(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第3961562号
(P3961562)
(45)発行日　平成19年8月22日(2007.8.22)　(24)登録日　平成19年5月25日(2007.5.25)

(51)Int.Cl.		F I		
C07K 14/54	(2006.01)	C07K	14/54	
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA
A61K 38/00	(2006.01)	A61K	37/02	
C07K 7/06	(2006.01)	C07K	7/06	
C12P 21/02	(2006.01)	C12P	21/02	C

請求項の数 2　(全 13 頁)

(21)出願番号　特願平7-512169
(86)(22)出願日　平成6年10月19日(1994.10.19)
(65)公表番号　特表平9-504030
(43)公表日　平成9年4月22日(1997.4.22)
(86)国際出願番号　PCT/US1994/011873
(87)国際公開番号　WO1995/011303
(87)国際公開日　平成7年4月27日(1995.4.27)
審査請求日　平成13年10月19日(2001.10.19)
(31)優先権主張番号　08/140,222
(32)優先日　平成5年10月20日(1993.10.20)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者
リジエネロン・フアーマシユーテイカルズ・インコーポレーテツド
アメリカ合衆国　ニューヨーク州　１０５９１、タリイタウン、オールド・ソー・ミル・リヴァー・ロード　７７７
(74)代理人
弁理士　川口　義雄
(74)代理人
弁理士　中村　至
(74)代理人
弁理士　船山　武
(74)代理人
弁理士　伏見　直哉

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＣＮＴＦ族アンタゴニスト

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
サイトカインと結合して複合体を形成し得る可溶性サイトカインアンタゴニストタンパク質であって、該サイトカインのレセプターは特異性決定α成分とβ１及びβ２シグナル伝達成分を有し、該複合体はサイトカインが結合してもシグナル伝達を開始しないという意味において非機能的であり、該サイトカインアンタゴニストタンパク質は
（ａ）サイトカインレセプターの特異性決定α成分の可溶性細胞外ドメイン；及び
（ｂ）サイトカインレセプターのβ１成分の可溶性細胞外ドメイン
を含み
前記サイトカインがＣＮＴＦであり、α成分（ａ）がｓＣＮＴＦＲαであり、細胞外ドメイン（ｂ）がｇｐ１３０の細胞外ドメインであることを特徴とする、前記サイトカインアンタゴニストタンパク質。
【請求項２】
請求項１に記載のタンパク質をコードするＤＮＡ配列。
【発明の詳細な説明】
発明の背景
繊毛向神経性因子（ＣＮＴＦ）、白血病阻害因子（ＬＩＦ）、オンコスタチン（ｏｎｃｏｓｔａｔｉｎ）Ｍ（ＯＳＭ）及びインターロイキン－６（ＩＬ－６）は様々な生物活性について発見されたが、（本明細書では「ＣＮＴＦ族」サイトカインと称する）新規定義のサイトカイン族を含んでいる。これらのサイトカインはその遠い構造類似性［Ｂａｚａｎ

，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｎ ７：１９７－２０８（１９９１）；Ｒｏｓｅ及びＢｒｕｃｅ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８８：８６４１－８６４５（１９９１）］のために、また恐らくはより重要なことであるが、「β」シグナル変換レセプター成分を共有している［Ｂａｕｍａｎｎ等，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６５：１９８５３－１９８６２（１９９３）；Ｄａｖｉｓ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６０：１８０５－１８０８（１９９３）；Ｇｅａｒｉｎｇ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５５：１４３４－１４３７（１９９２）；Ｉｐ等，Ｃｅｌｌ ６９：１１２１－１１３２（１９９２）；Ｓｔａｈｌ等，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：７６２８－７６３１（１９９３）；Ｓｔａｈｌ及びＹａｎｃｏｐｏｕｌｏｓ，Ｃｅｌｌ ７４：５８７－５９０（１９９３）］ために同じグループに分類される。このサイトカイン族によるレセプター活性化は上記β成分のホモ又はヘテロ二量化によって生ずる［Ｄａｖｉｓ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６０：１８０５－１８０８（１９９３），Ｍｕｒａｋａｍｉ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６０：１８０８－１８１０（１９９３）；Ｓｔａｈｌ及びＹａｎｃｏｐｏｕｌｏｓ，Ｃｅｌｌ ７４；５８７－５９０（１９９３）］。ＩＬ－６のレセプター活性化は、最初にＩＬ－６シグナルトランスデューサーとして同定されたタンパク質［Ｈｉｂｉ等，Ｃｅｌｌ ６３：１１４９－１１５７（１９９０）］であるｇｐ１３０のホモ二量化を必要とする［Ｍｕｒａｋａｍｉ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６０：１８０８－１８１０（１９９３），Ｈｉｂｉ等，Ｃｅｌｌ ６３：１１４９－１１５７（１９９０）］。ＣＮＴＦ、ＬＩＦ及びＯＳＭのレセプター活性化は、最初にＬＩＦとの結合能力によって同定された［Ｇｅａｒｉｎｇ等，ＥＭＢＯＪ．１０：２８３９－２８４８（１９９１）］ＬＩＦＲβとして公知の第２のｇｐ１３０関連タンパク質とｇｐ１３０との間のヘテロ二量化によって生ずる［Ｄａｖｉｓ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６０：１８０５－１８０８（１９９３）］。

これらのサイトカインの中には、β成分の他に、β成分よりも組織分布が制限され、従って特定のサイトカインの細胞標的を決定する特異性決定「α」成分を更に必要とするものがある［Ｓｔａｈｌ及びＹａｎｃｏｐｏｕｌｏｓ，Ｃｅｌｌ ７４：５８７－５９０（１９９３）］。従って，ＬＩＦ及びＯＳＭが、対応する細胞上にｇｐ１３０及びＬＩＦＲβの存在のみを必要とし得る広範作用因子であるのに対して、ＣＮＴＦはＣＮＴＦＲαを必要とし［Ｓｔａｈｌ及びＹａｎｃｏｐｏｕｌｏｓ，Ｃｅｌｌ ７４：５８７－５９０（１９９３）］、ＩＬ－６はＩＬ－６Ｒαを必要とする［Ｋｉｓｈｉｍｏｔｏ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５８：５９３－５９７（１９９２）］。ＣＮＴＦＲα（Ｄａｖｉｓ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５９：１７３６－１７３９（１９９３）及びＩＬ－６Ｒα［Ｈｉｂｉ等，Ｃｅｌｌ ６３：１１４９－１１５７，Ｍｕｒａｋａｍｉ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６０：１８０８－１８１０（１９９０）；Ｔａｇａ等，Ｃｅｌｌ ５８：５７３－５８１（１９８９）］は共に、細胞内シグナル化分子と相互作用せずに、そのリガンドを適切なシグナル変換βサブユニットと相互作用させるのに役立つという概念に合致した可溶性タンパク質として機能し得る［Ｓｔａｈｌ及びＹａｎｃｏｐｏｕｌｏｓ，Ｃｅｌｌ ７４：５８７－５９０（１９９３）］。

他のサイトカイン系からの別の証拠が更に、全てのサイトカインレセプターでのシグナル変換を開始させる共通の機構が二量化によって得られるという概念を支持する。これに関しては成長ホルモン（ＧＨ）が恐らくは最良の例として役立つ。結晶学的研究によって、各ＧＨ分子が２個の異なるレセプター結合部位を含み、いずれの部位もレセプター中の同一の結合ドメインによって認識され、単一のＧＨ分子を２個のレセプター分子に結合できることが判明した［ｄｅ Ｖｏｓ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５５：３０６－３１２（１９９２）］。二量化は順次生起し，まずＧＨの部位１が１個のレセプター分子に結合し、次いで部位２が第２のレセプター分子に結合する［Ｆｕｈ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５６：１６７７－１６８０（１９９２）］。エリトロポエチン（ＥＰＯ）レセプターはシステイン残基を導入して１個のアミノ酸を変化させることにより構造的に活性化され、ジスルフィド結合ホモ二量体を生成し得るので、ＥＰＯレセプターの研究も、レセプター活性化での二量化の重要性に対応している［Ｗａｔｏｗｉｃｈ等，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：２１４０－２１４４（１９９２）］。

レセプター活性化の重要ステップとしてのβサブユニットのホモ又はヘテロ二量化以外の第２の重要な特徴は、ＣＮＴＦ族サイトカインによる最終レセプター錯体の形成が、リガンドを順番にレセプター成分にうまく結合させる機構によって行われることである［Ｄａｖｉｓ等、Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６０：１８０５－１８１８（１９９３）；Ｓｔａｈｌ及びＹａｎｃｏｐｏｕｌｏｓ，Ｃｅｌｌ　７４：５８７－５９０（１９９３）］。従って、まずＣＮＴＦがＣＮＴＦＲαに結合して錯体を形成し、次いでｇｐ１３０に結合して（本明細書ではαβ１中間体と称する）中間体が生成する。この中間体は単一のβ成分しか持たないのでシグナル化能力を有さない。その後最終的にＬＩＦＲβと結合（ｒｅｃｒｕｉｔｉｎｇ）するとβ成分のヘテロ二量体が生成し、次いでシグナル変換を開始する。単一のｇｐ１３０分子及びＩＬ－６Ｒαに結合したＩＬ－６を含む同様の中間体は直接には単離されなかったが、遠い同族体であるＣＮＴＦとの類似性によって、また最終的に活性なＩＬ－６レセプター錯体が２個のｇｐ１３０モノマーと結合するという事実によって中間体が存在すると考えられた。要するに、これらの知見によって、各サイトカインが３個以下のレセプター結合部位、即ち任意のα特異性決定成分に結合する部位（α部位）、第１のβシグナル変換成分に結合する部位（β１部位）、及び第２のβシグナル変換成分に結合する部位（β２部位）を有し得る一般的なサイトカインレセプター錯体（図１）の構造が提案されることになった［Ｓｔａｈｌ及びＹａｎｃｏｐｏｕｌｏｓ，Ｃｅｌｌ　７４：５８７－５９０（１９９３）］。これらの３部位は順次使用され、錯体形成の最終ステップでβ成分が二量化する。これはシグナル変換開始のために重要である［Ｄａｖｉｓ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６０：１８０５－１８１８（１９９３）］。レセプター活性化の詳細が公知であり、またＣＮＴＦに対して非機能的なβ１中間体が存在するので、ＣＮＴＦが場合によってはＩＬ－６の高親和性アンタゴニストとなり、以下で詳述するようにＣＮＴＦ族サイトカインのリガンド又はレセプターベースのアンタゴニストの設計の戦略基盤となることが知見された。

サイトカインの結合によってレセプター錯体が形成されれば、β成分の二量化が細胞内チロシンキナーゼ活性を活性化して、広範な基質がリン酸化する［Ｉｐ等，Ｃｅｌｌ　６９：１２１－１１３２（１９９２）］。チロシンのリン酸化を阻止する阻害剤は遺伝子誘導のようなその後の事象をも妨げるので、このチロシンキナーゼの活性化は下流事象にとって重要に思える［Ｉｐ等，Ｃｅｌｌ　６９：１２１－１１３２（１９９２）；Ｎａｋａｊｉｍａ及びＷａｌｌ，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１１：１４０９－１４１８（１９９１）］。Ｊａｋ１、Ｊａｋ２及びＴｙｋ２（Ｊａｋ／Ｔｙｋキナーゼと称される）を含み［Ｆｉｒｍｂａｃｈ－Ｋｒａｆｔ等，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　５：１３２９－１３３６（１９９０）；Ｗｉｌｋｓ等，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１１：２０５７－２０６５（１９９１）］、他のサイトカインと共にシグナル変換に関与する［等，Ｃｅｌｌ　７４：２３７－２４４（１９９３）；Ｓｉｌｖｅｎｎｏｉｎｅｎ等，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ（出版；１９９３）；Ｖｅｌａｚｑｕｅｚ等，Ｃｅｌｌ　７０；３１３－３２２（１９９２）；Ｗｉｔｔｈｕｈｎ等，Ｃｅｌｌ　７４：２２７－２３６（１９９３）］新規発見の非レセプターチロシンキナーゼ族が、リガンドの不在下でβサブユニットのｇｐ１３０及びＬＩＦＲβの細胞質ドメインと予め会合し、リガンド付加によってチロシンリン酸化して活性化する［Ｓｔａｈｌ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ（提出；１９９３）］ことが最近我々により実証された。従って、これらのキナーゼは、細胞外側でリガンド結合するために、細胞内部で活性化される細胞内シグナル変換の最も基幹的ステップであるように思える。この系に基づく特異なアゴニスト又はアンタゴニスト活性について小分子試料をスクリーニングするためのアッセイ系を以下で説明する。

ＣＮＴＦ族サイトカインは広範な生理的過程で重要な役割を果たし、アンタゴニスト及びアゴニストの両方で治療に適用され得る。

発明の要約

本発明の一つの目的は、ＩＬ－６関連疾病又は障害の治療に有用なＩＬ－６アンタゴニストを生成することである。

本発明の他の目的は、本明細書に記載のＩＬ－６アンタゴニストの、骨粗鬆症治療のため

の使用である。
本発明の他の目的は、本明細書に記載のＩＬ－６アンタゴニストの、多発性骨髄腫を含む癌の一次作用及び二次作用の両方の治療のための使用である。
本発明の他の目的は、本明細書に記載のＩＬ－６アンタゴニストのカヘキシー治療のための使用である。
本発明の他の目的は、ＣＮＴＦ族サイトカインのメンバーの新規アゴニスト及びアンタゴニストの同定に有用なスクリーニング系の開発である。
本発明の他の目的は、ＣＮＴＦ族サイトカインのアゴニスト及びアンタゴニストとして作用する小分子の同定に有用なスクリーニング系の開発である。
これらの目的や他の目的は、ＣＮＴＦ族レセプター成分を用いて、ＩＬ－６及びＣＮＴＦアンタゴニストのような治療活性を有すると共に、ＣＮＴＦサイトカイン族メンバーの新規アゴニスト及びアンタゴニストの同定に有用なアッセイ系で有益性を示す非機能的な中間体を生成することにより達成される。

【図面の簡単な説明】

図１：一般的なサイトカインレセプターのモデルでのレセプター成分の順番による結合。このモデルは、サイトカインが３個以下のレセプター結合部位を含み、まず任意のα成分と結合し、次いでβ１、次いでβ２と結合することによってレセプター成分と相互作用することを示している。多数のサイトカインレセプター用のβ成分は、膜近位領域（斜線部分）を通じてＪａｋ／Ｔｙｋ族細胞質タンパク質チロシンキナーゼと相互作用する。β成分が二量化しただけで、β成分及びＪａｋ／Ｔｙｋキナーゼのチロシンリン酸化（Ｐ）で図示するようにシグナル変換が開始する。
図２：ＣＮＴＦは、ＩＬＦＲβではなく、ＩＬ６Ｒα、ｇｐ１３０、ＣＮＴＦＲαを発現するＰＣ１２細胞系（ＰＣ１２Ｄと称する）でＩＬ－６応答を阻害する。血清の欠乏したＰＣ１２Ｄ細胞を前述したようなＣＮＴＦの存在下及び不在下でＩＬ－６（５０ｎｇ／ｍＬ）と共にインキュベートした。あるプレートには、前述したような可溶性ＩＲ９６Ｒα（１ｍｇ／ｍＬ）又は可溶性ＣＮＴＦＲα（１ｍｇ／ｍＬ）を更に加えた。細胞溶解物を抗ｇｐ１３０で免疫沈殿させ、抗ホスホチロシンでイムノブロットした。ｇｐ１３０のチロシンリン酸化はＩＬ－６レセプター系の活性化がＩＬ－６によって誘導されることを示し、この活性化はＣＮＴＦを同時添加すると阻止される。
図３：ＰＣ１２Ｄ細胞上でのヨウ素化ＣＮＴＦ結合のスキャッチャード分析。ＰＣ１２Ｄ細胞を過剰非放射性コンペティターの存在下又は不在下で濃度の異なるヨウ素化ＣＮＴＦと共にインキュベートして特異結合を調べた。図面は、特異結合したヨウ素化ＣＮＴＦの量のスキャッチャードプロットを示し、９ｐＭ及び３．４ｎＭの解離定数を有する２つの結合部位に対応するデータを提供する。

発明の詳細な説明

本発明はＣＮＴＦ族サイトカインのようなサイトカインが共有するレセプター成分に基づく新規アンタゴニストを提供する。
本明細書に記載する発明は、α特異性決定成分を使用して、これがサイトカインと組み合わさると第１のβシグナル変換成分と結合して非機能的な中間体を生成し、次いでこれが第２のβシグナル変換成分と結合するとβ－レセプターが二量化して結果的にシグナルが変換される任意のサイトカインに対するアンタゴニストの生成法を考察する。本発明によれば、レセプターの可溶性α特異性決定成分（ｓＲα）を、サイトカインレセプターの第１のβシグナル変換成分（β１）の細胞外ドメインと組み合わせてヘテロ二量体（ｓＲα：β１）を生成する。この二量体は、サイトカインと結合して非機能的な錯体を生成することによってサイトカインに対するアンタゴニストとして作用する。
実施例１に記載するように、ＣＮＴＦとＩＬ－６はβ１レセプター成分のｇｐ１３０を共有している．ＣＮＴＦがＣＮＴＦＲα及びｇｐ１３０と中間体を生成するということはＬＩＦＲβの欠失した細胞で実証され得る（実施例１）。この場合ＣＮＴＦとＣＮＴＦＲαとの錯体はｇｐ１３０と結合し、ＩＬ－６及びＩＬ－６Ｒαによってｇｐ１３０のホモ二量化が阻止され、シグナル変換は妨げられる。これらの研究は、リガンド、そのαレセプ

ター成分及びそのβ１レセプター成分からなる非機能的な中間体錯体をリガンドの存在下で生成できれば、この錯体がリガンドの作用を効果的に阻止することを示しているので、本明細書に記載するＩＬ－６アンタゴニストの開発の基礎となる。他のサイトカインが、本発明のアンタゴニストの生成にも使用できる他のβ１レセプター成分（例えばＬＩＦＲβ）を使用してもよい。

従って、例えば本発明の一実施態様によれば、ＩＬ－６又はＣＮＴＦの効果的なアンタゴニストはそのレセプター（それぞれｓＩＬ－６Ｒα及びｓＣＮＴＦＲα）のα特異性決定成分の細胞外ドメインと、ｇｐ１３０の細胞外ドメインとのヘテロ二量体からなる。以下でそれぞれｓＩＬ－６Ｒα：β１及びｓＣＮＴＦＲα：β１と称する得られたヘテロ二量体は、それぞれＩＬ－６又はＣＮＴＦに対して親和性の高いトラップとして機能して、サイトカインが天然膜結合形態のレセプターとはシグナル変換錯体を形成できないようにする。

レセプターの細胞外部分に由来する可溶性リガンド結合ドメインはリガンド用トラップとしては幾分効果的であり、従ってアンタゴニストとして作用する［Ｂａｒｇｅｔｚｉ等，Ｃａｎｃｅｒ Ｒｅｓ．５３：４０１０－４０１３（１９９３）；等，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８９：８６１６－８６２０（１９９２）；Ｍｏｈｌｅｒ等，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１５１：１５４８－１５６１（１９９３）；Ｎａｒａｚａｋｉ等，Ｂｌｏｏｄ ８２：１１２０－１１２６（１９９３）］ことが判明したが、ＩＬ－６及びＣＮＴＦレセプターは、αレセプター成分がリガンド結合ドメインとなり、これがリガンドと協調して可溶性形態においてレセプターアゴニストとして効果的に機能するという点で例外的である［Ｄａｖｉｓ等、Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５９：１７３６－１７３９（１９９３）；Ｔａｇａ等，Ｃｅｌｌ ５８；５７３－５８１（１９８９）］。本発明で製造したｓＲα：β１ヘテロ二量体は効果的なリガンド用トラップとなり、機能的な中間体を生成せずに（ＣＮＴＦ－ＰＣ１２Ｄ細胞の結合研究に基づく）ピコモル範囲の親和性でもってこれらのリガンドと結合する。

当業者に公知の方法を用いてα及びβレセプター細胞外ドメインを製造することができる。ＣＮＴＦＲαレセプターはクローニングされ、配列決定され、発現されている［Ｄａｖｉｓ等（１９９１）Ｓｃｉｅｎｃｅ ２５３：５９－６３；この文献は参考として本明細書の一部を構成するものとする］。ＬＩＦＲβ及びｇｐ１３０のクローニングはＧｅａｒｉｎｇ等，ＥＭＢＯ Ｊ．１０：２８３９－２８４８（１９９１）、Ｈｉｂｉ等，Ｃｅｌｌ ６３：１１４９－１１５７（１９９０）、及び１９９３年５月２７日公開のＰＣＴ出願ＷＯ９３／１０１５１号に記載されている。前記文献は参考として本明細書の一部を構成するものとする。

本発明を実施するのに有用なレセプター分子は、原核生物又は真核生物発現系でのクローニング及び発現により製造することができる。幾つかの方法を使用して組換えレセプター遺伝子を発現し精製することができる。因子をコードする遺伝子を、非制限的ではあるが例えばｐＣＰ１１０のような細菌性発現ベクター中にサブクローニングすることができる。

その後安定した生物活性タンパク質を生成できる任意の技術によって組換え因子を精製することができる。例えば非制限的ではあるが、因子を可溶性タンパク質又は封入体として細胞から回収し、これから因子を８Ｍ塩酸グアニジニウム及び透析によって定量的に抽出することができる。因子を更に精製するために、従来のイオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー又はゲル濾過が使用され得る。

βレセプターヘテロ二量体の生成を記載する「Ｒｅｃｅｐｔｏｒ ｆｏｒ Ｏｎｃｏｓｔａｔｉｎ Ｍ ａｎｄ Ｌｅｕｋｅｍｉａ Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ Ｆａｃｔｏｒ」と題する１９９３年５月２７日公開のＰＣＴ出願ＷＯ９３／１０１５１号に記載のように公知の融合領域を用いてｓＲα：βヘテロ二量体レセプターを操作してもよいし、化学的手段により細胞外ドメインを架橋させて製造してもよい。使用するドメインはα及びβ成分の全細胞外ドメインからなっていてもよいし、ｓＲα：β１錯体でリガンドや他の成分との

錯体形成能力を維持する突然変異体又はその断片からなっていてもよい。
本発明の一実施態様では、細胞外ドメインはロイシンジッパーを用いて操作される。ヒト転写因子ｃ－ｊｕｎ及びｃ－ｆｏｓのロイシンジッパードメインが安定なヘテロ二量体を１：１の化学量で生成することが判明した［Ｂｕｓｃｈ及びＳａｓｓｏｎｅ－Ｃｏｒｓｉ，Ｔｒｅｎｄｓ Ｇｅｎｅｔｉｃｓ ６：３６－４０（１９９０）；Ｇｅｎｔｚ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４３：１６９５－１６９９（１９８９）］。ｊｕｎ－ｊｕｎホモ二量体が生成することも判明したが、これらの二量体の安定度はｊｕｎ－ｆｏｓヘテロ二量体の約１０００分の１である。ｆｏｓ－ｆｏｓホモ二量体は検出されなかった。
ｃ－ｊｕｎ又はｃ－ｆｏｓのロイシンジッパードメインは、遺伝子操作キメラ遺伝子によって前述のレセプター成分の可溶性又は細胞外ドメインのＣ末端でフレーム融合する。融合は直接的であってもよいし、可撓性リンカードメイン、例えばヒトＩｇＧのヒンジ領域、又は長さや組み合わせの異なる小さなアミノ酸（例えばグリシン、セリン、トレオニン又はアラニン）からなるポリペプチドリンカーを使用してもよい。更には、キメラタンパク質をＨｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ－Ｈｉｓ（Ｈｉｓ６）［配列番号１］でタッグ（ｔａｇｇｅｄ）して、金属キレートクロマトグラフィーで高速精製し及び／又は対応する抗体が利用可能であるエピトープでタッグしてウエスタンブロットによる検出、免疫沈殿又はバイオアッセイでの活性欠失／阻止を実施することができる。
別の実施態様では、同様の方法を用いるが、但しヒトＩｇＧ１のＦｃドメインを用いて、ｓＲα：β１ヘテロ二量体を製造する［Ａｒｕｆｆｏ等，Ｃｅｌｌ ６７：３５－４４（１９９１）］。後者とは対照的に、Ｆｃドメインを保有するキメラ分子はジスルフィド結合ホモ二量体として発現されるので、ヘテロ二量体の生成は生化学的に達成されねばならない。従って、ホモ二量体は、鎖間ジスルフィドの破壊を助長するが、鎖内ジスルフィドには作用しない条件下では還元し得る。次いで、種々の細胞外部分を含むモノマーを等モル量で混合し、酸化して、ホモ二量体とヘテロ二量体との混合物を生成する。この混合物の成分をクロマトグラフィー技術により分離する。あるいは、この種のヘテロ二量体の生成を、レセプター成分の可溶性又は細胞外部分、次いでｈｉｇＧのＦｃドメイン、次いで前述のｃ－ｊｕｎ又はｃ－ｆｏｓロイシンジッパーからなる分子を遺伝子操作して発現することによって変化（ｂｉａｓｅｄ）させてもよい［Ｋｏｓｔｅｌｎｙ等，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１４８：１５４７－１５５３（１９９２）］。これらのロイシンジッパーは主にヘテロ二量体を生成するので、所望とあればこれらのジッパーを使用してヘテロ二量体の生成を促進することができる。ロイシンジッパーを用いた前述のキメラタンパク質に関しては、これらを金属キレート又はエピトープでタッグしてもよい。このタッグしたドメインを使用して金属キレートクロマトグラフィーで高速精製し及び／又は抗体によりウエスタンブロットによる検出、免疫沈殿又はバイオアッセイでの活性欠失／阻止を実施することができる。
本発明の他の実施態様では、可撓性リンカーループを用いてキメラ分子として発現させることによりｓＲα：β１ヘテロ二量体を製造する。キメラタンパク質をコードするＤＮＡ構築物は、可撓性ループによって縦列に（「ヘッドツーヘッド」）融合した２つの可溶性又は細胞外ドメインを発現するように設計されている。このループは完全に人工（例えば一定の間隔をあけてセリン又はトレオニンによって遮断されたポリグリシンリピート）であってもよいし、天然タンパク質から「借用（ｂｏｒｒｏｗｅｄ）」したもの（例えばｈｉｇＧのヒンジ領域）であってもよい。融合した可溶性又は細胞外ドメインの順序が切り換わった分子（例えばｓＩＬ６Ｒα／ループ／ｓｇｐ１３０又はｓｇｐ１３０／ループ／ｓＩＬ６Ｒα）及び／又はループの長さや組成が変化した分子を操作して、所望の特性を有する分子を選択できるようにしてもよい。
あるいは、本発明で製造したヘテロ二量体を適切なα及びβ成分でコトランスフェクトした細胞系から精製してもよい。当業者に利用可能な方法を用いてヘテロ二量体をホモ二量体から分離してもよい。例えば、調製用非変性ポリアクリルアミドゲルから受動溶離させて限定された量のヘテロ二量体を回収してもよい。あるいは、高圧カチオン交換クロマトグラフィーを用いてヘテロ二量体を精製してもよい。Ｍｏｎｏ Ｓカチオン交換カラムを

用いて優れた精製が行われた。
遊離ＣＮＴＦ又はＩＬ－６と結合することによってアンタゴニストとして作用するｓＲα：β１ヘテロ二量体の他に、本発明では更に、ＩＬ－６Ｒα及び単一のｇｐ１３０分子とは結合できるが、第２のｇｐ１３０と結合してβ成分を完全にホモ二量化することはできず、従って任意のＩＬ－６反応性細胞上で有効なＩＬ－６アンタゴニストとして作用し得る、遺伝子操作によって新たな特性を有する突然変異型ＩＬ－６の使用を考察する。ＩＬ－６及びＣＮＴＦレセプター錯体の構造モデルは、これらのサイトカインがα、β１及びβ２レセプター成分との結合のために異なる部位を有することを示している［Ｓｔａｈｌ及びＹａｎｃｏｐｏｕｌｏｓ，Ｃｅｌｌ　７４：５８７－５９０（１９９３）］。これらの部位の各々を含んでいる重要なアミノ酸残基が突然変異すると、所望のアンタゴニスト特性を有する新たな分子が生ずる。β１部位を除去すると、αレセプター成分とは尚結合し得るが、β１成分とは結合せず、従ってナノモルレベルの親和性を有するアンタゴニストを含む分子が得られる。ＩＬ－６のβ２部位（ＩＬ－６β２－）を含む主要アミノ酸残基が突然変異すると、ＩＬ－６Ｒα及び第１のｇｐ１３０モノマーには結合するが、第２のｇｐ１３０とは結合せず、従って機能的に不活性な分子が得られる。同様に、ＣＮＴＦβ２部位の突然変異では、ＣＮＴＦＲα及びｇｐ１３０とは結合するが，ＬＩＦＲβとは結合できず、従って非機能的なβ１中間体を生成することによってＣＮＴＦ作用と拮抗する分子（ＣＮＴＦβ２－）が得られる。ＣＮＴＦが高い親和性でもってβ１中間体を生成する前述の結合結果に基づけば、ＣＮＴＦβ２－及びＩＬ－６β２－は共に１０ｐＭの範囲の親和性を有するアンタゴニストとなり得る。
種々の手段を使用して、所望の特性を有するＩＬ－６又はＣＮＴＦの突然変異を生起して同定する。ＩＬ－６又はＣＮＴＦをコードするＤＮＡの標準法によるランダム突然変異生成を使用し、次いで生成物試料を分析して、後述するような所望される新たな特性を有する突然変異サイトカインを同定してもよい。徹底的に遺伝子工学による突然変異生成を使用して、組換えタンパク質の機能的ドメインの構造機構を解明した。欠失又は置換突然変異生成の実施については文献に幾つかの異なる方法が記載されている。最もうまくいったのは、アラニン走査突然変異生成［Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ及びＷｅｌｌｓ（１９８９），Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４４：１０８１－１０８５］及び相同体走査突然変異生成［Ｃｕｎｎｉｎｇｈａｍ等，（１９８９），Ｓｃｉｅｎｃｅ　２４３：１３３０－１３３６］であるように思える。
上記方法を用いたＩＬ－６又はＣＮＴＦ核酸配列の標的突然変異生成を使用して、ＣＮＴＦβ２－又はＩＬ－６β２－候補を生成することができる。標的突然変異生成に適した領域の選択は系統的に実施するか又は各因子に対するモノクローナル抗体のパネルを使用して、サイトカインが前述のαレセプター成分だけ又はαβ１ヘテロ二量体可溶性レセプターに結合した後に暴露され得るサイトカインの領域をマッピングする研究から決定される。同様に、サイトカインのみの又は前述のαレセプター成分もしくはαβ１ヘテロ二量体可溶性レセプターに結合した錯体内での化学修飾又は限定タンパク質加水分解を行い、次いで保護領域及び暴露領域を分析すると潜在的なβ２結合部位が判明し得る。
所望の特性を備えたＣＮＴＦ又はＩＬ－６突然変異体の同定アッセイは、適切に反応性の細胞系でのＩＬ－６又はＣＮＴＦの作用を高い親和性でもって阻止する能力を必要とする［Ｄａｖｉｓ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５９：１７３６－１７３９（１９９３）；Ｍｕｒａｋａｍｉ等，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　８８：１１３４９－１１３５３（１９９１）］。このようなアッセイは、ＣＮＴＦ又はＩＬ－６によって駆動される細胞増殖、残存もしくはＤＮＡ合成、又は因子の結合がＣＡＴもしくはβ－ガラクトシダーゼのようなリポーターの生成を誘発する細胞系の構築を含んでいる［Ｓａｖｉｎｏ等，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ　９０：４０６７－４０７１（１９９３）］。
あるいは、種々の突然変異体の特性をレセプターをベースとするアッセイで評価してもよい。このような一アッセイは、エピトープでタッグした［Ｄａｖｉｓ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５３：５９－６３（１９９１）］ｓＲα：β１試薬を用いて、前述のｓＲα：β１レ

セプターヘテロ二量体との結合能力について突然変異体をスクリーニングすることからなる。更には、エピトープでタッグした可溶性β２試薬がα：β１ヘテロ二量体の存在下でサイトカインに結合するかどうかを評価することによってβ２部位の存在又は不在をプロービングすることができる。例えば、ＣＮＴＦは、ＣＮＴＦＲα及びｇｐ１３０の両方の存在下ではＬＩＦＲβ（β２成分）だけに結合する［Ｄａｖｉｓ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６０：１８０５－１８０８（１９９３）；Ｓｔａｈｌ等，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：７６２８－７６３１（１９９３）］。従って、可溶性ＬＩＦＲβ試薬は可溶性ｓＲα：β１二量体ｓＣＮＴＦＲα：β１の存在下ではＣＮＴＦだけに結合する。ＩＬ－６の場合、ｓＲα：β１試薬はＩＬ－６Ｒα：β１であり、β２部位のプローブはエピトープでタッグしたｓｇｐ１３０である。従って、ＣＮＴＦのβ２突然変異体はｓＲα：β１試薬と結合したものとして同定され、このことからサイトカインのα及びβ１部位がインタクトであり、尚β２試薬とは結合できなかったことが分かる。

更には、本発明は，Ｊａｋ１、Ｊａｋ２及びＴｙｋ２もしくは他の任意のシグナル変換成分（例えばＣＮＴＦ族サイトカインのメンバーに応答してリン酸化されるように決定されるＣＬＩＰ）からなる群の中から選択されたシグナル変換成分又はβレセプター成分のリン酸化を測定することによって潜在的なβ２突然変異体を検出又は測定する方法を提供する。

本明細書に記載するシグナル変換成分を発現する細胞は天然であっても遺伝子操作されたものでもよい。例えば、Ｖｅｌａｚｑｕｅｚ等，Ｃｅｌｌ，Ｖｏｌ．７０：３１３－３２２（１９９２）に記載の方法で得られたＪａｋ１及びＴｙｋ２をコードする核酸配列を、当業者に公知の任意の方法を用いて、形質導入、トランスフェクション、マイクロインジェクション、エレクトロポレーションにより遺伝子導入動物等を介して細胞内に導入することができる。

本発明によれば、細胞を潜在的なアンタゴニストに暴露し、β成分又はシグナル変換成分のチロシンリン酸化を、潜在的なアンタゴニストの不在下での同一成分のチロシンリン酸化と比較する。

本発明の他の実施態様では、前記細胞と潜在的なアンタゴニストとの接触により生じたチロシンリン酸化を、親ＣＮＴＦ族メンバーに暴露した同一細胞のチロシンリン酸化と比較する。このようなアッセイでは、細胞は細胞外レセプター（α成分）を発現しなければならないか又は細胞を可溶性レセプター成分の存在下でテスト試薬に暴露してもよい。従って例えばＣＮＴＦのアゴニスト又はアンタゴニストを同定するように設計されたアッセイ系では、細胞はα成分ＣＮＴＦＲα、β成分ｇｐ１３０、ＬＩＦＲβ、及びシグナル変換成分（例えばＪａｋ１）を発現し得る。細胞をテスト試薬に暴露し、β成分又はシグナル変換成分のチロシンリン酸化をＣＮＴＦの存在下で生じたリン酸化パターンと比較する。あるいは、テスト試薬への暴露によって生ずるチロシンリン酸化をテスト試薬の不在下で生ずるリン酸化と比較する。あるいは、例えばＩＬ－６用アッセイ系は、β成分ｇｐ１３０及びシグナル変換タンパク質（例えばＪａｋ１、Ｊａｋ２又はＴｙｋ２）を発現する細胞を可溶性ＩＬ－６レセプターと共にテスト試薬に暴露することからなり得る。

本発明の他の実施態様では、前述の方法を使用して、リガンド結合、レセプター錯体形成及びその後のシグナル変換のプロセスの種々のステップで作用する小分子アンタゴニストのスクリーニング方法を開発する。前述したような可溶性レセプターとリガンドとの錯体形成への干渉を評価することによって、潜在的にリガンド－レセプター相互作用に干渉する分子をスクリーニングする。あるいは、ＩＬ－６又はＣＮＴＦでリポーター遺伝子の応答を誘発する細胞ベースのアッセイを小分子又は天然生成物のライブラリーに対してスクリーニングして、潜在的なアンタゴニストを同定する。アンタゴニスト活性を示すこれらの分子を、他の因子（例えばＧＭＣＳＦ又はレセプターのチロシンキナーゼを活性するニューロトロフィン－３のような因子）に応答する細胞ベースのアッセイで再度スクリーニングして、ＣＮＴＦ／ＩＬ－６／ＯＳＭ／ＬＩＦ族因子に対する分特異性を評価する。このような細胞ベースのスクリーンを使用して、シグナル変換法で多数の標的のいずれかを阻害するアンタゴニストを同定する。

このような一アッセイ系では、アンタゴニストに特異的な標的はＪａｋ／Ｔｙｋ族キナーゼ［Ｆｉｒｍｂａｃｈ－Ｋｒａｆｔ，Ｏｎｃｏｇｅｎｅ　５：１３２９－１３３６（１９９０）；Ｗｉｌｋｓ等，Ｍｏｌ．Ｃｅｌｌ．Ｂｉｏｌ．１１：２０５７－２０６５（１９９１）］とレセプターβサブユニットとの相互作用である。前述のように、ＬＩＦＲβ及びｇｐ１３０は、リガンドで誘導されるβ成分の二量体化に応答して活性化したＪａｋ／Ｔｙｋ族細胞質タンパク質チロシンキナーゼのメンバーと予め会合する（Ｓｔａｈｌ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ（提出；１９９３））。従って、細胞の細胞質内に進入してβ成分とＪａｋ／Ｔｙｋキナーゼとの相互作用を破壊し得る小分子は、その後の全ての細胞内シグナル化を潜在的に阻止し得た。このような活性は、精製β成分及びＪａｋ／Ｔｙｋキナーゼの関連結合ドメイン間の相互作用に対する小分子の阻止能力を評価するｉｎ　ｖｉｔｒｏ図式でスクリーニングできた。あるいは、２ハイブリッド相互作用系を用いて、Ｊａｋ／Ｔｙｋキナーゼに結合するβ成分の酵母ベースアッセイを阻害し得る分子を容易にスクリーニングすることができた［Ｃｈｉｅｎ等，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．８８：９５７８－９５８２（１９９１）］。このような系では、２種のタンパク質（この例ではβ成分とＪａｋ／Ｔｙｋキナーゼ又はその関連ドメイン）の相互作用は、β－ガラクトシダーゼのような好都合なマーカーの生成をもたらす。小分子試料で、２種の対照タンパク質間の相互作用を阻害せずに所望の相互作用を破壊させる能力を試験する。このスクリーンの利点は、β成分とＪａｋ／Ｔｙｋキナーゼとの相互作用を阻害する前に試験化合物が細胞内に進入するという要件である。

本明細書に記載するＣＮＴＦ族アンタゴニストはサイトカインＣＮＴＦ及びＩＬ－６と結合するか又はこれらと競合する。従って、これらは、ＣＮＴＦ又はＩＬ－６によって媒介された疾病又は障害の治療に有用である。例えばＩＬ－６アンタゴニストの治療的使用には以下のものが含まれる：

１）閉経後の女性又は卵巣摘出によりエストロゲンレベルが低下して病状が悪化し得る骨粗鬆症では、ＩＬ－６が破骨細胞形成の重要なメディエーターとなって骨吸収を生じるように思える［Ｈｏｒｏｗｉｔｚ，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２６０：６２６－６２７（１９９３）；Ｊｉｌｋａ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５７：８８－９１（１９９２）］。重要なことであるが，ＩＬ－６は単にエストロゲン欠失状態で重要な役割を果たすように思え、一見したところ正常な骨維持への関与は最低限である。これに対応して、実験証拠は、機能を阻止するＩＬ－６抗体が破骨細胞数を減少させ得ることを示している［Ｊｉｌｋａ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５７：８８－９１（１９９２）］。エストロゲン置換治療も使用されるが、副作用があるように思える。この副作用には子宮内膜癌や乳癌の危険性増加が含まれ得る。従って、本明細書に記載するようなＩＬ－６アンタゴニストは、破骨細胞形成を正常レベルまで下げるのにより特異的である。

２）ＩＬ－６は細胞自身に作用する様式（ａｕｔｏｃｒｉｎｅ　ｆａｓｈｉｏｎ）又は隣接する細胞に作用する様式（ｐａｒａｃｒｉｎｅ　ｆａｓｈｉｏｎ）で作用して腫瘍形成を促進することによって多発性骨髄腫に直接関与するように思える［Ｖａｎ　Ｏｅｒｓ等，Ａｎｎ　Ｈｅｍａｔｏｌ．６６：２１９－２２３（１９９３）］。更には、Ｉｌ－６レベルが上がると、骨吸収、カルシウム過剰血症及びカヘキシーのような望ましくない二次作用が生じる。限定された研究では、機能を阻害するＩＬ－６又はＩＬ－６Ｒα抗体がある程度効力を有する［Ｋｌｅｉｎ等，Ｂｌｏｏｄ　７８：１１９８－１２０４（１９９１）；Ｓｕｚｕｋｉ等，Ｅｕｒ．Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．２２：１９８９－１９９３（１９９２）］。従って、本明細書に記載するようなＩＬ－６アンタゴニストは、二次作用及び腫瘍増殖阻害の両方に有益であろう。

３）ＩＬ－６は、恐らくは脂肪組織のリポタンパク質リパーゼ活性を抑制することによって［Ｇｒｅｅｎｂｅｒｇ等，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓｅａｒｃｈ　５２：４１１３－４１１６（１９９２）］、エイズや癌に関連するカヘキシーを生ずる腫瘍壊死因子（ＴＮＦ）のメディエーターとなり得る［Ｓｔｒａｓｓｍａｎｎ等，Ｊ．Ｃｌｉｎ．Ｉｎｖｅｓｔ．８９：１６８１－１６８４（１９９２）］。従って、本明細書に記載のアンタゴニストはこのような患者でカヘキシーを緩和又は抑制するのに有用であろう。

これらの又は他のＣＮＴＦ族関連疾病又は障害の治療に有用な有効用量は当業者に公知の方法を用いて決定され得る［例えばＦｉｎｇｌ等，Ｔｈｅ Ｐｈａｒｍａｃｏｌｏｇｉｃａｌ Ｂａｓｉｓ ｏｆ Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓ，Ｇｏｏｄｍａｎ及びＧｉｌｍａｎ編，Ｍａｃｍｉｌｌａｎ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏ．，Ｎｅｗ Ｙｏｒｋ，ｐｐ．１－４６（１９７５）を参照されたい］。本発明で使用する医薬組成物は、薬理学的に許容可能な液体、固体又は半固体のキャリヤー中に前述のアンタゴニストを含み、該アンタゴニストがキャリヤー又は標的分子（例えば抗体、ホルモン、成長因子等）に結合し及び／又はｉｎ ｖｉｖｏ投与される前にリポソーム、マイクロカプセル及び徐放製剤（アンタゴニスト発現細胞を含む）内に取り込まれる。例えば、医薬組成物は滅菌水、食塩水、リン酸緩衝液又はデキストロース溶液のような水溶液中に１種以上のアンタゴニストを含み得る。あるいは、活性剤を固体（例えばろう）又は半固体（例えばゼラチン状）処方物中に含ませて、上記治療を必要とする患者に移植してもよい。投与経路は静脈内、鞘内、皮下、関連組織内への注射、動脈内、鼻腔内、経口又は移植装置利用を非制限的に含む当業界で公知の任意の投与方法であり得る。

投与によって本発明の活性剤は全身に又は局限された部位に分散し得る。例えば神経系の遠位領域に関連するある症状では、薬剤の静脈内又は鞘内投与が所望され得る。状況によっては、活性剤を含むインプラントを障害区域内又はその付近に置くことができる。適切なインプラントは非制限的ではあるが、ジェルフォーム、ろう又は微粒子ベースのインプラントを含む。

実施例１：ＣＮＴＦはＧＰ１３０との結合に対してＩＬ－６と競合する

材料及び方法

材料　ＩＬ－６に応答するＰＣ１２細胞のクローン（ＰＣ１２Ｄ）をＤＮＡＸから入手した。ラットＣＮＴＦを文献に記載の方法［Ｍａｓｉａｋｏｗｓｋｉ等，Ｊ．Ｎｅｕｒｏｃｈｅｍ．５７：１００３－１００１２（１９９１）］で製造した。ＩＬ－６及びｓＩＬ－６ＲはＲ＆Ｄ Ｓｙｓｔｅｍｓから購入した。文献に記載の方法（Ｓｔａｈｌ等，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：７６２８－７６３１（１９９３））によって、ｇｐ１３０のＣ末端付近の領域に由来するペプチド（配列：ＣＧＴＥＧＱＶＥＲＦＥＴＶＧＭＥ）［配列番号２］に対する抗血清をウサギで産生した。抗ホスホチロシンモノクローナル４Ｇ１０はＵＢＩから購入し、ＥＣＬ用試薬はＡｍｅｒｓｈａｍから購入した。

シグナル変換アッセイ　ＰＣ１２Ｄのプレート（１０ｃｍ）を無血清培地（ＲＰＭＩ　１６４０＋グルタミン）中に１時間放置し、次いでラットＣＮＴＦを規定濃度で添加するか又は添加せずにＩＬ－６（５０ｎｇ／ｍＬ）＋ｓＩＬ－６Ｒ（１μｇ／ｍＬ）と共に３７℃で５分間インキュベートした。次いで、試料を前述したような抗ｇｐ－１３０免疫沈殿、ＳＤＳ　ＰＡＧＥ及び抗ホスホチロシンイムノブロッティングに付した（Ｓｔａｈｌ等，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：７６２８－７６３１（１９９３））。

結果

ＬＩＦＲβではなく、ＩＬ－６Ｒα，ｇｐ１３０及びＣＮＴＦＲαを発現するＰＣ１２細胞系（ＰＣ１２Ｄと称する）を用いて、ＣＮＴＦが有するＩＬ－６応答阻害能力を調べた。ＬＩＦＲβはＣＮＴＦシグナル変換に必要な成分なので、予測通り、これらの細胞はＣＮＴＦではなく、ＩＬ－６に応答する（図２）［Ｄａｖｉｓ等，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２６０：５９－６３（１９９３）］。他の細胞系の結果によれば［Ｉｐ等，Ｃｅｌｌ ６９：１１２１－１１３２（１９９２）］、ＰＣ１２Ｄ細胞は２ｎＭ ＩＬ－６に応答してｇｐ１３０（及びＣＬＩＰと称する他の種々のタンパク質）のチロシンリン酸化を生ずる（図２）。他の系でも報告されているように、組換え可溶性１Ｌ－６Ｒα（ｓＩＬ－６Ｒα）を加えると、ｇｐ１３０チロシンリン酸化のレベルが高まる［Ｔａｇａ等，Ｃｅｌｌ ５８：５７３－５８１（１９８９）］。しかしながら、２ｎＭ ＣＮＴＦをＩＬ－６と同時に添加すると、ｇｐ１３０のチロシンリン酸化が大幅に減少する。ＣＮＴＦ、ＩＬ－６及びｓＩＬ－６Ｒαの存在下では僅かなｇｐ１３０リン酸化応答が残存するが、ＣＮＴＦ濃度が４倍に増して８ｎＭになると、この応答は除去される。従って、ＬＩＦＲβではなくＣＮＴＦＲαを含むＩＬ－６応答性細胞では、ＣＮＴＦはＩＬ－６作用のかなり強力なアン

タゴニストである。

実施例２：ＣＮＴＦのＣＮＴＦＲα：βとの結合

材料及び方法

ＣＮＴＦ結合のスキャッチャード分析　文献に記載の方法［Ｓｔａｈｌ等，ＪＢＣ　２６８：７６２８－７６３１（１９９３）］で^{125}Ｉ－ＣＮＴＦを製造して精製した。２０ｐＭから１０ｎＭの範囲の^{125}Ｉ－ＣＮＴＦ濃度を用いて、ＰＣ１２細胞で飽和結合研究を実施した。単層細胞上で結合を直接実施した。ウェルから培地を除去し、細胞を、リン酸緩衝食塩水（ＰＢＳ；ｐＨ７．４）、０．１ｍＭのバシトラシン、１ｍＭのＰＭＳＦ、１μｇ／ｍｌのロイペプチン及び１ｍｇ／ｍｌのＢＳＡからなるアッセイ緩衝液で１回洗浄した。^{125}Ｉ－ＣＮＴＦ中で細胞を室温で２時間インキュベートし、次いでアッセイ緩衝液で２度素早く洗浄した。細胞を、１％ＳＤＳを含むＰＢＳで溶解し、９０～９５％の効率でＰａｃｋａｒｄ　γカウンターでカウントした。非特異結合は１００倍過剰の非標識ＣＮＴＦの存在によって規定された。特異結合は７０％～９５％であった。

結果

ＰＣ１２Ｄ細胞上でのヨウ素化ＣＮＴＦ結合のスキャッチャード分析から、ＣＮＴＦのＣＮＴＦＲα：β１との結合の平衡定数を推定した（図３）。データは９ｐＭ及び３．４ｎＭの解離定数を有する２部位適応（ｓｉｔｅ　ｆｉｔｏ）と一致する。低親和性部位はＣＮＴＦとＣＮＴＦＲαとの相互作用に対応し、３ｎＭ付近にＫｄを有する［Ｐａｎａｙｏｔａｔｏｓ等，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６８：１９０００－１９００３（１９９３）］。高親和性錯体は、ＣＮＴＦ、ＣＮＴＦＲα及びｇｐ１３０を含む中間体として解釈される。ＣＮＴＦＲα、ｇｐ１３０及びＬＩＦＲβを含み、従ってＣＮＴＦに応答して活発なチロシンリン酸化を生ずるユーイング肉腫細胞系（ＥＷ－１）は、１ｎＭ及び１０ｐＭの解離定数を有する非常に類似した２部位適応を示す（Ｗｏｎｇ等、非公開データ）。従って、ＣＮＴＦは、ＣＮＴＦＲαやｇｐ１３０の他にＬＩＦＲβを含んでいる錯体と結合するので、ＣＮＴＦＲαやｇｐ１３０だけを含む錯体とも同様の高い親和性でもって結合することは明白であり、かくして本明細書に記載のｓＲα：βアンタゴニストの生成の可能性は実証される。

配列表

配列番号：１

配列の長さ：６

配列の型：アミノ酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

配列

His His His His His His

1 5

配列番号：２

配列の長さ：１６

配列の型：アミノ酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：ペプチド

配列

Cys Gly Thr Glu Gly Gln Val Glu Arg Phe Glu Thr

1 5 10 15

Val Gly Met Glu

【図１】

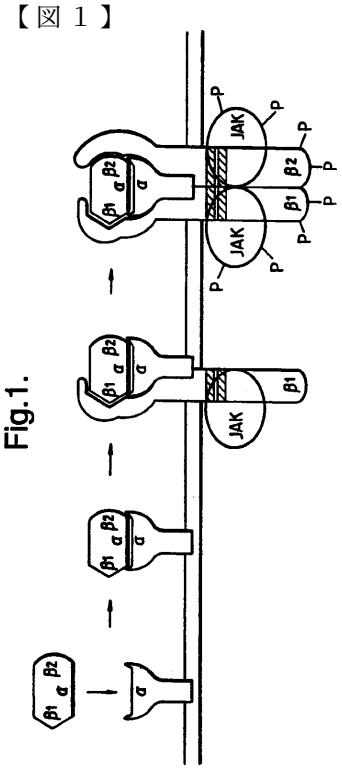


Fig.1.

【図２】

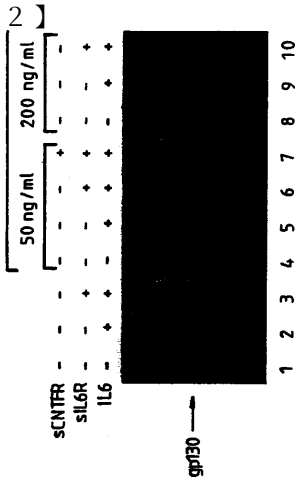
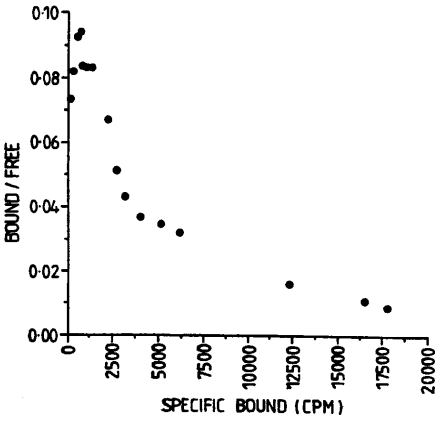


Fig.2.

【図３】

Fig.3.



フロントページの続き

(72)発明者 スタール，ネイル
アメリカ合衆国、ニユー・ヨーク・１０５１２、カーメル、ケント・シヨア・ドライブ、アール・デイー・１０
(72)発明者 エコノミデス，アリス
アメリカ合衆国、ニユー・ヨーク・１００２５、ニユー・ヨーク、ウエスト・ナインテイ・シツクスス・ストリート・１５０、アパートメント・１１・イー
(72)発明者 ヤンコポーラス，ジヨージ・デイー
アメリカ合衆国、ニユー・ヨーク・１０５９８、ヨークタウン・ハイツ、バプチスト・チヤーチ・ロード・１５１９

審査官 斎藤 真由美

(56)参考文献 特表平０６－５０７０６２（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９３／０１０１５１（WO，Ａ１）
Science，Vol.260，1993，pp1805-1808

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
C07K 1/00 - 19/00
C12N 15/00 - 90
A61K 31/00 - 48/00
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
PubMed