[19]中华人民共和国专利局

[11] 公开号 CN 1138350A

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94194575.8

[51]Int.Cl[6]
C12N 15/24

[43]公开日 1996 年 12 月 18 日

[22]申请日 94.10.19

[30]优先权

[32]93.10.20[33]US[31]08/140,222

[86]国际申请 PCT/US94/11873 94.10.19

[87]国际公布 WO95/11303 英 95.4.27

[85]进入国家阶段日期 96.6.20

[71]申请人 里珍纳龙药品有限公司

地址 美国纽约州

[72]发明人 N·斯塔尔赫尔 A·埃科挪米德斯
G·D·杨科波劳斯

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 姜建成

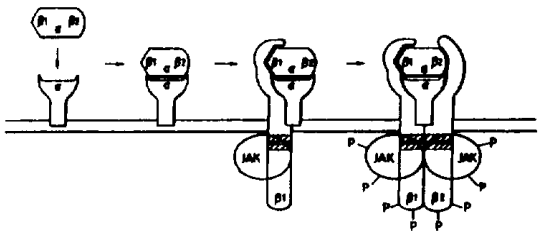
C07K 14/54 C07K 14/52
C07K 14/715 C12N 15/19
C12P 21/02 A61K 38/17
A61K 38/20 A61K 38/19

权利要求书 4 页 说明书 20 页 附图页数 3 页

[54]发明名称 CNTF家族拮抗物

[57]摘要

包含细胞因子受体的可溶性α特异性决定组分以及β受体组分的细胞外域的异二聚体蛋白，行使CNTF和IL-6拮抗物功能。



# 权利要求书

1．一种sRα：β$_1$异二聚体蛋白，它包括一种可溶性决定α特异性的细胞因子受体组分和一种可溶性细胞因子受体的β$_1$组分。

2．权利要求1的蛋白，其中细胞因子是CNTF细胞因子家族的成员。

3．权利要求1的蛋白，其中β$_1$受体是gp130。

4．权利要求1的蛋白，其中β$_1$受体是LIFRβ。

5．权利要求2的蛋白，其中细胞因子是CNTF，所述α受体是sCNTFRα，所述β$_1$受体是gp130。

6．权利要求2的蛋白，其中细胞因子是ＩＬ－６，所述α受体是sIL－６Rα，所述β$_1$受体是gp130。

7．一种ＩＬ－６蛋白，它包括一种β$_2$突变，其中所述突变使得当所述ＩＬ－６与ＩＬ－６Rα和第一个gp130分子形成复合物后，不能与第二个gp130分子结合。

8．一种CNTF蛋白，它包括一种β$_2$－突变体，其中所述突变使得当CNTF与CNTFRα和gp130形成复合物后，不能与LIFRβ结合。

9．一种分离ＩＬ－６拮抗物的方法包括：

１）得到一种产ＩＬ－６的克隆；

２）用随机突变或靶突变的方法使此种克隆突变以产生表达ＩＬ－６突变体的亚克隆；

３）回收此亚克隆所产生的突变的ＩＬ－６分子；

４）将具有以下特性的突变的ＩＬ－６分子鉴定为ＩＬ－６拮抗物，当该分子与ＩＬ－６Rα和第一个gp130分子形成复合物后，

就不能再结合第二个gp130。

10．权利要求9的方法，其中的鉴定包括：

i）将IL－6Rα：$\beta_1$异二聚体加至突变的IL－6分子以形成IL－6／IL－6Rα：$\beta_1$中间产物；

ii）将可探测的gp130加至所述中间产物以形成IL－6：IL－6Rα：$\beta_1$：$\beta_2$复合物；

iii）通过测定IL－6：IL－6Rα：$\beta_1$：$\beta_2$复合物中可探测的gp130的量来确定所述可探测gp130与IL－6／α$\beta_1$中间产物的结合。

11．一种分离IL－6拮抗物的方法包括：

1）得到一种产IL－6的克隆；

2）用随机突变或靶突变的方法使此种克隆突变为产生表达IL－6突变体的亚克隆；

3）表达突变的IL－6分子；

4）将所述突变的IL－6分子与IL－6Rα结合形成IL－6／IL－6Rα复合物；

5）将可探测的gp130加至所述IL－6／IL－6Rα复合物；

6）将具有以下特性的突变IL－6分子鉴定为IL－6拮抗物，当该分子出现在所述IL－6／IL－6Rα复合物中时，该分子不能与所述可探测gp130结合。

12．一种分离 CNTF 拮抗物的方法包括：

1）得到一种产 CNTF 的克隆；

2）用随机突变或靶突变的方法使此种克隆突变以产生表达 CNTF 突变体的亚克隆；

3）回收此亚克隆所产生的突变的 CNTF 分子；

4）将具有以下特性的突变的 CNTF 分子鉴定为 CNTF 拮抗物，当该分子与 CNTF Rα和第一个gp130分子形成复合物后，就不能再结合LIFRβ。

13．权利要求12的方法，其中鉴定包括：

i）将 CNTF Rα：$\beta_1$ 异二聚体加至突变的 CNTF 分子以形成 CNTF／CNTF Rα：$\beta_1$ 中间产物；

ii）将可探测的LIFRβ加至所述中间产物以形成 CNTF：CNTF Rα：$\beta_1$：$\beta_2$ 复合物；

iii）通过测定 CNTF：CNTF Rα：$\beta_1$：$\beta_2$ 复合物中可探测的LIFRβ的量来确定所述可探测LIFRβ与 CNTF／α$\beta_1$ 中间产物的结合。

14．一种分离 CNTF 拮抗物的方法包括：

1）得到一种产 CNTF 的克隆；

2）用随机突变或靶突变的方法使此种克隆突变为产生表达 CNTF 突变体的亚克隆；

3）表达突变的 CNTF 分子；

4）将所述突变的 CNTF 分子与 CNTF Rα结合形成 CNTF/CNTF Rα复合物；

5）将可探测的gp130加至所述 CNTF／CNTF Rα复合物；

6）将具有以下特性的CNTF分子鉴定为CNTF拮抗物，当该分子出现在所述CNTF／CNTFRα复合物中时，不能与可探测gp130结合。

15．编码权利要求1－8之任一的蛋白的DNA序列。

16．以上权利要求1、7或8之任一特别提及的蛋白。

17．一种药物组合物包括权利要求1至8或16之任一的蛋白和药用载体。

18．一种用于治疗与IL－6相关疾病或紊乱的药物组合物，该组合物包括权利要求6或7的蛋白和一种药用载体。

19．权利要求6或7的蛋白它用于一种治疗雌激素衰竭患者的骨质疏松症的方法。

20．权利要求6或7的蛋白，它用于一种治疗患者的多发性骨髓瘤的方法。

21．权利要求6或7的蛋白，它用于一种治疗患者的恶病质的方法。

# 说 明 书

## CNTF家族拮抗物

虽然由于不同的生物学活性而得以发现，但是纤毛神经营养因子（CNTF），白血病抑制因子（LIF），oncostatin M（OSM）和白介素6（IL-6）包含于一个新近定义的细胞因子家族（在此指细胞因子“CNTF”家族）。这些细胞因子由于它们远缘的结构相似性[Bazan, J. Neuron 7：197-208 (1991)；Rose and Bruce, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88：8641-8645 (1991)]，而且也许更重要的是因为它们共享“β”信号转导组分[Baumann, et al., J. Biol. Chem. 265：19853-19862 (1993)；Davis. et al., Science 260：1805-1808 (1993)；Gearing et al., Science 255：1434-1437 (1992)；Ip et al., Cell 69：1121-1132 (1992)；Stahl, et al., J. Biol. Chem. 268：7628-7631 (1993)；Stahl and Yancopoulos, Cell 74：587-590 (1993)]。而归于一类。该细胞因子家族可以由这些β组分的同二聚体化或异二聚体化而进行受体激活。[Davis, et al., Science 260：1805-1808 (1993)；Murakaml, et al., Science 260：1808-1810 (1993)；Stahl and Yancopoulos, Cell 74：587-590 (1993)]。IL-6受体激活需要gp130同二聚体化[Murakaml, et al.,; Science 260：1808-1810 (1993)；Hibi, et al., Cell 63：1149-1157 (1990)]，gp130是一种蛋白，它最初被鉴定为IL-6信号转换部[Hibi, et al., Cell 63：1149-1157 (1990)]。

由gp130和被称为LIFR β的第二个gp130相关蛋白之间的异二聚体化而引起CNTF LIF和OSM受体激活[Davis, et al., Science 260：1805 - 1808 (1993)]。LIFR β最初由于它结合于LIF而得以鉴定[Gearing et al., EMBO J. 10：2839 - 2848 (1991)]。

在β组分之外，这些细胞因子之中几个还需要决定特异性的“α”组分。与β组分相比，“α”组分在其组织分布上更受限制，因而决定了特定细胞因子的细胞靶点[Stahl and Yancopoulos, Cell 74：587 - 590 (1993)]。因此，LIF和OSM是广泛作用因子，它们可能仅需应答细胞上gp130和LIFR的出现，而CNTF则需要CNTFR α[Stahl and Yancopoulos, Cell 74：587 - 590 (1993)]，IL-6需要IL-6Rα[Kishimoto, et al., Science 258：593 - 597 (1992)]。CNTFRα(Davis et a l., Science 259：1736 - 1739 (1993)和IL-6Rα[Hibi, et al., Cell 63：1149 - 1157, Murakami et al., Science 260：1808 - 1810 (1990)；Taga, et al., Cell 58：573 - 581 (1989)]作为可溶性蛋白而起作用，这与这一学说相一致：它们并不与胞内信号分子相互作用，而是辅助它们的配体与合适的信号转导β亚基相互作用[Stahl and Yancopoulos, Cell 74：587 - 590 (1993)]。

来自其它细胞因子系统的另外的证据也支持这一学说：二聚体化提供了一种共同机制，借此机制所有细胞因子受体起始信号转导。关于这点生长激素（GH）可能能够作为最好的例证。晶体学研究揭示每个GH分子包含两个不同的受体结合位点，这两个位点都可被受体的同一结合域所识别，使得单个GH分子接合了两个受体分子[de Vos, et al, Science 255：306 - 312 (1992)]。二聚体化顺次发生，GH上的位点I首先结合于受体分子，然后结合于第二个受体

分子[Fuh, et al., Science 256 : 1677 - 1680 (1992)]。关于促红细胞生成素（EPO）受体的研究结果与二聚体化在受体激活过程中的重要性相一致，因为借助于改变一个氨基酸而导入一个半胱氨酸残基，从而造成二硫键相联的同二聚体，使得EPO受体被组成性地激活[Watowich, et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 : 2140 - 2144 (1992)]。

在以β亚基的同或异二聚体化作为受体激活的关键步骤之外，第二个重要的特点是由细胞因子CNTF家族形成最终受体复合物，该复合物的形成借助于一种通过配体有顺序的与受体组分逐个结合的机制[Davis, et al., Science 260 :1805 - 1808 (1993)]。因而CNTF首先与CNTFRα形成一个复合物，该复合物随后与gp130结合以形成并不足以产生信号的中间产物(在此叫做αβ1中间产物)，因为在最终补充LIFRβ以形成起始信号转导的β组分的异二聚体之前，它仅有一个单个的β组分。虽然一个类似的包含结合于IL-6Rα的IL-6和gp130的单个分子的中间产物还没有被直接分离得到，通过与其远亲CNTF类比，以及激活的IL-6受体复合物补充了两个gp130单体的事实我们推断上述中间产物并不存在，总之，这些发现引起关于遗传的细胞因子受体复合物（Figune 1）的结构的建议：每个细胞因子可有多至3个受体结合位点：一个位点结合于任选的α特异性决定组分（α位点），一个位点结合于第一个β信号转导组分（$\beta_1$位点），以及一个位点结合于第二个β信号转导组分（$\beta_2$位点）[Stahl and Yancopoulos, Cell 74 : 587 - 590 (1993)]。这3个位点被顺次使用，在最后步骤中形成复合物——导致β组分二聚体化——这对于起始信号转导来说，是关键性的[Davis, et al., Science 260 :1805 - 1818 (1993)]。受体激活的细节的知晓和对

于CNTF非功能性β₁中间产物的存在，引出这样的发现：在一些情况下CNTF是 IL－6的高度亲和拮抗物，并提供了在下面详尽描述的设计细胞因子CNTF家族的配体或基于受体的拮抗物的战略基础。

一旦细胞因子结合诱导了受体复合物的形成、β组分二聚体化激活胞内酪氨酸激酶活性，引起多种底物磷酸化[Ip et al., Cell 69 : 1121 - 1132 (1992); Nakajima and Nall, Mol. Cell. Biol. 11 : 1409 - 1418 (1991)]。酪氨酸激酶的激活看来对于下游事件是关键性的，因为封阻酪氨酸磷酸化的抑制剂也阻止了晚期事件，例如基因诱导的发生[Ip et al., Cell 69 : 121 - 1132 (1992), Nakajima and Wall, Mol. Cell. Biol. 11 : 1409 - 1418 (1991)]。近来，我们证实了一个新近发现的非受体酪氨酸激酶家族，包括Jak1, Jak2及Tyk2（称为Jak/Tyk激酶）[Firmbach - Knaft, et al., Oncogene 5 : 1329 - 1336 (1990); Wilks et al., Mol. Cell. Biol. 11 : 2057 - 2065 (1991)]以及与其它细胞因子一同卷入了信号转导[, et al., Cell 74 : 237 - 244 (1993); Silvennoinen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (in press; 1993); Velazquez, et al., Cell 70 : 313 - 322 (1992); Witthuhn, et al., Cell 74 : 227 - 236 (1993)]。在没有配体的情况下，预先结合gp130和LIFRβ的β亚基的胞浆域，在配体加入时，变为酪氨酸磷酸化的和激活的[Stahl, et al., Science (submitted ; (1993)]。因而这些激酶看来是由配体在细胞外结合引起的胞内信号转导在细胞内激活的最接近的一步。在下面描述了基于此系统的，用于筛选具有特异激动物或拮抗物活性的小分子收集物的试验系统。

细胞因子的CNTF家族在很多生理过程中起重要作用，因而具有作

为拮抗物和激动物在治疗中应用的潜能。

## 发明概要

本发明的一个目的是生产可用于治疗ＩＬ－６相关疾病和紊乱的ＩＬ－６拮抗剂。

本发明的另一目的是在此描述的ＩＬ－６拮抗剂在治疗骨质疏松中的应用。

本发明的另一目的是在此描述的ＩＬ－６拮抗剂在治疗癌症，包括多发性骨髓瘤的首发及继发效应中的应用。

而本发明的中另一目的是在此描述的ＩＬ－６拮抗剂在治疗恶性病质中的应用。

本发明的另一目的是建立一种筛选体系，这种体系用于鉴定细胞因子CNTF家族成员的新的激动剂或拮抗剂。

本发明的另一目的是建立一种筛选体系，这种体系用于鉴定作为细胞因子CNTF家族成员的激动剂或拮抗剂的小分子。

这些和其他目的都通过使用CNTF家族受体组分以形成非功能性中间产物而实现，这些中间产物具有ＩＬ－６和CNTF拮抗剂治疗活性，以及在用于鉴定CNTF细胞因子家族成员的新激动剂和拮抗剂的试验体系的实用性。

## 附图简述

图１：遗传的细胞因子受体模型中受体组分的顺序结合。本模型指出：细胞因子最多含有３个受体结合位点，通过首先与任选的组分结合随之与β1结合，然后与$\beta_2$结合而与它们的受体组分相互作用。许多细胞因子受体的β组分通过近膜区（阴影方块）与Jak／Tyk家族的胞浆蛋白酪氨酸激酶相互作用。只有当β组分二聚体化时才起始信号转导。正如所示的β组分和Jak／Tyk激酶酪氨酸磷酸化。

图 2 ：CNTF抑制PC12细胞系（称为PC12D）中ＩＬ－６应答。PC12表达IL6Rα、gp130、CNTFRα，但不表达LIFRβ。将无血清培养的PC12D与在如图所示的加入或不加入CNTF的情况下加上ＩＬ－６（５０ｎｇ／ml）温育。如图所示一些板上也加入了可溶性IL6Rα（１mg／mL）或可溶性CNTFRα（１mg／mL）细胞溶胞物用抗－gp130抗体进行免疫沉淀，用抗磷酸酪氨酸抗体进行免疫印迹。gp130的酪氨酸磷酸化是ＩＬ－６诱导的ＩＬ－６受体系统激活的指征，这种激活在同加入CNTF时被封阻。

图 3 ：碘标记CNTF结合于PC12D细胞的Scatchard分析。在加入或不加入过量非放射活性竞争物的情况下，将PC12D细胞与不同浓度的碘标CNTF温育，从而确定特异性结合。图中出示了碘标CNTF特异性结合的量的Satchard曲线，并给出数据。数据与解离常数分别是9pM和3.4nM两个结合位点相一致。

## 发明详述

本发明基于为细胞因子例如CNTF细胞因子家族所共有的受体组分，提供了一类新的拮抗物。

这一项发明仔细考虑了针对使用了α特异性决定组分的任何细胞因子的拮抗物的产生，当该组分与细胞因子结合后，结合到第一个β信号转导组分而形成非功能性中间产物，然后结合到第二个β信号转导组分而引起β受体的二聚体化，紧接着进行信号转导，根据本发明，受体的可溶性α特异性决定组分和细胞因子受体（$\beta_1$）的第一β信号转导组分的胞外域结合而形成异二聚体，通过结合细胞因子而形成非功能性复合物，对细胞因子行使拮抗物的功能。

象例 1 所描述的那样，CNTF和ＩＬ－６共有β1受体组分gp130。CNTF与CNTFRα和gp130形成一个中间产物的事实可以在缺乏LIFRβ的

细胞系中得以证明。在这一细胞系中，CNTF和CNTFRα的复合物结合gp130，而阻碍了gp130通过ＩＬ－６和ＩＬ－６Rα的同二聚体化，因此阻断了信号转导。这些研究为ＩＬ－６拮抗物的发展提供了一个基础，正象他们所显示的那样，如果在一个配体存在的情况下，一个由配体它的α受体组分和$\beta_1$受体组分构成的非功能性的中间复合物能够形成的话，将很有效地阻止配体激活。其它的细胞因子可能使用其它的$\beta_1$受体组分，例如LIFRβ，根据本发明，也可被用来产生拮抗物。

例如在本发明的实施方案中，ＩＬ－６或CNTF的有效的拮抗物由其受体（ｓＩＬ－６Rα和ｓCNTFRα）的α特异性决定组分的胞外域与gp130的胞外域的异二聚体构成。这个如此生成的异二聚体在此分别称为ｓＩＬ－６Rα：$\beta_1$和ｓCNTFRα：$\beta_1$，各自作为ＩＬ－６和CNTF的高度亲和的陷阱，使细胞因子不能和其受体的天然的膜结合形式接近，形成信号转导复合物。

虽然来源受体胞外部分的可溶配体结合域已被证明对配体在某些程度上有效地作为陷阱来行使拮抗物的功能［Bargetzi, et al., Cancer Res. 53：4010－4013 (1993)；et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89：8616－8620 (1992)；Mohler, et al., J. Innunol. 151：1548－1561 (1993)；Narazaki, et al., Blood 82：1120－1126 (1993)］，但ＩＬ－６和CNTF受体是不一般的，因为α受体组分组成了配体结合域，和它们的配体联合共同以可溶性形式有效地行使受体拮抗物的功能［Davis, et al. Science 259：1736－1739 (1993)；Taga, et al., Cell 58：573－581 (1989)］。根据本发明ｓRα：$\beta_1$异二聚体为配体提供了有效的陷阱，以微微克分子的范围的亲和力结合配体（根据CNTF和PC12D细胞

的结合研究），而不产生功能性的中间复合物。

这一α和β受体胞外域可根据本领域技术人员所公知的方法而制备出来。CNTFRα受体已经被克隆，测序和表达出来［Davis, et al. (1991) Science 253 : 59 - 63所有文献在此引入作为参考］。LIFRβ和gp130克隆已经在（Gearing et al. in EMBO J. 10 : 2839 - 2848 (1991), Hibi, et al. Cell 63 : 1149 - 1157 (1990) and in published PCT application WO 93／10151 published May 27, 1993，所有文献在此全文引入作为参考）有所记载。

对实施本发明有用的受体分子可以通过被克隆并在原核或真核表达系统中表达而制备。重组的受体基因可利用任一方法被表达和纯化出来。编码因子的基因可以被亚克隆到细菌表达载体，例如PCP110，但并不限于此。

重组因子可以任何能够随后形成稳定的生物学活性蛋白的技术被纯化出来。例如但不限于，因子可以作为可溶蛋白或作为包涵体而从细胞中回收，其中后者可通过8 M盐酸胍和渗析的方法定量地分离。为了进一步纯化因子，可采用传统的离子交换层析，疏水反应层析，反相层析或凝胶过滤。

sRα：β异二聚体受体可以使用所知的融合域来构建，如描述了β受体异二聚体的产生的于1993年5月27日公开的PCT申请WO 93／10151“Oncostatin M和白血病抑制因子的受体”所描述的那样，或通过化学方法将胞外域交叉联接而制备。这一所利用的域可以由完整的α、β组分的胞外域构成，或其是保持和其配体或其它sRα：$\beta_1$复合物中的组分形成复合物的能力的突变体或片段。

在本发明的一个实施方案中，使用亮氨酸拉链来构建胞外域，人

的转录因子c－jun和c－fos的亮氨酸拉链域已被表明可以1：1的化学计量学比例形成稳定的异二聚体结构[Busch and Sassone－Corsi, Trends Genetics 6：36－40 (1990)；Gentz, et al., Science 243：1695－1699 (1989)]。虽然jun－jun同二聚体也可以形成，但与jun－fos异二聚体比较起来，稳定性只及后者的1／1000，fos－fos同二聚体没有被检测到。

通过遗传工程嵌合基因，在读码框内将c－jun或c－fos亮氨酸拉链域融合在以上所提到的受体组分的可溶性或胞外域的c端。这种结合可以是直接的，或通过一个柔性连接物域，例如人IgG的绞链区，或由小氨基酸例如甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸或丙氨酸以不同长度和组合方式构成的多肽连接物。另外,这一嵌合蛋白可以由His－His－His－His－His－His（His6），SEQ ID NO. 1]标记，使之能够通过金属螯合层析迅速纯化，和／或可能得到抗体的抗原决定簇进行标记，使之进行蛋白印迹、免疫沉淀或活性缺失／封阻的生物分析进行探测。

在另一实施方案中，sRα：$\beta_1$异二聚体可以使用相同的方法来构建，只是使用人$IgG_1$的Fc域[Aruffo, et al., Cell 67：35－44 (1991)]。和后者不同，异二聚体的形成必须通过生物化学的方法来获得，因为载有Fc－域的嵌合分子将作为二硫键连接的同二聚体表达。因此在这种倾向间二硫键断裂而对内二硫键无影响的条件下，同二聚体被减少。然后将含有不同胞外部分的单体以等克分子量混合，氧化形成同或异二聚体的混合物。混合物组分通过层析分开。或者，通过遗传工程和表达分子的途径使这类异二聚体更倾向于形成，表达分子包含受体组分的可溶性或胞外部分，人IgG的Fc域，c－jun或c－fos亮氨酸拉链域[Kostelny, et al., J. Immunol. 148

：1547 - 1553 (1992)]。由于这些亮氨酸拉链易形成异二聚体，他们可以用来驱动所需异二聚体的形成，对于以上描述的使用亮氨酸拉链的嵌合蛋白，也可以用金属螯合物成抗原决定簇来标记。标记的域可以通过金属螯合层析进行快速纯化，和／或通过抗体进行蛋白印迹、免疫沉淀或进行活性缺损／封阻的生物分析进行探测。

在本发明另一实施方案中，sRα：$\beta_1$ 异二聚体通过作为利用柔性连接物环嵌合分子表达而得以制备。一个编码此嵌合蛋白的DNA构建物被如此设计：使得它所表达的2个可溶性或胞外域蛋白通过一个柔性环串联（头碰头）融合。这个环可以是完全人工的，（例：多聚甘氨酸重复序列被丝氨酸或苏氨酸以特定间隔打断）或从自然出现的蛋白借用（例如hIgG的绞链区）。工程化分子中，可溶性或胞外域的融合顺序可以改变（例如，sIL6Rα／loop／gp130或sgp130／loop／sIL－6Rα），和／或环的长度和组成是变化的，以利于所需特征的分子的选择。

或者，根据本发明，异二聚体可以从合适的α、β组分共转染的细胞系中纯化出来，异二聚体可以本领域技术人员所熟知方法从同二聚体中分离出来，例如限量的异二聚体可通过从制备型非变性的聚丙烯酰胺胶上被动洗脱分出来而得以回收。或者异二聚体也可使用高压阳离子交换层析被纯化，通过Mono S阳离子交换柱获得很好的纯化效果。

除了sRα：$\beta_1$ 异二聚体通过结合游离的CNTF或IL－6作为拮抗剂外，本发明考虑使用工程的突变的IL－6变体，它具有一些新特性：它可以结合到IL－6Rα和一个单一的gp130分子，但不能结合第二个gp130完成β组分的同二聚体化。因此可以作为任一IL－6应答细胞的IL－6拮抗物。IL－6和CNTF受体复合物结构模

型表明这些细胞因子对α、$\beta_1$和$\beta_2$受体组分有不同的结合位点[Sathl and Yancopoulos, Cell 74：587－590 (1993)]，包含这些位点的每一个位点上的关键的氨基酸残基的突变产生了新的分子，它们具有所需的拮抗性质。$\beta_1$位点的切除将产生出一个分子，它仍可与α受体组分结合，但不与$\beta_1$组分结合，这样可以形成纳克分子亲和力的拮抗物，包括IL－6的$\beta_2$位点（IL－6β2）的关键氨基酸残基的突变将形成一类分子，它将结合到IL－6Rα和第一个gp130单体上，但不能结合第二个gp130，因此功能性失活。同样，CNTF$\beta_2$位点的突变将形成一分子（CNTF$\beta_2$－），它将结合CNTFRα和gp130，但不能结合ILFRβ，因此通过形成非功能性的$\beta_1$中间产物而拮抗CNTF作用，根据以上CNTF形成具有高度亲和力的$\beta_1$中间体的结合的结果，CNTF$\beta_2$－和IL－6$\beta_2$－将构成亲和力在10pM范围内的拮抗物。

很多方法可用来产生和鉴定具有所需要的特性的IL－6或CNTF的突变株。使用常规方法对编码IL－6或CNTF的DNA进行随机突变，然后收集产物进行分析来鉴定具有如下描述的期望的新特性的突变细胞因子：广泛地使用遗传工程方法进行突变以便阐明重组蛋白功能域的结构组成，几种不同的对于删除或替代突变的探索已经在某些文献中描述过，最成功的方法是使用丙氨酸扫描突变[Cunningham and Wells (1989), Science 244：1081－1085]和同聚物扫描突变[Cunningham et al., (1989), Science 243：1330－1336]。

用此方法进行IL－6或CNTF核酸序列靶突变以产生CNTF$\beta_2$或IL－6$\beta_2$－待选物，适于靶突变位点的区域的选择系统地完成，或者是这样一项研究，借助于抗各因子的单克隆抗体对细胞因子区域作出图谱，该区域在细胞因子与α受体成分单独结合或与α$\beta_1$异二

聚体可溶性受体结合时是暴露的。同样的，对单独或以上述结合α受体组分或αβ$_1$异二聚体的可溶受体的复合物形式存在的细胞因子，进行化学修饰或有限蛋白酶水解，然后对所保护或暴露区域的分析可以揭示潜在的β$_2$结合位点。

对于鉴定具有所期望活性的CNTF或IL－6突变株的分析涉及在合适的应答细胞系中高亲和力地封阻IL－6或CNTF反应的能力[Davis, et al. Science 259：1736－1739 (1993)；Murakami et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88：11349－11353 (1991)]，这样的分析包括CNTF或IL－6所驱使的细胞增殖，存活或DNA合成，或细胞系的构建，此细胞系中因子的结合诱导了报导蛋白的产生，例如CAT或β－半乳糖苷酶[Savino, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90：4067－4071 (1993)]。

此外，不同突变体的性质可以通过基于受体的分析方法进行评价。一个这样的方法包括使用抗原决定簇标记的sRα：β$_1$试剂对上述突变体就其对上述sRα：β$_2$受体异二聚体结合的能力进行筛选[Davis et al., Science 253：59－63 (1991)]。通过一个抗原决定簇标记的可溶性β$_2$试剂是否在α：β$_1$异二聚体存在时与细胞因子结合，来探知β$_2$位点的存在或缺失。例如，在CNTFRα和gp130[Davis, et al. Science 260：1805－1808 (1993)；Stahl, et al. J. Biol. Chem. 268：7628－7631 (1993)]存在时，CNTF只结合于ILFRβ（β$_2$组分）上。因此，在可溶性sRα：β$_1$二聚体CNTFRα：β$_1$存在时，一种可溶性ILFRβ试剂仅与CNTF结合。对于IL－6，sRα：β$_1$试剂为IL－6Rα：β$_1$，.β$_2$位点的探针是抗原决定基标记的sgp130。因此，CNTFβ$_2$－突变体应被确认为与sRα：β$_1$试剂结合的那些分子，这表明虽然细胞因

子的α和$\beta_1$位点是完整的，然而它却不能结合$\beta_2$试剂。

此外，本发明还提供一种通过测量β－受体组分或信号转导组分的磷酸化来探查或测量潜在的$\beta_2$－突变体活性的方法，这些组分选自Jak1、Jak2和Tyk2或任一其它信号转导组分，例如CLIPs。已确定这些组分响应于细胞因子CNTF家族的某个成员，而被磷酸化。

表达在此描述的信号转导组分的细胞，可以是天然的或基因工程促使其表达。例如，用Veiazquez等［Cell, Vol. 70 : 313 - 322 (1992)］描述的Jak1和Tyk－2编码核酸序列，然后可通过转导、转染、微注射、电穿孔、动物转基因等任何已知的方法导入细胞。

根据本发明，将细胞经潜在拮抗物处理，将β－组分或信号转导组分的酪氨酸磷酸化过程与同一组分在无拮抗物条件下的酪氨酸磷酸化相比较。

本发明还进行了用潜在拮抗物接触上述细胞导致的酪氨酸磷酸化与同一细胞经母系CNTF家族成员处理的酪氨酸磷酸化的比较。依据这种分析，细胞必须是要么表达细胞外受体（α－组分），要么在可溶性受体组分存在时经试验试剂处理。这样，在一个设计用来鉴定CNTF激动剂或拮抗剂的试验体系中，细胞可以表达CNTFRα的α－组分、gp130β－组分与LIFRβ，以及某个信号转导组分，如Jak1。把该细胞经试剂处理，把β－组分或信号转导组分的酪氨酸磷酸化与CNTF存在时产生的磷酸化方式进行比较。或者，比较加入试剂处理后的酪氨酸磷酸化与无试剂情况。又如对于一个试验体系，如ＩＬ－６的试验体系，该体系牵涉到将细胞同与可溶性ＩＬ－６受体连接的试剂接触，该细胞表达gp130β－组分和诸如Jak1、Jak2或Tyk2的信号转导组分。

在本发明的另一实施方案中，用以上途径建立了一种筛选方法，用以筛选在配体结合、受体复合物形成及接下来的信号转导过程的各

步中起作用的小分子拮抗剂。通过评估对可溶性受体与配体之间如上文所述的复合物形成的介入潜在介入配体－受体相互作用的分子而筛选。或者，为鉴定潜在拮抗剂，在ＩＬ－６或CNTF诱发报告基因响应的基于细胞的试验中，对小分子或天然产物库筛选。那些显示拮抗活性的分子在响应其他因子（如GMCSF或类似神经营养因子－３能激活受体酪氨酸激酶的因子）的基于细胞的试验中再筛选以评价对CNTF／ＩＬ－６／OSM／LIF因子家族的特异性。这些基于细胞的筛选用于鉴定抑制信号转导过程中的靶点之任一的拮抗剂。

在一个这样的试验体系中，拮抗剂的特异性靶点是激酶的Jak／Tyk家族[Firmbach - Kraft, Oncogene 5 : 1329 - 1336 (1990); Wilks, et al., Mol. Cell. Biol. 11 : 2057 - 2065 (1991)]与受体β亚基的相互作用。如上所述，LIFRβ和gp130与胞质蛋白酪氨酸激酶的Jak／Tyk家族成员预结合，后者响应配体－诱导的β组分的二聚体化而被激活[Stahl, et al. Science (1993年已投稿)]。因此，能进入胞质破坏β组分与Jak／Ty激酶相互作用的小分子可以潜在地封阻所有后序的细胞外信号。此种活性可以通过一体外方案筛选，该方案可评价小分子封阻纯化的β－组分和Jak／Tyk激酶相关结合域之间相互作用的能力。可替代的方法：可用二杂交相互作用体系[Chien, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88 : 9578 - 9582 (1992) ]较容易地筛选在基于酵母的试验中能抑制结合于Jak／Tyk激酶的β组分的分子。在这一体系中，两种蛋白（β组分和Jak／Tyk激酶或此例中相关域）的相互作用诱导一种如β－半乳糖苷酶的方便标记物的生成。试验小分子收集物的破坏所要求的相互作用而不抑制两种对照蛋白的相互的作用能力。这种筛选方法的优点在于这样一种要求：试验化合物在抑制β组分和Jak／Tyk激酶相互作用之前进入细

胞。

这里描述的CNTF家族拮抗剂或者结合于胞质的CNTF和ＩＬ－６，或者与二者相竞争。因此，它们被用于治疗由CNTF或ＩＬ－６介导的疾病或紊乱。例如，ＩＬ－６拮抗剂具有如下的治疗作用：

１）骨质疏松会由于绝经后妇女雌激素水平的降低或卵巢切除而恶化。ＩＬ－６似乎是成骨细胞生成的关键介质，它引起骨吸收[Horowitz, Science 260：626－627 (1993)；Jilka, et al., Science 257：88－91 (1992)]。重要的是，ＩＬ－６似乎仅在雌性激素枯竭状态下起主要作用，却极少参与正常的骨维持。实验证据与此相符：说明了ＩＬ－６的功能封阻抗体能减少成骨细胞的数量。虽然雌性激素替代疗法也被适用，但这种方法似乎带来了一些副作用，如增加患子宫内膜癌和乳腺癌的危险。因此，这里介绍的ＩＬ－６拮抗剂能更加特异地降低成骨细胞生成到正常水平。

２）ＩＬ－６似乎直接参与形成多发性骨髓瘤，通过从自分泌或旁分泌的方式作用促进肿瘤形成[Van Oers, et al., Ann Hematol. 66：219－223 (1993)]。升高的ＩＬ－６水平还造成不期望的继发效应，如骨吸收、高血钙症和恶病质；为数有限的研究表明，ＩＬ－６或ＩＬ－６Rα的功能封阻抗体对此有一定疗效[Klein, et al., Blood 78：1198－1204 (1991)；Suzuki, et al., Eur. J. Immunol. 22：1989－1993 (1992)]。因此，这里介绍的ＩＬ－６拮抗剂将有利于对继发效应和肿瘤生长的抑制。

３）ＩＬ－６可能是导致与艾滋病和癌症有关的恶病质的肿瘤坏死因子（TNF）的媒介[Strassmann, et al., J. Clin. Invest. 89：1681－1684 (1992)]，其作用可能在于降低脂肪组织中脂蛋白脂酶的活性[Greenberg, et al., Cancer Research 52：4113

- 4116 (1992)]。据此，这里介绍的拮抗剂将对减轻或减少这类病人的恶病质有所裨益。

治疗这类或其它与CNTF家族有关的疾病或紊乱的有效剂量可以用专业人员所知的方法[参照：Fingl等，The Pharmacological Basis of Therapeutics，Goodman and Gilman，eds，Macmillan Publlshing Co.，New York，pp. 1 - 46 (1975)]来确定。根据本发明实用的药物组合物包括：将上述的拮抗剂溶解于一种药用的液态、固态或半固态载体中，然后与某种载体或靶分子（如抗体、荷尔蒙、生长因子等）连接，和/或在体内给药之前装入脂质体、微胶囊、缓释制剂（含拮抗物表达细胞）。例如，药物组合物可以包含一种或多种溶于水溶液，如灭菌水、盐水、磷酸缓冲液或葡萄糖溶液的拮抗剂。也可以将活性试剂包含于一个固态（如蜡）或半固态（如明胶）中，植入需要治疗的病人体内。给药途径可以是已知的任何方式，包括但不限于静脉、鞘内、皮下、注射入相关组织、动脉内、鼻内、口服或借助于植入装置等。

给药后将引起本发明的活性试剂在全身或局部区域的分配。例如，在某些涉及神经系统远程区域，应采用静脉或鞘内注射。在一些情况下，可将包含活性试剂的植入物直接植入损伤区或邻近区域。合适的植入物包括但不局限于gelfoam蜡或微粒型植入物等。

实例一．CNTF与ＩＬ－６竞争结合gp130

材料与方法

材料：响应ＩＬ－６（PC12D）的PC12细胞克隆购自DNAX。大鼠CNTF参照Masiakowskl et al.,J. Neurochem. 57 : 1003 - 10012 (1991) 自行制备。ＩＬ－６和sIL－６R购自Ｒ & Ｄ系统。抗血清在兔体内制备，能抗从gp130 Ｃ－末端附近区域衍生的肽[序列：

CGTEGQVERFETVGME(SEQ ID NO. 2)]，方法参照[Stahl, et al., J. Biol. Chem. 268 : 7628 - 7631 (1993)]。抗磷酸酪氨酸的单克隆抗体4G10购自UBI，ECI试剂购自Amersham。

信号转导测定：

PC12D板（10cm）在无血清培养基中（RPMI 1640+谷氨酰胺）饥饿1小时，然后分别在有或无大鼠CNTF情况下与IL-6（50ng/ml）和sIL-6R（1μg/ml）温浴，浓度为指示浓度、时间5分钟，温度37℃。然后将样品与抗gp130抗体免疫沉淀，SDS PAGE电泳和抗-磷酸酪氨酸免疫印迹[方法参照Stahl, et al., J. Biol. Chem. 268 : 7628 - 7631 (1993)]。

结果

CNTF封阻IL-6应答的能力可用PC12细胞系（被称作PC12D）测量，该细胞系表达IL-6Rα、gp130和CNTFRα，但不表达LIFRβ。正如预测，这些细胞响应IL-6，但不响应CNTF（如图2），因为LIFRβ是CNTF信号转导的必需组分[Davis, et al., Science 260 : 59 - 63 (1993)]。与其它细胞系[Ip, et al., Cell 69 : 1121 - 1132 (1992)]一致，PC12D细胞系响应2nM IL-6而使gp130（和各种称作CLIPs的其它蛋白）酪氨酸磷酸化。加入可溶性重组体IL-6Rα可提高gp130酪氨酸磷酸化水平，这一点已在其它体系中有所报道[Taga, et al., Cell 58 : 573 - 581 (1989)]。然而，加入IL-6的同时加入2nM CNTF，则严重减少gp130酪氨酸磷酸化。虽然在CNTF、IL-6和sIL-6Rα存在时仍保留轻度的gp130酪氨酸磷酸化反应，但在将CNTF浓度提高3倍而到8nM时，此反应完全消除。因此，在含有CNTFRα而不含LIFRβ的IL-6响应细胞中，CNTF更象IL-6的潜在拮抗剂。

实例二．CNTF结合于CNTFRα：β

材料与方法

CNTF结合的Scatchard分析：$^{125}$I－CNTF的制备与纯化方法参照Stahl et al., JBC 268：7628－7631 (1993)。饱合结合研究在PC12细胞中进行，所用$^{125}$I－CNTF浓度范围从20pM到10nM。结合直接在细胞单层上进行。将培养基从孔中取出，将细胞采用试验缓冲液冲洗一次，此缓冲液含有磷酸缓冲盐溶液（PBS，pH7.4）、0.1mM杆菌肽，1mM PMSF、1 μg／ml Leupeptin 和1 mg／ml BSA。细胞在$^{125}$I－CNTF中室温培养2小时，然后用试验缓冲液快速冲洗两次。用含1％SDS的PBS缓冲液使细胞溶胞，再用Packard Gamma计数器计数，效率为90～95％。在未标记的CNTF过量100倍时测定非特异性结合。特异性结合范围从70％到95％。

结果

CNTF结合CNTFRα：β$_1$的平衡常数由结合PC12D细胞上的碘化CNTF的Scatchard分析得到（如图3）。此数据与具解离常数9pM和3.4nm的两位点配合（2 site fit）相一致。低亲和力位点对应于CNTF与CNTFRα的相互作用，Kd≈3 nM［Panaytotatos, et al., J. Biol. Chem. 268：19000－19003 (1993)］。我们将高亲合力复合物解释为含CNTF、CNTFRα和gp130的中间产物。Ewing肉瘤细胞系（EW－1）确实含有CNTFRα、gp130和LIFRβ，因此响应CNTF而使强大的酪氨酸磷酸化，具有解离常数1 nM和10pM［Wong, et al., 未发表数据］，显示了极相似的两位点配合。因此，可以明显看出CNTF以与其结合CNTFRα、gp130及LIFRβ复合物的同样的高亲合力结合仅含有CNTFRα与gp130复合物，这说明了形成sRα：β拮抗剂的可行性。

# 序列表

（1）一般信息：

（i）申请人：Regeneron Pharmaceuticals, INC

（ii）发明题目：CNTF家族拮抗物

（iii）序列数： 2

（iv）通讯地址：

（A）收件人：Regeneron Pharmaceuticals, INC

（B）街道： 777 Old Saw Mill River Road

（C）市名： Tarrytown

（D）州名： New York

（E）国家： U.S.A

（F）邮编： 10591

（v）计算机可读形式：

（A）介质类型：软盘

（B）计算机：IBM PC 兼容机

（C）操作系统：PC - DOS／MS - DOS

（D）软件：PatentIn Release #1.0, Version #1.25

（vi）现行申请数据：

（A）申请号：

（B）提交日期：

（C）分类：

（viii）律师事务所信息：

（A）名字：Kempler Ph. D., Gail M.

（B）注册号码：32, 143

（C）查询／摘要号：REG 200

（ix）电信信息：

（G）电话： 914 - 345 - 7400

（H）电传： 914 - 345 - 7721

（2）SEQ ID NO：1信息：

（i）序列特征：

（A）长度：6个氨基酸

（B）类型：氨基酸

（C）链型：未知

（D）拓扑学：未知

（ii）分子类型：肽

（xi）SEQ ID NO：1 序列描述：

His His His His His His

1 5

（2）SEQ ID NO：2信息：

（i）序列特征：

（A）长度：16个氨基酸

（B）类型：氨基酸

（C）链型：未知

（D）拓扑学：未知

（ii）分子类型：肽

（xi）SEQ ID NO：2 序列描述：

Cys Gly Thr Glu Gly Gln Val Glu Arg

1 5 10

Phe Glu Thr Val Gly Met Glu

15

# 说 明 书 附 图

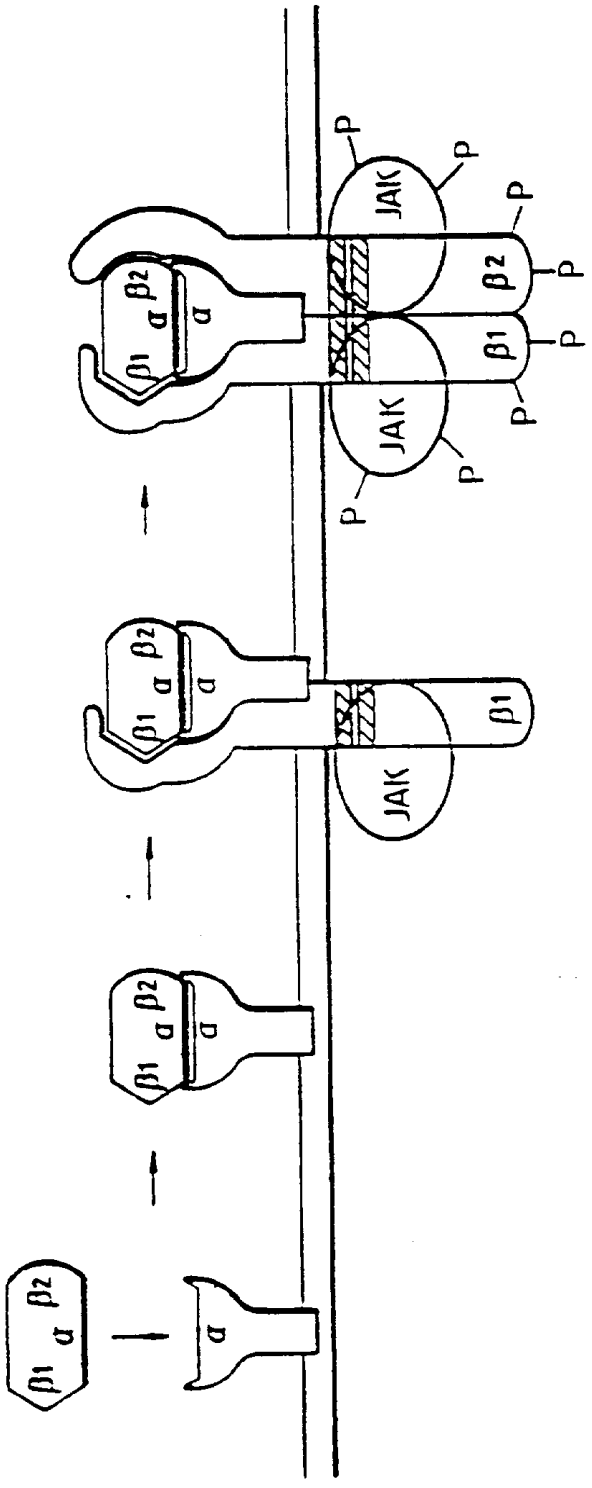



图 1

图 2

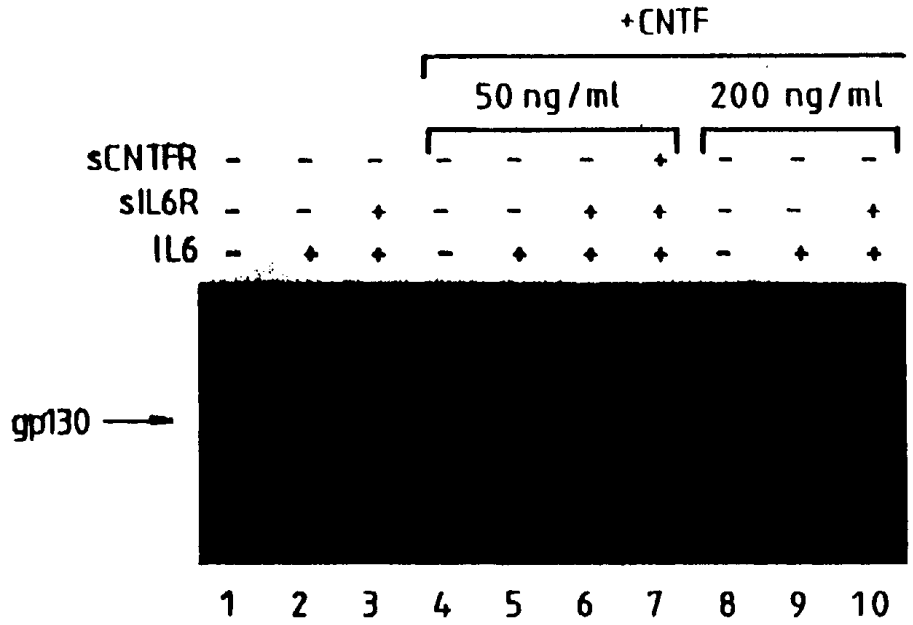
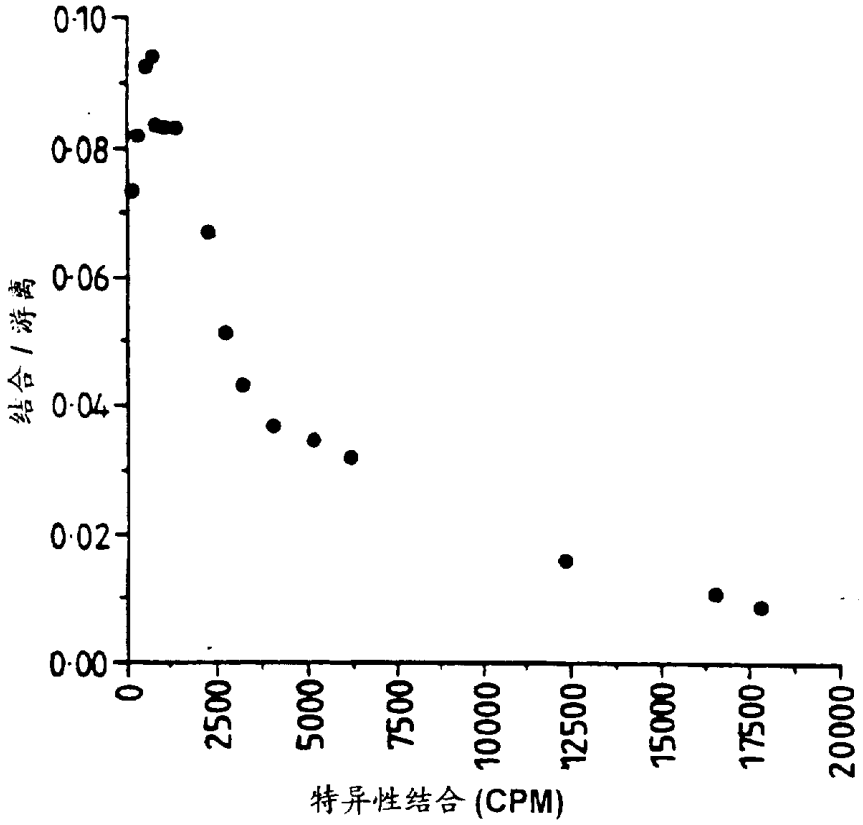


图3


0·10
0·08
0·06
0·04
0·02
0·00
结合 / 游离
0
2500
5000
7500
10000
12500
15000
17500
20000
特异性结合 (CPM)