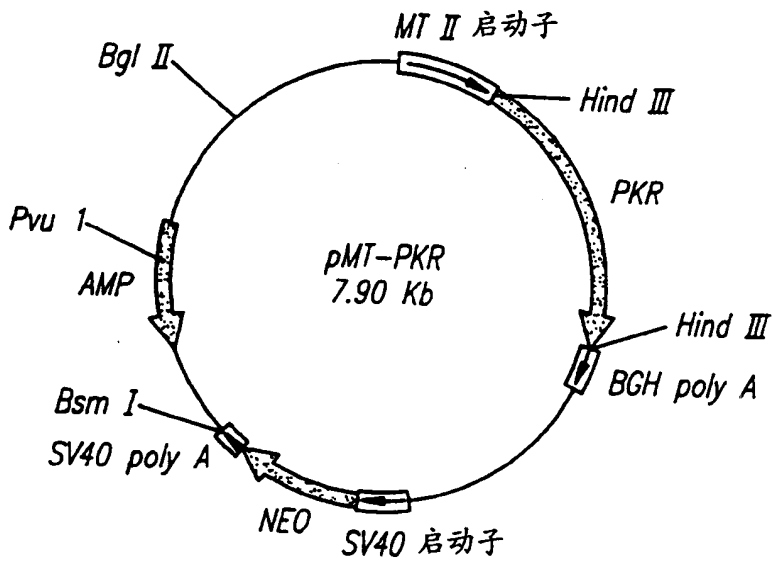


图 1B

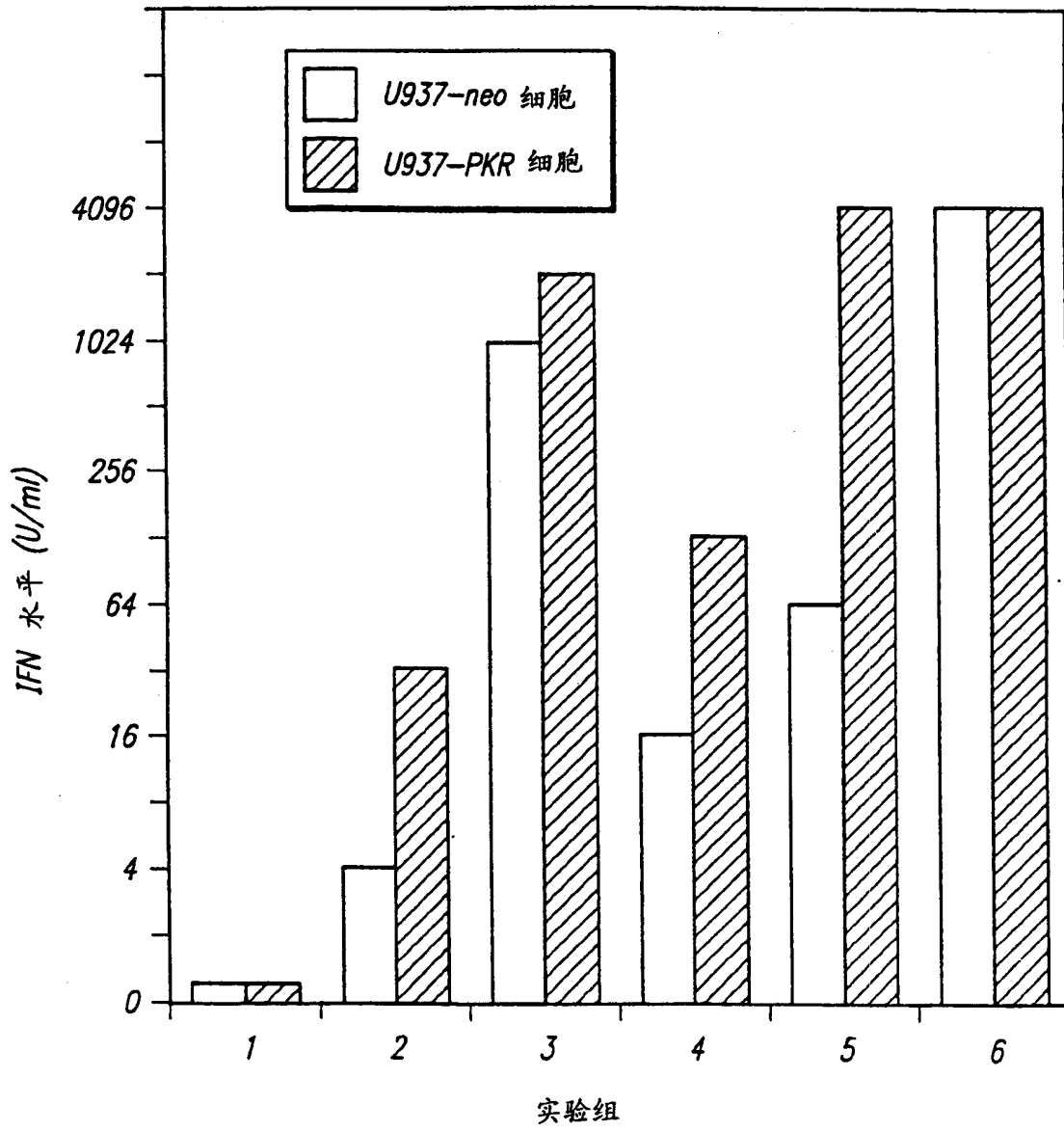


图 2