



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 95191457.X

[43]公开日 1997年1月8日

[11] 公开号 CN 1139933A

[22]申请日 95.12.5

[30]优先权

[32]94.12.6 [33]IT[31]RM94A000794

[86]国际申请 PCT/IT95/00208 95.12.5

[87]国际公布 WO96/17869 英 96.6.13

[85]进入国家阶段日期 96.8.2

[71]申请人 布·安格莱荻公司分子生物学研究所

地址 意大利罗马

[72]发明人 G·希利博托

C·托怪亚邀

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标
事务所

代理人 杜京英

权利要求书 1 页 说明书 11 页 附图页数 5 页

[54]发明名称 由在GP130结合介面突变的白细胞介素-6(IL-6)受体 α 的可溶形式组成的 IL-6 拮抗剂

[57]摘要

本发明涉及白细胞介素-6拮抗剂,该拮抗剂的特征在于它由人 IL-6 受体 α 的可溶形式(shIL-6R α)组成,所述 shIL-6R α 包含在 gp130 结合界面上的一个或多个突变。在优选的实施方案中,所述突变存在于选自 Ala228、Asn230、His280 和 Asp281 的位置上。这些拮抗剂可以用作能预防和治疗由异常 IL-6 活性引起的疾病的药物。图 4 显示与野生型 shIL-6R α 的激动性质比较突变体 Ala228Asp/Asn230Asp/His280Ser/Asp281Val 的拮抗活性。该拮抗剂可以用于制备预防、控制和治疗由异常 IL-6 生物活性引起的疾病的药物。

权 利 要 求 书

1. 白细胞介素—6(IL—6)拮抗剂,其特征在于,它由 IL—6 α 受体可溶形式(sIL—6R α)组成,所述 sIL—6R α 包含在与 gp130 结合的界面上的一个或多个突变。

2. 按照权利要求 1 的白细胞介素—6 拮抗剂,其中 sIL—6R α 包含在选自 Ala228、Asn230、His280 和 Asp281 位置上的至少一个突变。

3. 按照权利要求 1 或 2 的白细胞介素—6 拮抗剂,其中 sIL—6R α 包含突变 Asn230 Asp(SEQ ID NO:1)。

4. 按照权利要求 1 或 2 的白细胞介素—6 拮抗剂,其中 sIL—6R α 包含突变 Ala228Asp/Asn 230 Asp(SEQ ID NO:2)。

5. 按照权利要求 1 或 2 的白细胞介素—6 拮抗剂,其中 sIL—6R α 包含突变 His 280 Ser/Asp 281 Val(SEQ ID NO:3)。

6. 按照权利要求 1 或 2 的白细胞介素—6 拮抗剂,其中 sIL—6R α 包含突变 Ala 228 Asp/Asn 230 Asp/His 280 Ser/Asp 281 Val (SEQ ID NO:4)。

7. 按照权利要求 1—6 的白细胞介素—6 拮抗剂在研究和制备能够控制、预防和治疗由异常 IL—6 活性引起的疾病的药物中的用途。

8. 以上描述、说明的和要求的作为 IL—6 拮抗剂起作用的可溶性受体及其用途。

说明书

由在 GP130 结合介面突变的白细胞介素—6(IL—6)受体 α 的可溶形式组成的 IL—6 拮抗剂

本发明涉及免疫学领域。更具体地说,本发明的主题是白细胞介素—6受体 α 的可溶形式的突变体,这种突变体负向影响单体受体复合物 IL—6/sIL—6R α 和 gp130 之间的二聚体受体复合物的形成。本发明的另一个主题是这些突变物作为白细胞介素—6 的拮抗剂在控制、预防及治疗由异常 IL—6 活性引起的疾病上的用途。

本发明内容中的“白细胞介素 6”或“IL—6”指 IL—6 和其保持野生型 IL—6 生物特征的片段、缺失体、插入体、取代体、突变体及修饰体。除非有特别说明,该术语是指人 IL—6。

IL—6 作用于不同的靶细胞引起一系列生物学反应。然而,生理产生的 IL—6 调控 B 细胞的增殖和成熟、T 细胞的激活及炎症反应情况下肝脏中急相蛋白的产生。该细胞因子的失调生产在许多炎症、自体免疫和癌形成疾病的病理中起关键作用。

如现有技术中所知,人们进行了大量尝试来寻找 IL—6 生物活性抑制剂,一方面想弄清在单一疾病发生中这一细胞因子的作用,另一方面也寻求治疗疾病的药物。

已经知道成熟的人 IL—6 蛋白(hIL—6)是一个 185 个氨基酸组成的多肽,其中包括两个二硫键(Cys45—Cys51, Cys74—Cys84)。IL—6 通过两个结合位点(称为位点 I 和位点 II)和靶细胞表面的至少两种特异受体(IL—R α 和 gp130)相互作用形成一个三聚体复合物 IL—6(受体)₂ 起作用。这一复合物按以下顺序形成:第一个受体(IL—6R α)以低亲合力结合到 IL—6 的位点 I 上(不传递信号);然后第二受体(gp130)以高亲合力与 IL—6 位点 II 结合后转导信号。

基于上述机制,已设计了人 IL—6 突变体,该突变体可通过位点 I 与第一受体结合,但不能二聚化第二受体,因为突变在空间上抑制

第二受体结合到点 II 上。这种类型的突变体已经在 WO 94/09138 (Cetus Oncology Corporation) 及 WO 94/011402 和 PCT/IT 94/00095 (Istituto di Ricerche di Biologia Molecolare p. Angeletti S. P. A.) 中有描述。

现在已惊奇地发现在 gp130 的界面区含有一个或多个突变的 IL-6 受体 α 的可溶形式是 IL-6 的拮抗剂, 这一发现形成了本发明的基础。

在一个实施方案中, sIL-6R α 包含至少一个在选自 Ala228、Asn230、His280 和 Asp281 位置上的突变。所述的突变可以是选自例如 Asn230Asp (SEQ ID NO:1); Ala 228 Asp/Asn230Asp (SEQ ID NO:2), His 280Ser/Asp281 Val (SEQ ID NO:3) 的突变。

在一个优选的实施方案中, sIL-6R α 含有在位置 Ala228、Asn230、His280 和 Asp281 上的多突变。给出好的效果的多突变是 Ala228 Asp/Asn230 Asp/His280 Ser/Asp281 Val (SEQ ID NO:4)。

本发明的由 IL-6 α 受体的可溶形式构成的、在与 gp130 结合的界面上发生突变的 IL-6 拮抗剂, 可以以治疗和预防与异常 IL-6 活性有关的疾病有效的浓度被施用。为此目的, 按照本发明的拮抗剂最好经静脉或皮下注射施用, 本领域技术人员对这些施用方法是熟知的。

到此为止, 已给出了本发明的一般性描述。以下将借助下列实施例对其进行更详细的描述, 以便更清楚地了解本发明的目的、特征、优点和其操作方法。

图 1A 表示本发明的突变体与 ^{35}S 标记 sgp130 (gp130 可溶形式) 的体外免疫共沉淀在 SDS/PAGE (12%) 上的分离。图 1B 显示了在对应于迁移 ^{125}I -IL-6 的凝胶上的位置。

图 2 以矩形图的形式表示了野生型 sIL-6R α 受体和突变型 sIL-6R α 受体在 A375 细胞膜上与 gp130 作用的不同能力。

图 3 表示用 ^{35}S 标记的 sgp130 与 2.0 μg 野生型受体或与 2.0 μg 突变型受体 (SEQ ID NO:4) 的体外免疫共沉淀在 SDS/PAGE 凝胶 (12%) 上的分离。

图 4 表示了与野生型 shIL—6R α 的激动性质比较, 突变体 (SEQ ID NO:4) 在 HepG2 细胞上的拮抗活性。

图 5 表示了由 APRF 和 DNA 结合位点 (SIE, Serum Inducible Element) 形成的复合物在凝胶上的分离。(突变 SEQ ID NO:4 不抑制 OM 依赖性 APRF 在 HepG2 细胞上的激活)。

本发明的 IL—6 拮抗剂可通过合成或重组技术产生。在后一种情况下, 编码 sIL—6—R α 的 cDNA 可整合到质粒中去, 然后在原核或真核细胞中表达。一般来说, 细菌是较好的原核微生物。

此外, 编码本发明的 sIL—6R α 突变体的 cDNA 亦可被引入到哺乳动物细胞中, 这些哺乳动物细胞可以选自 CHO, COS, C127, HepG2, SK Hep。而且, 这些蛋白亦可用公知的重组杆状病毒技术 (AcNPV 菌株) 在昆虫细胞 (Sf9 或 HighFive) 中表达。

实施例 1

sIL—6R α 突变体的制备

sIL—6R α cDNA 作为 5' EcoRI—3' XbaI 片段可用完整的 IL—6R α cDNA 作为模板经 PCR 扩增得到 (Sporeno E., Paonessa G., Salvati A. L., Graziani R., Delmastro P., Ciliberto G. and Toniatti C. (1994) J. Biol. Chem. 269, 10991—10995)。设计 3' 引物以便在位于 6 个组氨酸编码序列之后的 324 氨基酸位点引入一个人工 TAG 终止密码子。进行这一工作以保证 sIL—6R α 和我们产生的突变体在分子的羧基端具有一个 6 个组氨酸的尾部, 它在以后使用金属亲和层析进行所述分子的提纯中是有用的。然后, 产生的片段可被导入到 COS—7 细胞表达载体 pcDNA1 (Invitrogen) 中, 并整体测序, 由此得到 pC6FRH 质粒。

再用 pC6FRH 质粒作为模板进行现有技术中描述的两步法 PCR 扩增 (Landt O., Grunert H. P. and Hahn U. (1990) Gene 96, 125—128) 来构建下列四种突变体: Asn230Asp (SEQ ID NO:1); Asn 230 Asp/Ala228 Asp (SEQ ID NO:2); His 280 Ser/Asp 281 Val (SEQ ID NO:3) 和 Ala228 Asp/Asn 230 Asp/His 280 Ser/Asp 281Val (SEQ ID NO:4)。

然后在 COS—7 细胞中表达所述突变体,将 COS—7 细胞在 5% CO₂ 下保持在补加有 10% FCS 及谷氨酸和抗生素的 DME 培养基 (Dulbecco's modified Eagle's medium) 中。为了表达蛋白,将 2.5×10^6 个 COS—7 细胞接种到 100—mm 组织培养皿中,第二天用 2 μ g 不同的 shIL—6R α 表达载体进行转染。这一过程采用 DEAE—葡聚糖技术 (在 Seed B., Aruffo A. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84, 3365—3369 中描述)。转染 16 小时后,把细胞分割并重新接种于 100—mm 培养皿中并于 37 $^{\circ}$ C 下在完整培养基中培养。72—96 小时后收集培养基,离心并用于进行共免疫沉淀和结合分析。为了监测每个突变体的表达水平,重新接种 2.5×10^5 个转染 COS—7 细胞于 35—mm 培养皿中,转染 48 小时后,用 [³⁵S] 甲硫氨酸代谢标记 4 小时。离心获得的上清液用抗人 IL—6R α 的单克隆抗体 I6R1/9.G11 免疫沉淀,然后用含 SDS 的聚丙烯酰胺凝胶电泳对免疫沉淀物进行分析。

突变体的 IL—6 结合分析

为了检测包含在 COS 细胞条件培养基中的 sIL—6R α 对 IL—6 的亲和力,使用我们产生的蛋白质中的 6 个组氨酸尾端。

取适量的转染 COS 细胞上清液 (事先用滴定实验测定,并在其中加入咪唑至终浓度 5mM),与 20—40pM 的 ¹²⁵I—IL—6 和增加的浓度的未标记的细胞因子混合。在平衡状态下,加入 40 μ l Ni²⁺—NTA—琼脂糖 (一种能选择性结合包含组氨酸尾端之蛋白的树脂),温育额外的 1 小时。被受体结合因而不直接与树脂结合的配体,经离心通过 PBS 中 30% 蔗糖垫层与游离配体 (上清液) 分离。所有的步骤均在 4 $^{\circ}$ C 进行。由游离和结合 cpm (每分钟放射活性计数) 值,可给出竞争替代曲线。所得结果经 Scatchard 转化后确定各种可溶性 IL—6 受体的表现 Kd 值 (参见 Sporeno, Paonessa, Salviati, Graziani, Delmastro, Ciliberto and Toniatti (1994), J. Biol. Chem. 269, 10991—10995)。用 UltraFit 软件 (Biosoft[®]) 在 Macintosh 计算机上进行结合数据分析及曲线匹配。

从表 1 可以看出,结合亲和力如下:a) 突变体 Asn 230Asp (SEQ

ID NO:1)、Asn230Asp/Ala 228 Asp(SEQ ID NO:2)基本上没有改变;b)突变体 His280Ser/Asp 281 Val(SEQ ID NO:3)稍有降低而且结果是可重复的(在 25nM 和 6nM 之间);c)突变体 Ala228 Asp/Asn230 Asp/His 280 Ser/Asp 281 Val(SEQ ID NO:4)完全保持了野生型蛋白的活性。

表 1

COS 细胞中表达的用组氨酸标记的可溶性 IL—6 受体(野生型和突变型)的 IL—6 结合亲和力

突变体	IL—6 结合亲和力(nM)
Asn230Asp	(SEQ ID NO:1) 1.5 ± 1
Ala228Asp/Asn230Asp	(SEQ ID NO:2) 2.0 ± 1
His280Ser/Asp281Val	(SEQ ID NO:3) 4.3 ± 2
Ala228Asp/Asn230Asp/ His280Ser/Asp281Val	(SEQ ID NO:4) 2.5 ± 1
野生型 sIL—6R α	2.0 ± 1

突变体与 gp130 的结合

sIL—6R α /sgp130 异源二聚体的 IL—6—依赖性形成,用合适的单克隆抗体经体外共免疫沉淀容易检测。由此进行表现出与野生型有相同数量级的 IL—6 结合亲和力的突变体的选择,在有 IL—6 存在下,用共免疫沉淀法估价它们与 sgp130 的结合。

将³⁵S 标记的 sgp130、¹²⁵I—IL—6 以及转染 COS—7 细胞培养基(既有野生型又有突变型受体)一起温育。体外结合后,向混合物中加入抗 IL—6R α I6/R19.G11.,将免疫沉淀物在 SDS—聚丙烯酰胺凝胶上分离。结果如图 1 所示。可以看出,突变体 His280 Ser/Asp 281 Val(SEQ ID NO:3)大大降低了 IL—6/sIL—6R α 复合物与 gp130 分子的结合。单点取代突变体 Asn 230 Asp(SEQ ID NO:1)也降低与 gp130 的相互作用(第 2 道),这一突变体与 sgp130 作用的效果与突变体 Ala228 Asp/Asn 230Asp(SEQ ID NO:2)的该效果有

相同的数量级。最后,四位点突变体 Ala 228 Asp/Asn230Asp/His 280 Ser/Asp 281 Val(SEQ ID NO:4)表现出共免疫沉淀³⁵S—gp130的最差的能力。

同样检测了这些受体突变体与细胞膜表面的 gp130 相互作用的能力。为此,结合实验所用细胞为人黑瘤 A375 细胞,这种细胞具有超过 IL—6R α 的过量 gp130 分子。实际上,¹²⁵I—IL—6 与 A375 单细胞单层的结合能力可由加入可溶性受体大大提高。这种现象归因于 sIL—IL—6R α 与¹²⁵I—IL—6 结合然后再与细胞表面的 gp130 分子相互作用的能力。这种作用的特异性由这样一个事实证明:在 sIL—6R α 存在下的¹²⁵I—IL—6 结合的增加可经加入过量的未标记人肿瘤抑制素 M(Oncostatin OM)而受竞争(图 2)。这种细胞因子可以直接与 gp130 结合而使其与 IL—6/IL—6R α 复合物和 gp130 的结合形成一种竞争。与野生型 shIL—6R α 不同,当用¹²⁵I—IL—6 加上可溶性突变受体(作为拮抗剂起作用)处理细胞时仅检测到特异结合的微小增加(图 2)。以下突变体表现出与 gp130 作用的最大变化:His280 Ser/Asp 281 Val(SEQ ID NO:3)和 Ala 228 Asp/Asn 230 Asp/His 280 Ser/Asp 281 Val(SEQ ID NO:4)。

证明突变体 Ala 228 Asp/Asn 230 Asp/His 280 Ser/Asp 281 Val (SEQ ID NO:4)是 IL—6 拮抗剂

以上结果显示这种突变(与 IL—6 的亲合力没有任何降低)对 gp130 结合具有最好效果。为了研究这种突变体的生物学活性,用 NaxBac[®] 系统(Invitrogen's Baculovirus Expression System)大量产生这种突变型和野生型可溶性受体。将表达和提纯的受体进行免疫沉淀实验。

采用 Sf9 细胞(培养基为 Grace's 昆虫培养基)用于转染转移载体、分离重组病毒及制备高滴度病毒原种。用 High Five[®] 细胞(Invitrogen)替代产生蛋白质。简单地说,将在完全 Gracer's 昆虫培养基培养中生长的 4×10^7 High Five[®] 细胞接种到 750ml 培养瓶中,用合适的重组病毒在 10MOI 下感染。2 小时后,冲洗细胞,加 SF—900 无血清培养基。转染后 36 小时收集培养物上清液,用 PBS 透析

后直接上样于 Ni^{2+} -NTA 琼脂糖柱上。用 PBS/8mM 咪唑洗涤后,野生型 shIL-6R α 和突变型受体均在 PBS/80mM 中被洗脱。纯化蛋白质经 PBS 透析,直接用于实验或 4 $^{\circ}\text{C}$ 贮存(可达三周)。

纯化蛋白的使用使定量分析受体量及比较野生型受体和突变型受体在大范围 IL-6 浓度下与 gp130 作用的能力成为可能。结果(图 3)与以前用 COS 细胞来源的受体所获得的结果是相当吻合的。有趣的是,在曲线上的每一个点,突变型受体与 gp130 的共免疫沉淀量都要低于野生型受体,即使在细胞因子的最高测试浓度(100nM)下也是这样。这些发现证实了 IL-6 与突变型 sIL-6R α 间的相互作用产生与 gp130 有较低亲合力的复合物。

为了试验这些突变体对 IL-6 活性的潜在的拮抗作用,我们选择了人肝癌细胞中转录因子 APRF(急相应答因子)/STAT3 的 IL-6 依赖性激活。APRF 的激活(依赖于酪氨酸磷酸化)是在 IL-6 家族的所有细胞因子刺激下在几分钟内发生的快速胞质反应。

用递增浓度的 IL-6 与固定量野生型和突变型受体(100nM)一起,对人 HepG2 细胞进行刺激。如图 4 所示,在 shIL-6R α 加强的 IL-6 诱导激活 APRF 过程中,可溶性突变受体不但缺乏任何激动活性,而且下调该细胞因子的活性(图 4,第 8—10 道)。和共免疫沉淀实验结果预示的一样,当用高达 20pM 的 IL-6 处理细胞时,抑制作用是完全的(图 4,第 8 和 9 道),并且在 IL-6 浓度达到最高时(200pM,图 4 第 10 道),只检测到微弱的诱导作用。

为了试验拮抗作用是否是对 IL-6 特异的,将突变体加入到用经 IL-6 相关的细胞因子 OM 诱导的 HepG2 细胞中,已知 OM 有效诱导 APRF 磷酸化。如图 5 所示,突变体不拮抗 OM 活性。

序列表

一般信息

(i) 申请人: ISTITUTO DI RICERCHE DI BIOLOGIA MOLECOLARE P. ANGELETTI S. p. A.

(ii) 发明名称:由在 GP130 结合界面突变的白细胞介素 6(IL-6)受体 α 可溶形式组成的 IL-6 拮抗剂

(iii) 序列数目:4

(iv) 通信地址

(A) 地址: Società Italiana Brevetti

(B) 街道: Piazza di Pietra, 39

(C) 城市: 罗马

(D) 国家: 意大利

(E) 邮政编码: I—00186

(v) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: 3.5 吋软盘, 1.44 兆字节

(B) 计算机: IBM PC 兼容

(C) 操作系统: PC—DOS/MS—DOS Rev. 6.22

(D) 软件: Microsoft Word 6.0

(viii) 代理人信息

(A) 姓名: DI CERBO, Mario (Dr.)

(C) 卷号: RM/X88470/PC—DC

(ix) 电讯信息

(A) 电话: 06/6785941

(B) 电传: 06/6794692

(C) 电传: 612287 ROPAT

(1) SEQ ID NO:1 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 15 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假定的: 否

(v) 片段类型: 内部

(vii) 直接来源

(A) 合成: 真核细胞产生的重组蛋白

(ix) 特征:

(i) 序列特征

(A) 长度: 15 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假定的: 否

(v) 片段类型: 内部

(vii) 直接来源

(A) 合成: 真核细胞产生的重组蛋白

(ix) 特征:

(A) 名称: His280Ser/Asp281Val

(C) 鉴别方法: 变性 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳

(D) 其他信息: 白细胞介素 6 受体突变体的 273—287 位氨基酸序列

(xi) 序列描述: SEQ ID NO: 3

Leu Gln His His Cys Val Ile Ser Val Ala Trp Ser Gly Leu Arg
1 5 10 15

(4) SEQ ID NO: 4 信息

(i) 序列特征

(A) 长度: 66 个氨基酸

(B) 类型: 氨基酸

(D) 拓扑结构: 线性

(ii) 分子类型: 蛋白质

(iii) 假定的: 否

(v) 片段类型: 内部

(vii) 直接来源

(A) 合成: 真核细胞产生的重组蛋白

(ix) 特征:

(A) 名称: Ala228Asp/Asn230Asp/His280Ser/Asp281Val

(C) 鉴别方法: 变性 SDS—聚丙烯酰胺凝胶电泳

图 1

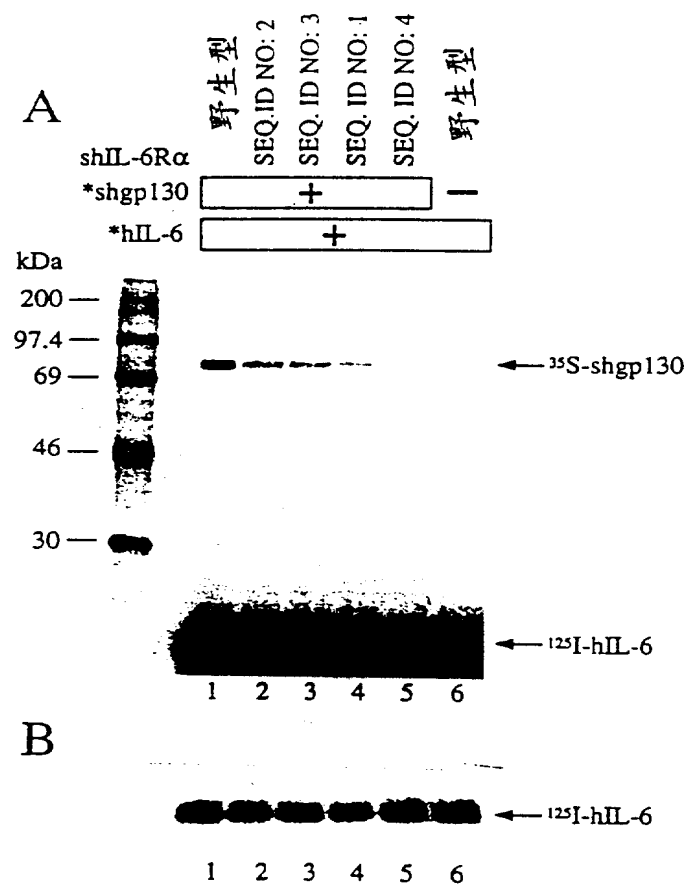


图 2

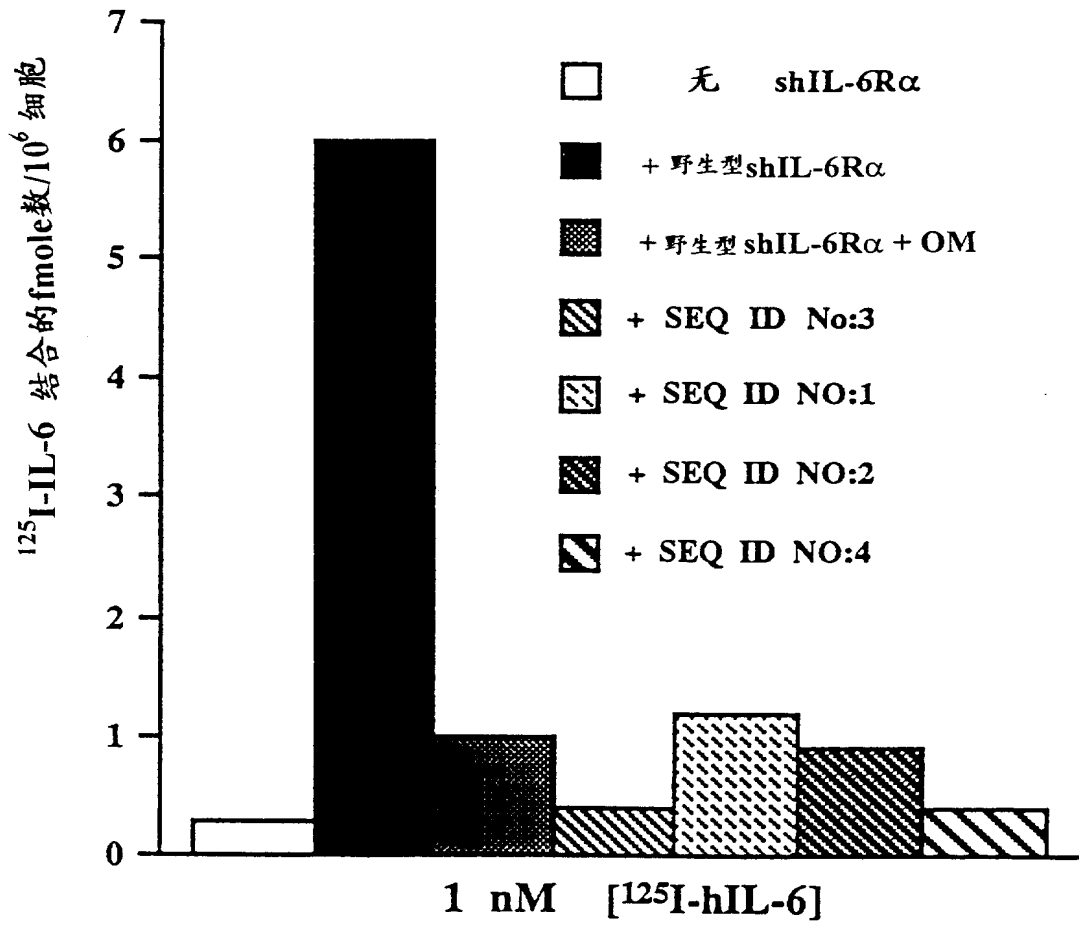


图 3

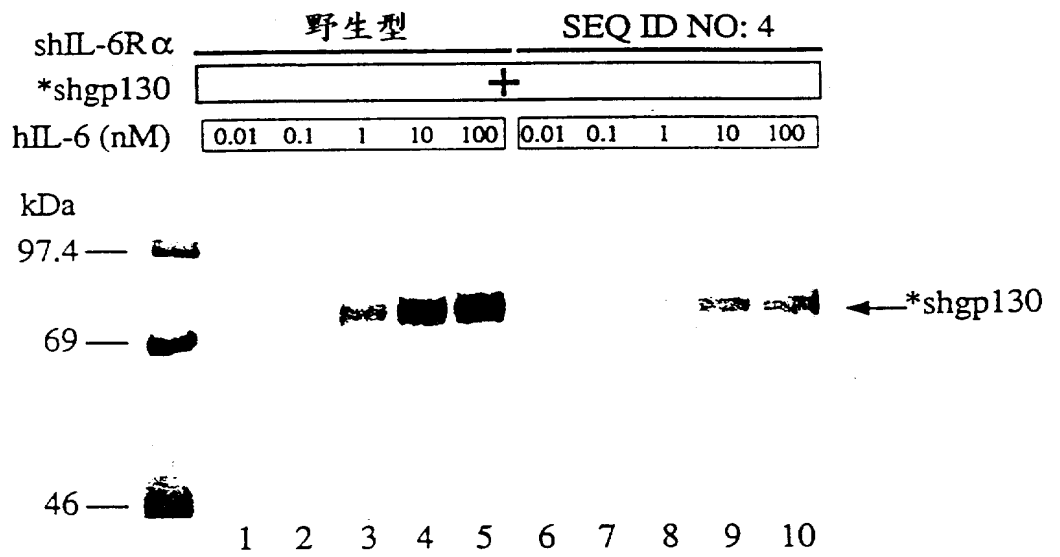


图 4

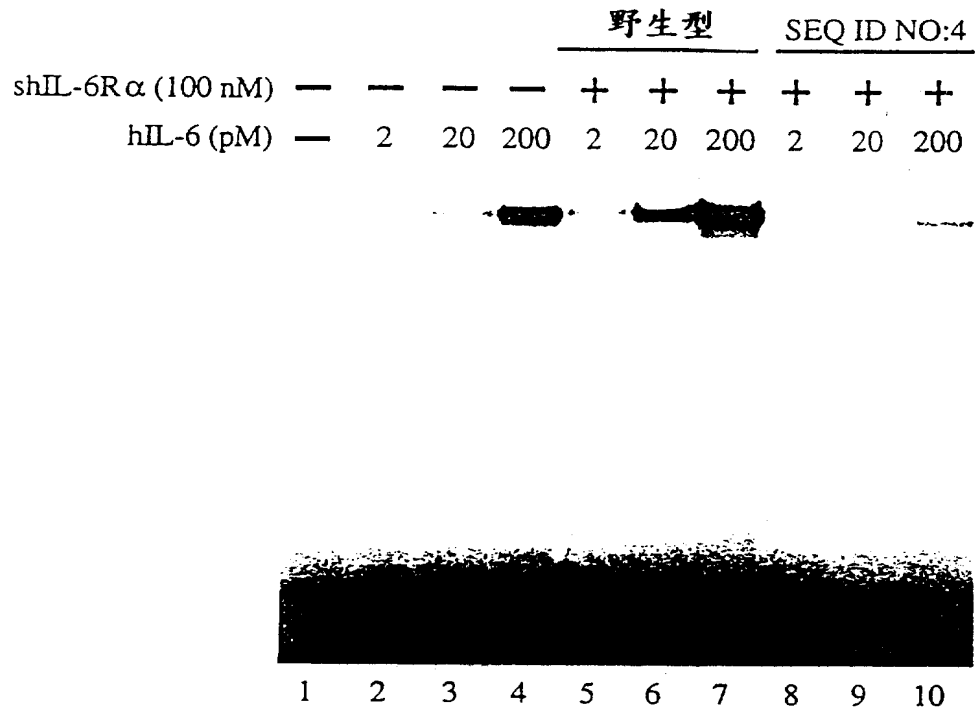


图 5

