

## 基因工程生长激素研究进展

马昭若

(中国专利局 100083)

生长激素是一种由动物的脑垂体产生并分泌的蛋白质激素。生长激素促进骨骼生长、氮保留和蛋白质合成,并影响葡萄糖与脂类代谢。

历史上,一般都是从切除的垂体组织中分离纯化生长激素<sup>[1]</sup>。八十年代初以来,随着重组DNA技术的产业化,已可以由微生物大量产生各种来源不含其他杂蛋白的生长激素<sup>[2-3]</sup>。例如,Frazier 等人在酵母细胞中表达牛生长激素<sup>[4]</sup>;Goeddel 和 Heyneker 描述了构建并在大肠杆菌中表达人生长激素基因的方法<sup>[5]</sup>;Nagaswararao 公开了以高产率生产重组猪生长激素的方法<sup>[6]</sup>。

近年来,由于重组DNA技术的不断改进和发展,出现了许多通过在DNA水平上改变结构基因编码顺序、改换新的启动子或重组载体途径,以期提高生长激素表达产物的生物学活性、贮存稳定性及产率的方法。本文仅就近年来反映在专利文献中的有关重组牛和猪生长激素的技术进展作一简要总结。

### 一、制备小环修饰的重组生长激素,以提高表达产物的贮存稳定性

天然猪生长激素(npST)是有190个氨基酸的多肽,顺序中有两个形成特征性小环和大环的半胱氨酸桥键。其中小环是由180位和188位上半胱氨酸之间的氨基酸形成的,大环则是在163和52位氨基酸之间形成。事实上,所有天然生长激素都带有上述小和大环的特征性四级构型。

M. Nagaswararao 等人首先构建了编码 $\delta$ -9(Ser)牛生长激素(bGH)(即比天然顺序少9个N末端氨基酸并在N末端带有一附加的丝氨酸残余)的重组质粒,其中带有P<sub>L</sub>启动子—操纵子并具有衍生于噬菌体mu(Pmu)的

Shine-Dalgarno(SD)区域。另外相应大肠杆菌转化体还含有编码cI857温度敏感性阻遏蛋白的第二个质粒(pcI857)。阻遏蛋白可在大约37—42℃的温度下失活,从而诱导 $\delta$ -9(Ser)牛生长激素的表达。继后,他们以相近的重组技术表达了 $\delta$ -7猪生长激素<sup>[7]</sup>。

然而,以上述方法生产的生长激素并不能在持续保留活性的情况下长期储存。在长期储存期间,常常会形成无生物学活性的二聚体、寡聚体及其他不溶性聚集物。

为此,Sylenki M. Richard (PIMAN—MOORE Inc.)使用由Kunke等人建立的位点特异性诱变方法<sup>[8]</sup>,用编码丙氨酸的密码子取代编码肽顺序173和181位上半胱氨酸的密码子,对 $\Delta$ 7<sub>p</sub>ST的DNA编码顺序进行定点修饰。据信,由于丙氨酸的侧链比其他氨基酸的侧链小,所以取代后所造成的分子立体扭曲就比较小<sup>[9]</sup>。另外,考虑到天冬酰胺的酰胺基团和丝氨酸的羟基基团可以维持生长激素分子的四级结构而防止其分子内键合,因而研究者还分别用编码天冬酰胺和丝氨酸的密码子取代173位和181位上编码半胱氨酸的密码子。试验结果显示,这些修饰有利于保持生长激素的长期储存稳定性。

### 二、以定点诱变方法修饰生长激素结构基因,生产带N末端丙氨酸的牛和猪生长激素

因为ATG启动密码子本身也是蛋氨酸密码子,所以除非所期望的成熟蛋白质是以蛋氨酸开始的,否则在其加工过程中都将在氨基(N)末端被包括蛋氨酸在内的基团所取代。

然而,由于下述几个原因,将N末端蛋氨酸加到天然蛋白质的N末端上总是不甚理想:

首先,在生物体中的内源性生长激素都是 N 末端没有蛋氨酸的,如外加一个蛋氨酸便有可能使蛋白质呈现一定程度的抗原性;其次,将蛋氨酸加到蛋白质的 N 末端部分对其生物学活性及物理学特征可能造成不希望存在的影响;第三,蛋白质的这种改变形式会妨碍更准确地研究天然蛋白质结构与其功能间的相互关系;最后,使一种生物合成的蛋白质在结构上尽可能地接近其天然形式,将会使相应产物更易于通过政府部门的药物审批。

1985 年, Monsanto 公司用定点诱变技术修饰生长激素基因,制备了 N 末端丙氨酸牛和猪生长激素,并申请了包括中国在内的多国专利<sup>[10]</sup>。他们的研究结果还表现,当用缬氨酸(V)取代 126 位上的亮氨酸(L)时,可大大提高生长激素蛋白质的生物学有效性或生物学反应性。例如,与 bGH(A,L)相比,使用 bGH(A,V)可使牛奶产量增加 50%,而使用 met-bGH(V)又比使用 met-bGH(L)的牛奶产量增加约 17%<sup>[10]</sup>。

### 三、对 DNA 编码顺序的内部密码子进行置换或缺失修饰,制备有更好生物学活性或稳定性的生长激素类似物或突变蛋白质

为回收微生物产生的蛋白质,蛋白质产物通常需要经受一个复性过程,使蛋白质溶解、折迭并氧化成为其天然构型。另外,继后的纯化过程须在高 pH 和较低温度下完成。已发现生长激素在这些条件下可能产生两种主要分解产物:(1)因位于蛋白质链中部(95—101 位)的天冬酰胺变为天冬氨酸而形成的异型生长激素;(2)由于肽链在链中部的天冬酰胺处发生断裂而产生的两条链形式的分子。这些分子通常在加工中被除去而导致产率降低。

为解决上述问题, Grabowski 等人(Monsanto Co.)使用寡核苷酸定点诱变技术修饰起始基因,构建包含用谷氨酸胺取代 95—101 位区域中天冬酰胺的突变基因,然后使用质粒 pMON2534 作为载体,由缺失 fhu A 基因的大肠杆菌 W3110 菌株作宿主表达产生 Gln98 生

长激素。该突变蛋白表现出具有与相应未突变生长激素基本等同的生物学活性,而且在高 pH 和升高的温度下相对更为稳定<sup>[11]</sup>。

另外, Parcells 等人(Upjohn Co.)制备了 53、164、181 和 189 位,特别是 53 和 164 位上的至少一个半胱氨酸残基被丝氨酸取代的牛或猪生长激素。这些生长激素类似物提高了生长激素的生物学活性、可加工性及产品的均一性<sup>[12]</sup>。

Amgen 公司的 Sowza 以常规重组 DNA 技术制备了存在氨基酸缺失的重组猪生长激素(pGH)类似物,所得重组蛋白质产物可用通式  $Z-pGH_1-31-(X)_n-pGH39-190$  表示,其中 n 是 1, Z 是 Ala, X 是顺序—Glu—Ala—Tyr—Ile—Pro—Glu 或—Glu—Arg—Ala—Tyr—Ile—Glu。即分别是: Ala—pGH1—36, 38—190”和“Ala—pGH1—32, 34—190”(其中逗号代表缺失)<sup>[13]</sup>。

### 四、使用粘质赛氏杆菌的 Erp 启动子高水平表达生长激素

包括牛生长激素在内的某些异源多肽难以在大肠杆菌系统中表达。然后,已经知道当对编码 bGH 结构基因之 cDNA 的前 4 个密码子进行修饰,并在 pBR322 相关载体特别是自发失表达载体中表达经过修饰的 cDNA 时,即可导致表达水平的增加<sup>[14]</sup>。

因为基因产物的大量积聚常常会抑制细胞生长甚至引起细胞死亡,所以选用的启动子在其被诱导之前应以一种使细胞生长达到高密度的方式受到调节。为此目的,可以使用大肠杆菌色氨酸生物合成途径的启动子和操纵区(trp 启动子),以及  $\lambda$  噬菌体的左向启动子( $P_L$ )。

另外,虽然粘质赛氏杆菌(*Serratia marcescens*)与大肠杆菌 trp 启动子在核苷酸顺序上有很明显差异,但就操纵子位点来说在两启动子之间是很保守的,而且已显示粘质赛氏杆菌启动子可受 trp 阻遏蛋白的调节。

据此, Edward 等人(Upjohn Co.)在 pU-RA-4 质粒载体中组配并导入了粘质赛氏杆菌启动子,然后在大肠杆菌 M1000 菌株中成功

地表达了牛、猪和羊生长激素。对考马斯兰染色的蛋白质凝胶进行扫描,结果显示该重组质粒所表达的牛生长激素水平约占总蛋白质的20%<sup>[15]</sup>。

### 五、使用包含 $\lambda$ 启动子和 $T_1T_2$ rRNA转录终止顺序的表达质粒改善生长激素的表达水平

众所周知,转译的起始步骤包括核糖体结合在mRNA的Shine-Dalgarno(SD)顺序或核糖体结合位点上。当核糖体沿着mRNA移向AUG转译起始密码子时,即开始多肽合成。业已证明,相当于SD区域和AUG密码子的RNA结构以及SD顺序与AUG密码子之间的距离在决定转译效率上起着重要作用。另外,已知在大肠杆菌中表达真核生物蛋白质所遇到的一个主要困难是这些大量产生mRNA的原核细胞不能有效地生长,而这一困难将借助阻遏蛋白对转录过程的抑制而排除。当微生物生长达到一定的细胞密度后,被抑制的基因将因阻遏蛋白的破坏或因诱导剂分子的加入而得以活化。

基于这些知识,在已有技术的基础上,Openheim等人(Bio-Technology General Corp.)构建了用于表达牛或猪生长激素的新的质粒。该质粒是从5'到3'方向包含下列元件的双股DNA分子:

- (a) $\lambda$ 噬菌体启动子和操纵子 $P_{LO_2}$ ;
- (b)结合大肠杆菌宿主细胞产生之反终止子N蛋白的N利用位点( $N_{utL}$ );
- (c)来自 $\lambda$ 噬菌体的突变 $C_1$ 核糖体结合位点;
- (d)包括ATG起始密码子的NdeI限制性酶切位点;
- (e)插入NdeI位点中的牛或猪生长激素DNA编码顺序;
- (f) $T_1T_2$ rRNA转录终止顺序(该顺序距结构基因不超过100碱基对)。

另外,该载体还包含大肠杆菌质粒pBR322的复制原点 and 与可选择或可鉴定表型相关的基因,其中 $P_{LO_L}$ 启动子/操纵子顺序与

N利用位点之5'端间的距离小于80碱基对,且N利用位点之3'端与核糖体结合位点5'端的距离小于300碱基对。

当将其引入含不耐热阻遏蛋白 $C_1$ 的大肠杆菌后,可使宿主细胞在温度增加到导致阻遏蛋白失活的条件下影响编码基因的表达。在该质粒中使用不同的核糖体结合位点有可能提高不同多肽的表达水平。另外,在多肽编码基因的3'端置入 $T_1T_2$ rRNA转录终止顺序有可能增加相应多肽的产率。实验表明,利用该重组质粒生产bGH,从13千克大肠杆菌(湿重)中分离纯化得到70克纯的bGH<sup>[16]</sup>。

### 六、改变生长激素分子的 $\alpha$ 螺旋区域,并结合其他天然氨基酸的改变产生生长激素类似物

生长激素分子含有4个 $\alpha$ 螺旋,且配成 $\alpha$ 螺旋簇或束。一般说来,突入到该结构核心中的氨基酸侧链是极性的、疏水的并且是彼此紧密束缚在一起的,从而使极性溶剂(如水)不能渗入螺旋簇的中心。对于牛或猪生长激素来说,在蛋白质浓度超过1mg/ml时, $\alpha$ 螺旋的疏水表面暴露而促使形成所谓的“联合中间体”(associative intermediates)。这些“联合中间体”可能代表了 $\alpha$ 螺旋的另一种群集排布,形成使该螺旋的疏水表面与水环境重新折离的多聚结构,从而减低了生长激素的溶解度。

为了解决生长激素的低溶解度问题,Fischer等人(Bio-Technology General Corp.)使用定点诱变技术,特异地改变 $\alpha$ 螺旋1或3和/或2区域的氨基酸顺序,并结合对生长激素分子的其他突变,例如用甘氨酸、精氨酸或赖氨酸取代天然分子中的1至4个半胱氨酸,或将半胱氨酸换成胱氨酸,制得修饰后净增加两个氨基酸的重组猪生长激素(pST)蛋白质。

如此制得的生长激素比天然分子更为稳定而且更易溶于水,因此特别适合于配制体内应用的缓释制剂<sup>[17]</sup>。

### 七、造成牛生长激素 $\alpha$ 螺旋3的突变,制得该蛋白质的具有生长抑制活性的拮抗剂

人们已制备了许多表现出相近但不同的生

长促进活性的生长激素类似物,并已报导了几种表达生长激素活性表型的转基因动物(如兔、牛和猪)。但以前还没有描述过具有生长抑制活性的生长激素类似物,以及表达生长激素拮抗剂并表现有降低了的生长表型的转基因动物。

1991 年, Kopchick (Ohio University Edison 动物生物工程中心)在深入研究了相当于 bGH 分子第三个  $\alpha$  螺旋的亚顺序(约为氨基酸 106—129)中各氨基酸在  $\alpha$  螺旋形上的作用后,首先用位点特异性诱变方法对野生型 bGH 分子中 119 和 120 位氨基酸进行取代修饰,制得多个不同的 bGH 突变蛋白,如 G119R(119 位 Arg)、G119K(119 位 Lys)、G119W(119 位 Trp)或 G120W(120 位 Trp)、G120R(120 位 Arg)等。这些突变蛋白可由转化的小鼠细胞表达并分泌,也可由经微量注射重组 DNA 分子而产生的转基因动物体内表达并显示出相应表型特征<sup>[18]</sup>。

有实验证据表明,bGH 中 119 位 Gly 突变为 Arg (“G119R”)、Pro (“G119p”)、Lys (“G119k”)、Trp(G119W”)或 Leu(“G119L”),或者使 Gly120 突变为 Arg(“G120R”)或 Trp (“G120W”),所得突变蛋白与野生型 bGH 相

比,表现有净生长抑制活性。因此,可望使用这些突变蛋白质生产小动物(如宠物或小家畜)。

另外,基于对各突变蛋白质生物学活性的进一步了解,可预期将其应用于治疗巨人症和糖尿病,控制血胆固醇,以及预防或治疗某些肿瘤。

### 参考文献

1. Li, J. Biol. Chem. 2 11:55(1954)
2. Seeburg, et al., Nature, 2 76:795—798(1978)
3. Seeburg, et al., DNA, 2:37—45(1985)
4. U. S. Patent No. 4,443,539
5. U. S. Patent No. 4,604,359
6. European Patent Appl. No. 0104 920
7. European Patent Appl. No. 0103 395
8. Kunkel, et al., Methods in Enzymology, 154: 376 — 382 (1987)
9. PCT Intern. Publ. No. WO 92/01789
10. 中国专利 ZL 86101830
11. European Patent Appl. No. 0363 342
12. PCT Intern. Publ. No. WO 90/08823
13. U. S. Patent No. 5,104,806
14. PCT Intern. Publ. No. WO 88/06186
15. PCT Intern. Publ. No. WO 90/05186
16. U. S. Patent No. 5,126,252
17. European Patent Appl. No. 049673
18. PCT Intern. Publ. No. WO 92/19736



## 在中国申请行政保护的生物技术产品

自 1993 年以来,根据国务院批准的《药品行政保护条例》,国家医药管理局药品行政保护办公室受理和审批的有关生物技术(基因工程)药物有:日本中外制药株式会社的基因重组 G—CSF,美国安进公司(Amgen)的 G—CSF 和促红细胞生成素(EPO)。具体情况如下表所示。(截止到 1994 年 7 月份)。

				申请药品		
申请日	申请号	授权日	授权号	申请人	通用名	商品名
93. 7. 3	A-JP93070306	94. 2. 22	B-JP94021403	日本中外制药株式会社	G—CSF Lenograstim	granocyte 格拉诺赛特
93. 7. 20	A-US93072011			美国 Amgen 公司	G-CSF Filgrastim	Neupogen <sup>注(1)</sup>
93. 8. 10	AUS93081015			美国 Amgen 公司	促红细胞生成素 Erythropoietin, $\alpha$ -Epoetin	Epogen <sup>注(2)</sup> 依泊金

注(1). 经审查不符合行政保护条件,已驳回申请;  
注(2). 经审查,不符合行政保护条件,已驳回申请。

(胡圣榆 供稿)