

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/24

A61K 38/20 C07K 14/54

C12N 1/21



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 96180247.2

[45] 授权公告日 2003 年 12 月 17 日

[11] 授权公告号 CN 1131309C

[22] 申请日 1996.4.9 [21] 申请号 96180247.2

[86] 国际申请 PCT/EP96/01506 1996.4.9

[87] 国际公布 WO97/38103 英 1997.10.16

[85] 进入国家阶段日期 1998.10.9

[71] 专利权人 应用研究系统 ARS 股份公司

地址 荷属安的列斯群岛库拉索市

[72] 发明人 马克·埃勒斯 斯特凡·罗丝 - 约翰

约阿希姆·格罗金格

[56] 参考文献

JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 270
NO14 1995 - 01 - 01 M. Ehlers et al" Combining two
muations of human interleukin - 6 that affect gp130 activa-
tion results i

JOURNALOFBIOLOGICALCHEMISTRYVOL. 270NO14

1995 - 01 - 01 M. Ehlers, et, al" Combining, two, muaa-
tions, of, human, interleukin - 6, that, affect, gp130, activa-
tion, results, i

审查员 李 博

[74] 专利代理机构 北京三幸商标专利事务所

代理人 刘激扬

权利要求书 1 页 说明书 22 页 附图 12 页

[54] 发明名称 白细胞介素 - 6 突变蛋白

[57] 摘要

本发明涉及一种新的 IL - 6 突变蛋白, 编码该突变蛋白的 DNA 序列、其在治疗中的用途以及包含该突变蛋白的药物组合物。这种新的 IL - 6 突变蛋白是一种潜在的 IL - 6 拮抗剂并且它可以有利地在治疗疾病中用作药物, 在所说的疾病中 IL - 6 具有病理遗传作用, 这些疾病如浆细胞瘤/骨髓瘤、骨质疏松症和肿瘤以及自身免疫疾病。

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

1. 一种包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的多肽,就天然存在的人 IL-6 的氨基酸序列而言,所说的多肽包括下列突变:第 54 位的脯氨酸、第 159 位的谷氨酸、第 162 位的脯氨酸、第 170 位的亮氨酸以及第 176 位的精氨酸。

2. 一种 DNA 分子,该 DNA 分子包括编码权利要求 1 的多肽的 DNA 序列以及编码与权利要求 1 的多肽具有相同的 IL-6 拮抗活性的多肽且由遗传编码的简并性或点突变生成的变体。

3. 一种包括权利要求 2 的 DNA 序列的载体。

4. 一种用权利要求 2 的 DNA 序列或权利要求 3 的载体转化的宿主细胞。

5. 一种用于生产权利要求 1 的多肽的方法,该方法包括:

(1)在合适的培养基中培养权利要求 4 的宿主细胞;以及

(2)从所说的培养基中分离所说的多肽。

6. 根据权利要求 1 的多肽在制备药物中的用途,所述药物用于治疗浆细胞瘤、骨髓瘤或骨质疏松症。

7. 一种药物组合物,该组合物包括根据权利要求 1 的多肽以及一种或多种药物可接受的载体和/或赋形剂。

白细胞介素-6 突变蛋白

发明领域

本发明涉及一种新的白细胞介素(IL)-6 突变蛋白, 编码该突变蛋白的 DNA 序列, 其在药理学中的应用以及包含该突变蛋白的药物组合物。

发明背景

在受伤或感染的时候通过不同类型的细胞将 IL-6 释放入血浆中。IL-6 涉及例如免疫防御、血细胞生成、巨核细胞成熟、血小板产生以及急性期反应(1)这样的活性谱。

除在宿主防御中起到重要的作用外, IL-6 还与多种疾病的病理有关, 例如浆细胞瘤、骨髓瘤、骨质疏松症和肿瘤以及自身免疫疾病(1)。

位于靶细胞上的 IL-6 受体复合物由两个不同的亚单位、即 80-kDa 的特异的配体结合亚单位(IL-6Ra)与 130-kDa 的信号转导蛋白(gp130)(2-4)组成。IL-6 结合到 IL-6Ra 上, IL-6/ IL-6Ra 的复合物与 gp130 的二聚体有关, 从而引发 IL-6 信号。IL-6 自身对 gp130 不具有能测量到的亲和力(5,6)。

白介素-6 的特征在于 N-末端具有不均一性的蛋白质。已经报道(7)它有 184 种氨基酸(在本专利申请中将遵循该氨基酸编号)。二级结构预测和制作蛋白质模型表明 IL-6 为造血细胞因子家族的一个成员, 其特点是具有四个反平行的 α -螺旋(A,B,C 和 D)(8,9)。LIF(白血病抑制因子)、CNTF(睫状神经营养因子)、IL-11、CT-1(心脏营养因子(cardiotrophin)-1)与 OSM(制瘤素 M)也

属于这一家族。这些物质在其受体复合物中都使用 gp130 蛋白，而这也解释它们具有重叠的生物活性(1,10,11)。

IL-6 的缺失研究表明对该分子的生物活性而言，N 一末端的 28 种氨基酸残基是不重要的。去除多于 28 种氨基酸将使上述蛋白质失活(12)。进一步的研究预示 C 一末端和 A 一 B 环的末端/B 一螺旋的起点(区域 2c，残基 G77-E95)涉及与 IL-6R α 的相互作用(9,13-16)。通过最近出版的人类 IL-6 模式(9)证实了上述结果，其中这两个区域是相邻的。

目前鉴定了 IL-6 与 gp130 的两个相互作用位点。

i. 用中和 mAbs 的方法对 IL-6 蛋白进行的抗原决定基图形提供了残基 Q152-T162(D 一螺旋的起点)与 gp130 的相互作用有关的证据(17,18)。对嵌合的人类/小鼠 IL-6 蛋白的分析表明在 IL-6 的 A 一 B 环的起点处存在一个抗原决定基，该抗原决定基与接触和激活 gp130 有关(9,19)。最近通过用实验表明亮氨酸 57 与该相互作用有关而证实了这一结果(20)。该区域紧靠着螺旋 D 的起点，从而导致人们设想这两个区域一起形成了与一个 gp130 的共同相互作用的位点(9,19,21)。

ii. 所确定的与 gp130 的第二个相互作用位点类似于 GH(生长激素)/GHR₂ 复合物的有关位点，其结构通过 X 一射线分析来确定(22)。据推测对与第二 GHR 的相互作用来说 GH 的重要部分同对与一个 gp130 的相互作用来说 IL-6 蛋白中的重要部分是一样的(23,24)。实际上，A 一螺旋(Y31D/G35F)中两种氨基酸的取代以及 C 一螺旋(S118R/V121D)中两种氨基酸的取代也造成 IL-6 突变蛋白对 IL-6R α 的亲和力基本正常，但却没有生物活性。这四种氨基酸对与第二 gp130 蛋白的相互作用似乎很重要(24,25)。

由于以前所讨论的 IL-6 与一些疾病的病理有关，因此开发 IL-6 活性的抑制剂便成为积极研究的主题。出于这一目的已经采用了不同的方法，其中包括使用抗 IL-6、gp130 或 gp80 的抗体；使用可

溶的 gp130；或者使用针对 IL-6 的突变蛋白或 IL-6 受体。

申请人已经研究了合成新的 IL-6 突变蛋白的可能性，这种突变蛋白可以起到 IL-6 受体拮抗剂的作用。出于这一目的，所遵循的一种科学方法为合成仍保留了结合 IL-6R α 的能力、但却丧失了募集 gp130 的能力的突变蛋白。因此，最佳的分子应作为一种不表现出 IL-6 活性、但比 IL-6 表现出更高的 IL-6R α 结合能力，并且就 IL-6 而言含有尽可能少的突变以减少抗原性的风险的分子。

发明的内容

申请人现已发现通过结合在第 54 位的点突变和两个突变 F170L/S176R(这两个突变增加了对 IL-6R α 的亲合力)以及两个突变 Q159E/T162P(这两个突变降低了依赖性 IL-6R α 与 gp130 的相互作用)得到了人类 IL-6 突变蛋白，该突变蛋白保留了与受体的结合能力、但却不能激活 gp130。具体地讲，本发明的主要目的是如图 2 和 SEQ ID NO:1 中所示的氨基酸序列及其片段的人类 IL-6 突变蛋白。该分子对人类依赖性 IL-6 的骨髓瘤细胞系 XG-1 显示出有效的 IL-6 拮抗剂及上述所有的优点。

本发明的另一个目的是 DNA 分子包括编码 SEQ ID NO:1 的多肽的 DNA 序列以及编码与 SEQ ID NO:1 具有相同活性的多肽，且由遗传编码的简并性或点突变生成的其变体的 DNA 分子。

本发明的再一个目的是含有本发明的核苷酸序列的质粒载体。

在另一方面，本发明提供了蛋白质作为药物的用途。具体地讲，涉及本发明的蛋白质在制备用于治疗疾病的药物中的用途，在疾病中 IL-6 具有病理遗传作用，这些疾病如浆细胞瘤、骨髓瘤、骨质疏松症和肿瘤以及自身免疫疾病。

药物优选以包括本发明的蛋白质以及一种或多种药物可接受的载体和/或赋形剂的药物组合物的形式存在。这种药物组合物也

构成了本发明的另一方面。

一种用于制备本发明的突变蛋白的方法,为使用在人们希望发生突变的碱基处含有失配的合成的寡核苷酸作引物的 PCR 技术。

在真核细胞(例如酵母、昆虫或哺乳动物细胞)或原核细胞中使用合适的表达载体都可以实现如本文所述的任意一种本发明的重组蛋白的表达。可以采用现有技术中已知的任意方法。

例如通过现有技术中众所周知的技术把编码本发明多肽的 DNA 分子插入构建得合适的表达载体中(参见 Sambrook 等人, 1989)。通过均聚物谱尾或限制性连接把双链 cDNA 连接到质粒载体上, 其中的限制性连接涉及使用合成的 DNA 接头或平头连接技术: 使用 DNA 连接酶连接 DNA 分子并用碱性磷酸酶处理来避免不希望有的连接。

为了能够表达所需的蛋白质, 表达载体还应当包括特异的核苷酸序列, 该序列含有连接到编码所需蛋白质的 DNA 上的转录和翻译的调节信息, 通过这种方式以便使基因表达并生产蛋白质。首先为了转录基因, 位于前面的必须是可由 RNA 聚合酶识别的启动子, 其中聚合酶可以结合到启动子上从而引发转录过程。可以使用的上述启动子有许多种, 它们所发挥的效率有所不同(强和弱启动子)。

对真核宿主来说, 取决于宿主的性质可以使用不同的转录和翻译的调节序列。这些序列可以来源于病毒, 如腺病毒、牛乳头瘤病毒、猴病毒或类似的病毒, 其中调节信号与能够高水平表达的具体基因有关。启动子的实例有疱疹病毒的 TK 启动子、SV40 早期启动子、酵母 gal4 基因启动子等。可以选出便于阻抑和激活的转录起始调节信号, 从而可以调制基因的表达。

把包括编码本发明多肽的核苷酸序列的 DNA 分子插入载体中, 其中的 DNA 分子具有可操作连接的转录和翻译的调节信号, 而这可以将所需的基因序列整合到宿主细胞中。同样通过引入一个

或多个标记可以选出已由所引入的 DNA 稳定转化的细胞，其中的标记为选择含有表达载体的宿主细胞创造了条件。标记也可以给营养缺陷型的宿主提供光营养、对生物杀伤剂的抗性，所说的生物杀伤剂例如有抗生素或重金属如铜或类似物。选择性标记基因或者可以直接连接到将要进行表达的 DNA 基因序列上，或者可以通过共转染而引入同一细胞。对于最佳地合成本发明的蛋白质来说还需要其它要素。

在选择具体的质粒或病毒载体中重要的因素包括：从不含载体的受体细胞中识别和选择含有载体的受体细胞的难易程度；在具体的宿主中所需的载体的拷贝数；以及是否希望在不同种的宿主细胞之间能够“穿梭”载体。

一旦已经制备出含有构建体的用于表达的载体或 DNA 序列，就可以通过下列多种合适方式的任一种方式将所说的 DNA 构建体引入合适的宿主细胞中，其中所说的合适方式有：转化、转染、接合、原生质体融合、电穿孔、磷酸钙一沉淀、直接微注射等。

宿主细胞可以是原核的或是真核的。其中优选真核宿主，例如哺乳动物细胞(如人类、猴、小鼠和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)，这是因为它们对蛋白质分子进行了包括恰当的折叠或在适当的位点处进行糖基化的翻译后修饰。此外，酵母细胞也可以进行包括糖基化在内的翻译后的肽的修饰。现有许多的利用强启动子序列和高拷贝数的质粒的重组 DNA 策略，利用这些策略可以在酵母中生产所需的蛋白质。酵母可以识别在克隆的哺乳动物基因产物上的前导序列，并且分泌含有前导序列的肽(即前肽)。

在引入载体后，在选择含有载体的细胞生长的选择培养基上培养宿主细胞。克隆的基因序列的表达造成了所需蛋白质的生产。

通过任意一种已知的方法进行重组蛋白的纯化以实现纯化的目的，即包括提取、沉淀、层析、电泳或类似方法的任意的常规步骤。可用于更好地纯化本发明蛋白质的进一步的纯化步骤为使用单

克隆抗体进行的亲和层析,其中的单克隆抗体可以结合靶蛋白并且被生产并固定在柱中所含的凝胶基质上。使含有重组蛋白的不纯的配制品通过该柱。通过特异的抗体把蛋白质结合到柱上,而杂质则通过该柱。在洗涤后,通过 pH 值或离子强度的改变从凝胶中洗脱出蛋白质。

现在将通过以下实施例来描述本发明,而这不应当以任何方式构成对本发明的限制。实施例将参照下文所解释的附图。

附图的简要描述

图 1 为人类 IL-6 蛋白的点突变体。如有阴影的方框所示的(A)代表具有预测的四个 α -螺旋的人类 IL-6 蛋白。数字表示预测的 α -螺旋的第一个和最后一个残基。该图显示出人类(顶部)和鼠(底部)的 IL-6 的区域 2c 和 2a 的氨基酸序列,其中区域 2a 又细分为区域 2a1 和 2a2。该图显示了在区域 2a 中产生的点突变。(B)列出了区域 2a 中的 IL-6 的物种。(C)带状结构代表人类 IL-6 的模式。F78(底部)代表对 IL-6Ra 的结合来说很重要的部位, K54(顶部)代表对 IL-6Ra 的依赖性与 gp130 的相互作用来说很重要的部位。N-末端对应于人类 IL-6 的第 17 个残基(Ehlers 等人 1994)。

图 2 为本发明的人类 IL-6 突变蛋白的核苷酸序列。相对于人类 IL-6 而言,它在第 54,159,162,170,176 位上有五个点突变。本文以黑体报道了上述位置。

图 3 为人类 IL-6 的 K54 点突变体的结合和生物活性。(A)代表 IL-6 突变蛋白与可溶的人类 IL-6Ra 的结合。该图显示出两次实验的平均值。(B)代表鼠 B9 细胞的增殖,以及(C)代表响应 IL-6 突变体的人类 XG-1 细胞。该图显示出三次实验的一次代表值。(D)通过 IL-6 突变蛋白诱导亲血色蛋白在人肝癌细胞中的表达,将用于 50%的亲血色蛋白表达所需的人类 IL-6 的量设为 100%。该图显示出两次实验的平均值。

图 4 是与 EP-LR 结合的 K54 的点突变的结合和生物活性。(A) 代表 IL-6 突变蛋白与可溶的人类 IL-6Ra 的结合。该图显示出两次实验的平均值。(B) 代表鼠 B9 细胞的增殖, 以及(C)代表响应 IL-6 突变体的人类 XG-1 细胞。该图显示出三次实验的一次代表值。(D) 通过 IL-6 突变蛋白诱导亲血色蛋白在人肝癌细胞中的表达。该图显示出在有 1 $\mu\text{g/ml}$ 突变体存在的情况下亲血色蛋白的表达量。该图显示出两次实验的平均值。

图 5 是与 EP-LR 结合的 K54 的点突变对人类 IL-6 诱导的 XG-1 细胞增殖的拮抗作用。在有 100 pg/ml 的人类 IL-6 存在下将所示浓度的 IL-6 突变体加入 XG-1 细胞中并测量其增殖。该图显示出四次实验的平均值。

实施例

材料与方法

化学药品

限制酶 *AccI*, *EcoNI*, *HindIII*, *NcoI*, *NheI* 和 *XbaI* 是从 AGS (Heidelberg, 德国) 获得的, 多聚核苷酸激酶、牛小肠磷酸酶与 T4 DNA 连接酶来自 Boehringer Mannheim (Mannheim, 德国)。限制酶 *BspEI* 和 *Vent* DNA 聚合酶是从 NEN 生物实验室 (Schwalbach, 德国) 购买的, 细胞培养基则来自 Gibco (Eggenstein, 德国)。Bolton-Hunter 试剂 (74 TBq/mmol) 和反式 [^{35}S] 标记是从 Amersham International (Amersham, 英国) 获得的。

寡核苷酸是从 Pharmacia (Freiburg, 德国) 获得的。

山羊和兔多克隆血清抗一人亲血色蛋白是从 Sigma (Deisenhofen, 德国) 购买的, 碱性磷酸酶缀合的驴多克隆血清抗一兔 IgG 来自 Pierce (Rockford, 美国)。

人类 IL-6 cDNA 为 Drs. T. Hirano 与 T. Kishimoto (Osaka, 日本) 的赠品。

Schopfer 等人(26)描述了细菌表达质粒 pRSET 5d 和宿主细菌 BL21(DE3)。在由翻译起始密码子取代信号序列后, 利用限制位点 NcoI 和 HindIII 将编码人类 IL-6 的 cDNA 克隆进载体 pRSET 5d 中(27)。

人骨髓瘤细胞系 XG-1 是由 B. Klein 博士(Nantes, 法国)提供的。

在大肠杆菌中表达可溶的 IL-6Ra 蛋白, 进行复性和纯化(28)。

通过把可溶的 IL-6Ra 蛋白胞外域的一部分注射到兔子体内来制备抗 IL-6Ra 的多克隆单特异性抗血清。

构建表达载体

为了把在第 54 位氨基酸的点突变引入人类 IL-6 中(pRSET 5d-huIL-6-K54X), 将四个寡核苷酸进行融合并连接到经 EcoNI-NheI 消化的 pRSET 5d 一突变体 2a 上(9)。所用的寡核苷酸为:

5' AAC ATG TGT GAA AGC AGC <u>GAT</u> GAG GCG 3'	有义 (K54D)(SEQ ID NO: 2)
5' CTA GCG CCT <u>CAT</u> CGC TGC TTT CAC AC 3'	反义 (K54D)(SEQ ID NO: 3)
5' AAC ATG TGT GAA AGC AGC <u>GAA</u> GAG GCG 3'	有义 (K54E)(SEQ ID NO: 4)
5' CTA GCG CCT <u>CTT</u> CGC TGC TTT CAC AC 3'	反义 (K54E)(SEQ ID NO: 5)
5' AAC ATG TGT GAA AGC AGC <u>TTT</u> GAG GCG 3'	有义 (K54F)(SEQ ID NO: 6)
5' CTA GCG CCT <u>CAA</u> AGC TGC TTT CAC AC 3'	反义 (K54F)(SEQ ID NO: 7)
5' AAC ATG TGT GAA AGC AGC <u>AAT</u> GAG GCG 3'	有义 (K54N)(SEQ ID NO: 8)
5' CTA GCG CCT <u>CAT</u> TGC TGC TTT CAC AC 3'	反义 (K54N)(SEQ ID NO: 9)
5' AAC ATG TGT GAA AGC AGC <u>CCC</u> GAG GCG 3'	有义 (K54P)(SEQ ID NO: 10)
5' CTA GCG CCT <u>CGG</u> GGC TGC TTT CAC AC 3'	反义 (K54P)(SEQ ID NO: 11)
5' GAA AGG AGA CAT GTA ACA AGA GT 3'	有义 (SEQ ID NO: 12)
5' ATG TTA CTC TTG TTA CAT GTC TCC TTT 3'	反义 (SEQ ID NO: 13)

为了结合在第 54 位氨基酸的点突变与两个点突变 F170L/

S176R(简短命名为 LR)和两个点突变 Q159E/T162P(简短命名为 EP), 通过把来自 pRSET-5d-huIL-6-K54X的 NcoI-XbaI cDNA 片段连接到经 NcoI-XbaI 消化的载体 pRSET 6d-huIL-6-Q159E/T162P-2a2-F170L/S176R(简短命名为 pRSET 6d-huIL-6-EP-2a2-LR)中来构建载体 pRSET 6d-huIL-6-EP-K54X-LR(19)。通过限制片段分析和 DNA 测序来证实所有构建体的完整性(29)。

制备蛋白质

用合适的 pRSET 表达载体转化 BL21(DE3)细菌。如所述(27,30,31)来实现基因的表达和来自内含体的溶解的蛋白质的重折叠。将重折叠的蛋白质纯化至均一性>90%。通过 12.5%SDS-PAGE 和银染色法来检测重组蛋白的纯度。

将 IL-6 结合到可溶的人类 IL-6Ra 上

在含有 0.02%TWEEN 20/0.2%BSA 的 PBS 中连续稀释纯化的 IL-6 突变蛋白并将其加入到 1 ng 的人类 ^{125}I -IL-6(60,000-90,000 cpm/ng)和 1.7ng 的在大肠杆菌中表达的可溶的人类 IL-6Ra(28)至最终体积为 500 μl 。在 4 °C 下培养过夜后, 使用 IL-6Ra 抗血清和蛋白 A Sepharose 免疫沉淀 IL-6/sIL-6Ra-复合物, 并通过 g-计数测定放射性活度。

生物学分析

为了分析鼠 B9 和人类 XG-1 的增殖, 将 IL-6 突变蛋白连续稀释至附图所示的浓度。如所述(32,33)进行分析。一个 B9 单位大约对应于每毫升 1 pg 的人类 IL-6, 而这导致 B9 细胞最大值一半的增殖。在用大约 50 pg/ml 的人类 IL-6 刺激后, 得到了人类 XG-1 细胞最大值一半的增殖。为了分析急性期蛋白的分泌, 在含有 10% 胎牛血清的 Dulbecco 改进的 Eagle 培养基(DMEM)中培养人肝癌细胞(Hep3B), 将上述细胞铺在 96 一孔的细胞培养平板上并使其达到汇合。用 PBS 洗涤细胞, 在不含胎牛血清的 DMEM 中使细胞饥饿 1 小时, 随后在 100 ml 不含血清的 DMEM 中用含量增加的 IL-6

突变蛋白处理上述细胞 20 小时。通过酶联免疫吸附测定(34)检测在培养基中分泌的亲血色蛋白的量。

结果

IL-6 的氨基酸 K54 涉及 IL-6Ra 的依赖性与 gp130 的相互作用通过对人/鼠 IL-6 嵌合蛋白的研究已经表明 IL-6 蛋白的区域 2a2(残基 50-55)对 IL-6Ra 的依赖性与 gp130 的相互作用来说是很重要的(19)(图 1A)。用相应的鼠的氨基酸更换这些残基会造成减少了与 gp130 的结合并使得对人类 XG-1 细胞的生物活性降低 30 倍。对 10 个 IL-6 物种的比较揭示出在 2a2 区域内, 在 8 个物种中带正电的 K54 是保守的, 但在鼠和大鼠的序列中却变为带负电的天冬氨酸(35,36)(图 1B)。因此, 我们把 K54(图 1C)换成图 1A 所示的氨基酸。克隆步骤也产生了 IL-6 的三个双重点突变: C44F/K54E、C50F/K54N 与 S52R/K54N, 对这些点突变也进行了分析(图 1A)。

为了分析 K54 点突变对 IL-6Ra 的依赖性与 gp130 的相互作用的影响, 通过以点突变体的过剩量置换出结合到可溶形式的 IL-6Ra 蛋白上的人类 ^{125}I -IL-6, 我们首先分析了与 IL-6Ra 的结合。如图 3A 所示, 当以 10—20 倍的摩尔过剩量使用未标记的人类野生型 IL-6 时, 这种人类野生型 IL-6 置换出 50% 的结合的人类 ^{125}I -IL-6。针对与 IL-6Ra 的亲合力而言, 点突变体 K54P 和双重突变体 S52R/K54N 显示出比人类 IL-6 高 10 倍的亲合力, 而突变体 K54E 具有比 huIL-6 低 3 倍的亲合力。其它进行分析的突变体显示出与人类 IL-6 具有类似的亲合力。此外, 所说的突变体刺激鼠的 IL-6 的依赖性 B9 细胞增殖到与人类 IL-6 类似的程度, 而这表明其结构是完整的(图 3B)。

IL-6 突变蛋白对人骨髓瘤 XG-1 细胞和人肝癌细胞具有的生物活性的形式为: K54P>S52R/K54N>huIL-6=K54F>K54D>K54E>C50F/

K54N>C44F/K54E。因此，突变体 K54P 和 S52R/K54N 对 IL-6Ra 具有最大的亲和力，这也表明它们对人类细胞具有最高的生物活性。带正电的赖氨酸 54 与相应带负电的天冬氨酸的更换仅仅造成对人类细胞的生物活性轻微的降低，而其与谷氨酸的更换却造成生物活性的大幅度降低(10 倍)。

设计新的人类 IL-6 受体拮抗剂

最近，我们已经表明把鼠的残基 50-55(区域 2a2)和两个点突变 F170L/S176R(简短地命名为 LR)，该突变提高了与 IL-6Ra 的亲和力，引入双重突变体 Q159E/T162P(简短地命名为 IL-6-EP)，该突变显示出与 gp130 的相互作用的降低，将产生检测不到对人类细胞具有生物活性的 IL-6 突变蛋白(19)。这种 IL-6 突变体(IL-6-EP-2a2-LR)对人类 IL-6Ra 的亲和力类似于人类 IL-6。就高度敏感的人类 IL-6 的依赖性人骨髓瘤细胞系 XG-1 而言，这种 IL-6 突变体是一种有效的 IL-6 受体拮抗剂。

我们把 K54 突变体引入突变体 IL-6-EP-LR 中。所得到的 IL-6 突变蛋白称作 IL-6-EP-K54X-LR，其中 X 表示所有的在第 54 位引入的突变(图 1A)。突变体 IL-6-EP-C44F/K54E-LR 和突变体 IL-6-EP-K54E-LR 显示出与人类 IL-6Ra 亲和力的下降，而所有其它的突变体都与人类 IL-6 具有的亲和力相同(图 4A)。对突变体 IL-6-EP-2a2-LR 和 IL-6-EP-S52R/K54N-LR 来说，鼠 B9 细胞的增殖显著减少。所有其它突变体的活性比人类 IL-6 低大约 5 — 10 倍(图 4B)。可是，对突变体 IL-6-EP-LR、IL-6-EP-K54F-LR 和 IL-6-EP-S52R/K54N-LR 来说，人类骨髓瘤 XG-1 细胞的增殖减少了大约 3 个数量级(图 4C)。所有其它的突变体都显示出检测不到生物活性。对人类 Hep3B 细胞而言，仅有突变体 IL-6-EP-LR 和 IL-6-EP-K54F-LR 显示出剩余的活性(图 4D)。

当把没有生物活性的突变体以增加的量加入到人类骨髓瘤细胞(XG-1)中时，其中的细胞由 100 pg/ml 的人 IL-6 进行刺激，观察

到对增殖的抑制作用。图 5 显示出突变体 IL-6-EP-2a2-LR 和 IL-6-EP-K54P-LR 的加入将导致在约 100 ng/ml 下对增殖 50% 的抑制作用，而所有其它突变体的效果约低 5—10 倍。

讨论

氨基酸 K54 为 gp130 结合抗原决定基的一部分

所有的以不同的氨基酸残基替换 K54 的 IL-6 突变蛋白都能有效地结合到人类 IL-6Ra 上。令人感兴趣的是，P54 和双重突变 S52R/K54N 的引入生成了与人类 IL-6Ra 具有更高亲和力的 IL-6 蛋白。由于包括残基 54 的 2a2 区域涉及与 gp130 的相互作用(19)，其最有可能为一个间接影响。我们推测 P54 或在第 52 位带电氨基酸精氨酸的存在引起螺旋 A 和螺旋 B 之间环的重新安置，从而改变了与 IL-6Ra 的相互作用直接有关的区域 2C 的位置。用在小鼠和大鼠中保守的精氨酸代替在 8 个物种中保守的赖氨酸 54 将引起生物活性轻微降低，而由谷氨酸代替将引起生物活性大量降低(10 倍)。由于谷氨酸携带了一个比天冬氨酸长出一个亚甲基的侧链，那么带电基团和人类 IL-6Ra 之间的距离就可能是至关重要的。从这些数据可以假设 K54 接触了人 gp130 的带负电的残基并且在人类 IL-6 中的第 54 位引入带负电的氨基酸将造成 gp130 与 IL-6/IL-6Ra 复合物之间识别作用的降低。半胱氨酸 44 或 50 的突变生成了生物活性只轻微降低的 IL-6 突变蛋白，这就证实了 Rock 等人(34)近来得到的结果，Rock 等人指出半胱氨酸 44 和 50 的取代不会生成失活的 IL-6 突变蛋白。

配体受体相互作用

现已解释了人类生长激素/生长激素受体复合物(GH/GHR₂)的结构(22)。已经广泛地对生长激素及其受体之间的相互作用位点进行了突变(38-40)并已评价了单个氨基酸残基对结合能所作的贡献(41)。由于生长激素受体复合物是迄今为止在原子水平了解的造血

细胞因子家族的唯一受体-配体对,因此它起到了该家族其它成员的范例的作用。对于生长激素受体复合物来说已经表明在配体和受体侧的相互作用的抗原决定基由大约 30 个氨基酸残基组成(41)。但这些氨基酸残基所作的贡献是不一样的。大部分的结合能是由两个疏水相互作用提供的。该结合核心周围包围着不太重要的接触残基,这些残基通常是亲水性的并且部分被水化、它们对结合能仅作出了三分之一的贡献。已经假定上述结合位点的确定也可以应用于其它的配体-受体的相互作用(41)。

但是人们认为 K54 是中央的 IL-6/gp130 相互作用区域的周围残基之一,因而它对结合能作出小范围的贡献。在拮抗的 IL-6 突变蛋白中 K54P 取代造成的相当强的作用是因为 AB 一环中结构的改变。

IL-6 受体拮抗剂

迄今为止已经鉴定出被认为是接触 gp130 的 IL-6 的两个主要区域:(i)2a2 区域(残基 50-55)和亮氨酸 57,它们由 IL-6 的螺旋 D 的顶部来补充,和(ii)由螺旋 A 和螺旋 C 的部分形成的抗原决定基(9,18-21,23,24)。IL-6 与 IL-6Ra 的结合需要 A-B 环的末端(残基 78)以及该蛋白质的 C-末端(9,13-16)。显而易见两个 gp130 分子是引发信号所必需的,并且非常可能在 IL-6 内的两个 gp130 相互作用位点的作用就是嵌入两个 gp130 蛋白。在两个 gp130 相互作用区域内的替换已使分子保留了其受体结合能力、但却不能引发信号。已经表明这样的分子可以用作 IL-6 受体拮抗剂(19,21,23,24)。同时改进 IL-6 突变蛋白的 IL-6Ra 的结合特性生成了所谓的超级拮抗剂(19,21,24),这一事实暗示着有可能以某种独立的形式来改变与不同受体亚单位的结合性能。

在本专利申请中提出的新的 IL-6 受体拮抗剂含有在 2a2 区域内单个的 K54P 的取代,并且它与最近制成的在 2a2 区域中有 5 个氨基酸更换的 IL-6 突变蛋白效果相同(19)。

令人感兴趣的是, K54P 突变蛋白显示出比人类 IL-6 更高的与 IL-6Ra 的结合能力, 而与 EP 和 LR 的结合突变体则表现出正常的与 IL-6Ra 的结合能力。

就细胞因子受体拮抗剂的治疗潜力而言, 显而易见氨基酸更换得越少、拮抗剂有抗原性的机会也越少。在这一方面, IL-6 突变蛋白 IL-6-EP-K54P-LR 是迄今为止可以利用的改进的 IL-6 受体拮抗剂。

参考文献

1. Akira, S 等人, 免疫学进展 54:1, 1993.
2. Yamasaki K. 等人, 科学 241:825, 1988.
3. Taga, T. 等人, 细胞 58:573, 1989.
4. Hibi, M 等人, 细胞 63:1149, 1990.
5. Zohlhofer, D. 等人 FEBS Lett. 306:219, 1992.
6. Murakami, M 等人, 科学 260:1808, 1993.
7. Hirano, T. 等人, 自然 324:73, 1986.
8. Bazan, J.F., 今日免疫学 11:350, 1990.
9. Ehlers, M., 免疫学杂志 153:1744, 1994.
10. Pennica, D. 等人, 美国科学院学报 92:1142, 1995.
11. Pennica, D. 等人, 生物化学杂志 270:10915, 1995.
12. Brakenhoff, J.P.J. 等人, 免疫学杂志 143:1175, 1989.
13. Kruttgen, A. 等人 FEBS Lett. 262:323, 1990.
14. Kruttgen, A., 等人 FEBS Lett. 273:95, 1990.
15. Lutticken, C. 等人 FEBS Lett. 282:265, 1991.
16. Leebeck, F.W.G 等人, 生物化学杂志 267:14832, 1992.
17. Brakenhoff, J.P.J, Serono Symp. Pub. Raven Press 83:33, 1992.
18. Brakenhoff, J.P.J., 生物化学杂志 269:86, 1994.
19. Ehlers, M. 等人, 生物化学杂志 270:8158, 1995.

20. De Hon, F.D. 等人 FEBS Lett. 369:187, 1995.
21. De Hon, F.D. 等人 J. Exp. Med. 180:2395, 1994.
22. De Vos, A.M. 等人, 科学 255:306, 1992.
23. Savino, R. 等人 EMBO J. 13:281, 1994.
24. Savino, R 等人 EMBO J. 13:5863, 1994.
25. Paonessa, G. 等人 EMBO J. 14:1942, 1995.
26. Schoepfer, R. 等人, 神经元 5:393, 1990.
27. Van Dam, M. 等人, 生物化学杂志 268:15285, 1992.
28. Stoyan, T., 欧洲生物化学杂志 216:239, 1993.
29. Sanger, F. 等人, 美国科学院学报 74:5463, 1977.
30. Studier, F.W. 等人 Meth. Enzymol. 185:60, 1990.
31. Arcone, R. 等人, 欧洲生物化学杂志 198:541, 1991.
32. Aarden, L.A 等人, 欧洲免疫学杂志 17:1411, 1987.
33. Zhang, X.-G. 等人, 血液 76:2599, 1990.
34. Salvati, A.L. 等人, 生物化学杂志 270:12242, 1995.
35. Van Snick, J. 等人, 欧洲免疫学杂志 18:193, 1988.
36. Northemann, W. 等人, 生物化学杂志 264:16072, 1989.
37. Rock, F.L. 等人, 生物化学 33:5146, 1994.
38. Cunningham, B.C. 等人, 科学 244:1081, 1989.
39. Cunningham, B.C. 等人, 分子生物学杂志 234:554, 1993.
40. Bass, S.H 等人, 美国科学院学报 88:4498, 1991.
41. Clackson T., 等人, 科学 267:383, 1995.

序 列 表

(1)一般信息:

(i)申请人:

(A)姓名: 应用研究系统 ARS HOLDING N.V.

(B)街道: 14 JOHN GORSIRAWEG

(C)城市: CURACAO

(E)国家: 荷兰 ANTILLES

(F)邮政编码(ZIP): 无

(ii)发明名称: IL-6 突变蛋白

(iii)序列数: 13

(iv)计算机可读形式:

(A)存储媒体类型: 软磁盘

(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, #1.30 版(欧洲专利局)

(2)SEQ ID NO:1 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 212 个氨基酸

(B)类型: 氨基酸

(C)链型:

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: 肽

(iii)假定: 无

(iv)反义: 无

(v)片段类型: N-末端

(ix)特点:

(A)名称/要点: 蛋白质

(B)定位: 1..184

(xi)序列描述: SEQ ID NO:1:

```

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu
      -25                -20                -15

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro
      -10                -5                1

Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr
5                10                15                20

Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile
      25                30                35

Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser
      40                45                50

Ser Pro Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala
      55                60                65

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu
      70                75                80

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr
85                90                95                100

Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln
      105                110                115

Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn
      120                125                130

Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu
      135                140                145

Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Glu Asp Met Pro Thr His
      150                155                160

Leu Ile Leu Arg Ser Leu Lys Glu Phe Leu Gln Arg Ser Leu Arg Ala
165                170                175                180

Leu Arg Gln Met

```

(2)SEQ ID NO:2 信息:**(i)序列特征:****(A)长度: 27 个碱基对****(B)类型: 核酸****(C)链型: 单链****(D)拓扑结构: 线性****(ii)分子类型: DNA(基因组的)****(iii)假定: 无****(xi)序列描述: SEQ ID NO:2 :****AACATGTGTG AAAGCAGCGA TGAGGCG****(2)SEQ ID NO:3 信息:****(i)序列特征:****(A)长度: 26 个碱基对****(B)类型: 核酸****(C)链型: 单链****(D)拓扑结构: 线性****(ii)分子类型: DNA(基因组的)****(iii)假定: 无****(xi)序列描述: SEQ ID NO:3 :****CTAGCGCCTC ATCGCTGCTT TCACAC****(2)SEQ ID NO:4 信息:****(i)序列特征:****(A)长度: 27 个碱基对****(B)类型: 核酸****(C)链型: 单链****(D)拓扑结构: 线性**

(ii)分子类型: DNA(基因组的)

(iii)假定: 无

(xi)序列描述: SEQ ID NO:4 :

AACATGTGTG AAAGCAGCGA AGAGGCG

(2)SEQ ID NO:5 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 26 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(基因组的)

(iii)假定: 无

(xi)序列描述: SEQ ID NO:5 :

CTAGCGCCTC TTCGCTGCTT TCACAC

(2)SEQ ID NO:6 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 27 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(基因组的)

(iii)假定: 无

(xi)序列描述: SEQ ID NO:6 :

AACATGTGTG AAAGCAGCTT TGAGGCG

(2)SEQ ID NO:7 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 26 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(基因组的)

(iii)假定: 无

(xi)序列描述: SEQ ID NO:7:

CTAGCGCCTC AAAGCTGCTT TCACAC

(2)SEQ ID NO:8 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 27 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(基因组的)

(iii)假定: 无

(xi)序列描述: SEQ ID NO:8:

AACATGTGTG AAAGCAGCAA TGAGGCG

(2)SEQ ID NO:9 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 26 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(基因组的)

(iii)假定：无

(xi)序列描述： SEQ ID NO:9 :
CTAGCGCCTC ATTGCTGCTT TCACAC

(2)SEQ ID NO:10 信息：

(i)序列特征：

(A)长度： 27 个碱基对

(B)类型： 核酸

(C)链型： 单链

(D)拓扑结构： 线性

(ii)分子类型： DNA(基因组的)

(iii)假定：无

(xi)序列描述： SEQ ID NO:10 :
AACATGTGTG AAAGCAGCCC CGAGGCG

(2)SEQ ID NO:11 信息：

(i)序列特征：

(A)长度： 26 个碱基对

(B)类型： 核酸

(C)链型： 单链

(D)拓扑结构： 线性

(ii)分子类型： DNA(基因组的)

(iii)假定：无

(xi)序列描述： SEQ ID NO:11 :
CTAGCGCCTC GGGGCTGCTT TCACAC

(2)SEQ ID NO:12 信息：

(i)序列特征：

(A)长度: 23 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(基因组的)

(iii)假定: 无

(xi)序列描述: SEQ ID NO:12:

GAAAGGAGAC ATGTAACAAG AGT

(2)SEQ ID NO:13 信息:

(i)序列特征:

(A)长度: 27 个碱基对

(B)类型: 核酸

(C)链型: 单链

(D)拓扑结构: 线性

(ii)分子类型: DNA(基因组的)

(iii)假定: 无

(xi)序列描述: SEQ ID NO:13:

ATGTTACTCT TGTTACATGT CTCCTTT

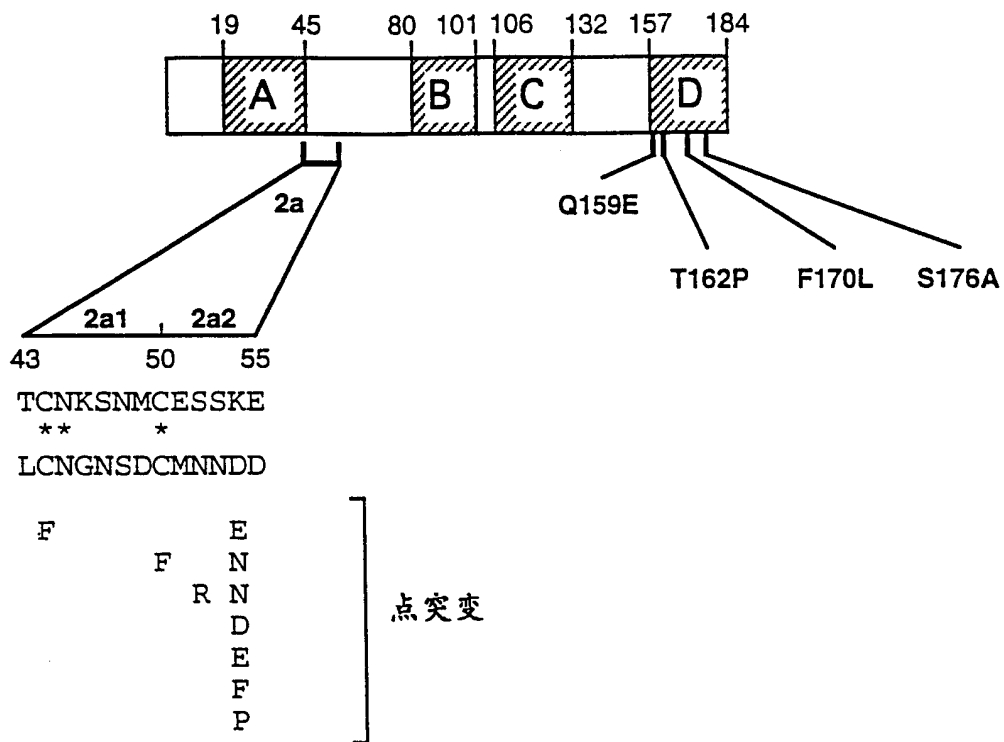
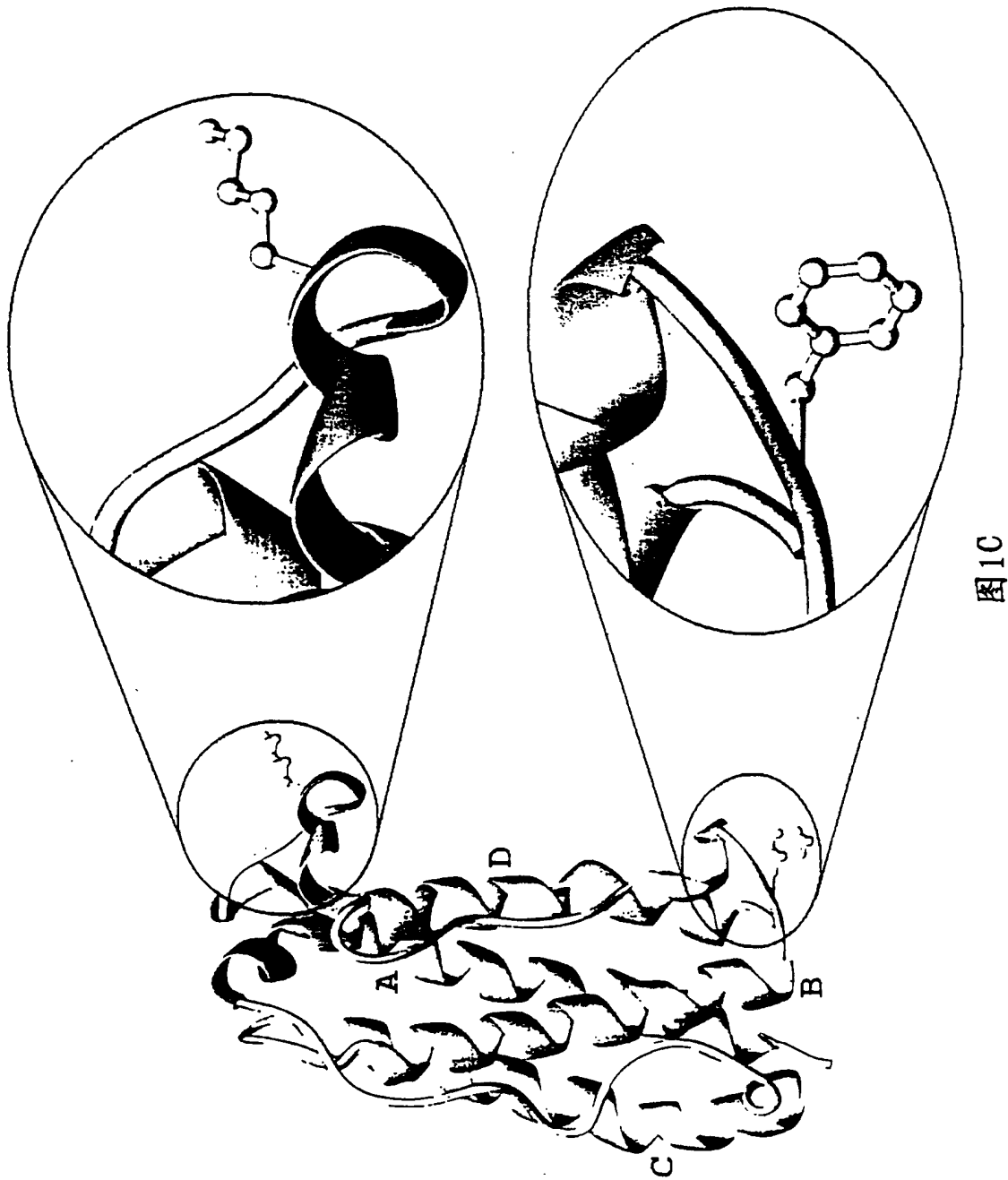


图1A

43	50	55	
TCNKS	NMCESSKE		人
MCEKY	EKCENSKE		猪
ICEKN	DECENSKE		绵羊
ICEKN	DECESSKE		牛
MCDNY	NKCEDSKE		猫
MCDKF	NKCEDSKE		狗
TCNRS	SNMCDSTKE		白脸猴
TCNRS	SNMCESSKE		猕猴
LCNGNS	DCMNDD		小鼠
LCNGNS	DCMNSDD		大鼠

图1B



IL-6突变蛋白的氨基酸序列

Met	Asn	Ser	Phe	Ser	Thr	Ser	Ala	Phe	Gly	Pro	Val	Ala	Phe	Ser	Leu
Gly	Leu	Leu	Leu	Val	Leu	Pro	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Val	Pro	Pro
Gly	Glu	Asp	Ser	Lys	Asp	Val	Ala	Ala	Pro	His	Arg	Gln	Pro	Leu	Thr
5					10					15				20	
Ser	Ser	Glu	Arg	Ile	Asp	Lys	Gln	Ile	Arg	Tyr	Ile	Leu	Asp	Gly	Ile
				25					30					35	
Ser	Ala	Leu	Arg	Lys	Glu	Thr	Cys	Asn	Lys	Ser	Asn	Met	Cys	Glu	Ser
			40					45					50		
Ser	Pro	Glu	Ala	Leu	Ala	Glu	Asn	Asn	Leu	Asn	Leu	Pro	Lys	Met	Ala
		55					60					65			
Glu	Lys	Asp	Gly	Cys	Phe	Gln	Ser	Gly	Phe	Asn	Glu	Glu	Thr	Cys	Leu
	70					75					80				
Val	Lys	Ile	Ile	Thr	Gly	Leu	Leu	Glu	Phe	Glu	Val	Tyr	Leu	Glu	Tyr
85					90					95					100
Leu	Gln	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	Ser	Glu	Glu	Gln	Ala	Arg	Ala	Val	Gln
				105					110					115	
Met	Ser	Thr	Lys	Val	Leu	Ile	Gln	Phe	Leu	Gln	Lys	Lys	Ala	Lys	Asn
			120					125					130		
Leu	Asp	Ala	Ile	Thr	Thr	Pro	Asp	Pro	Thr	Thr	Asn	Ala	Ser	Leu	Leu
		135					140					145			
Thr	Lys	Leu	Gln	Ala	Gln	Asn	Gln	Trp	Leu	Glu	Asp	Met	Pro	Thr	His
	150					155					160				
Leu	Ile	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Phe	Leu	Gln	Arg	Ser	Leu	Arg	Ala
165					170					175					180
Leu	Arg	Gln	Met												
			184												

图2

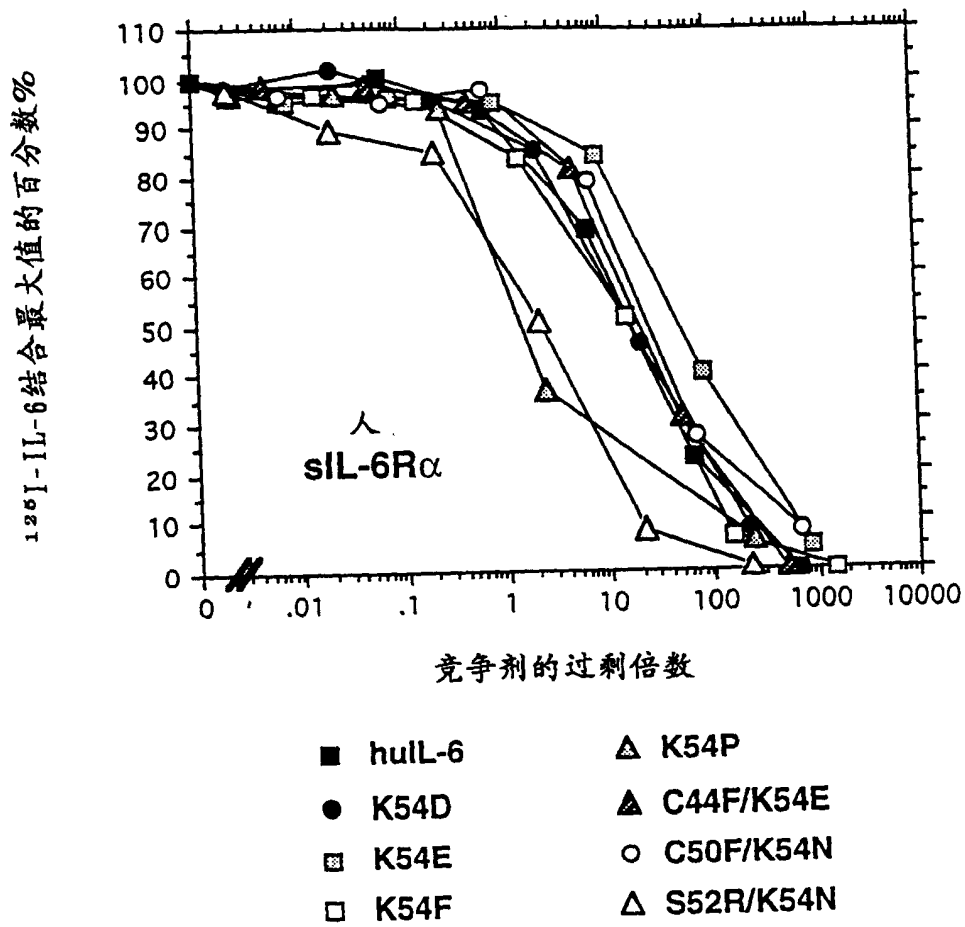


图3A

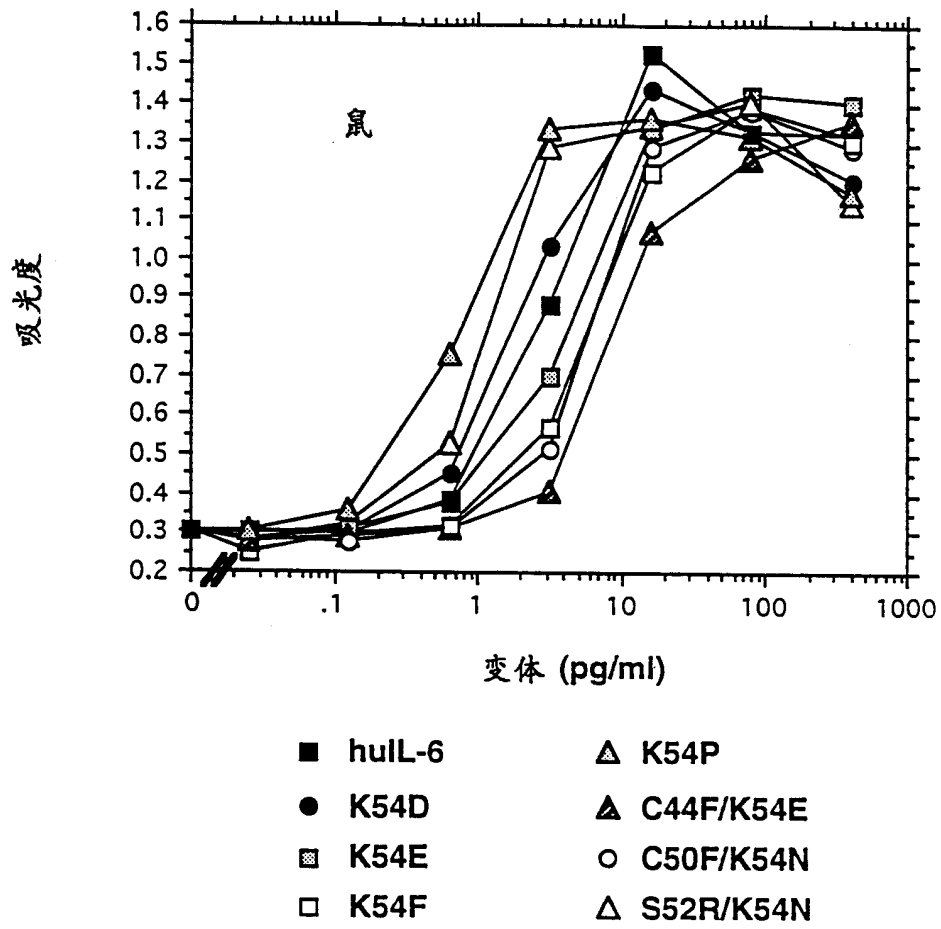


图 3B

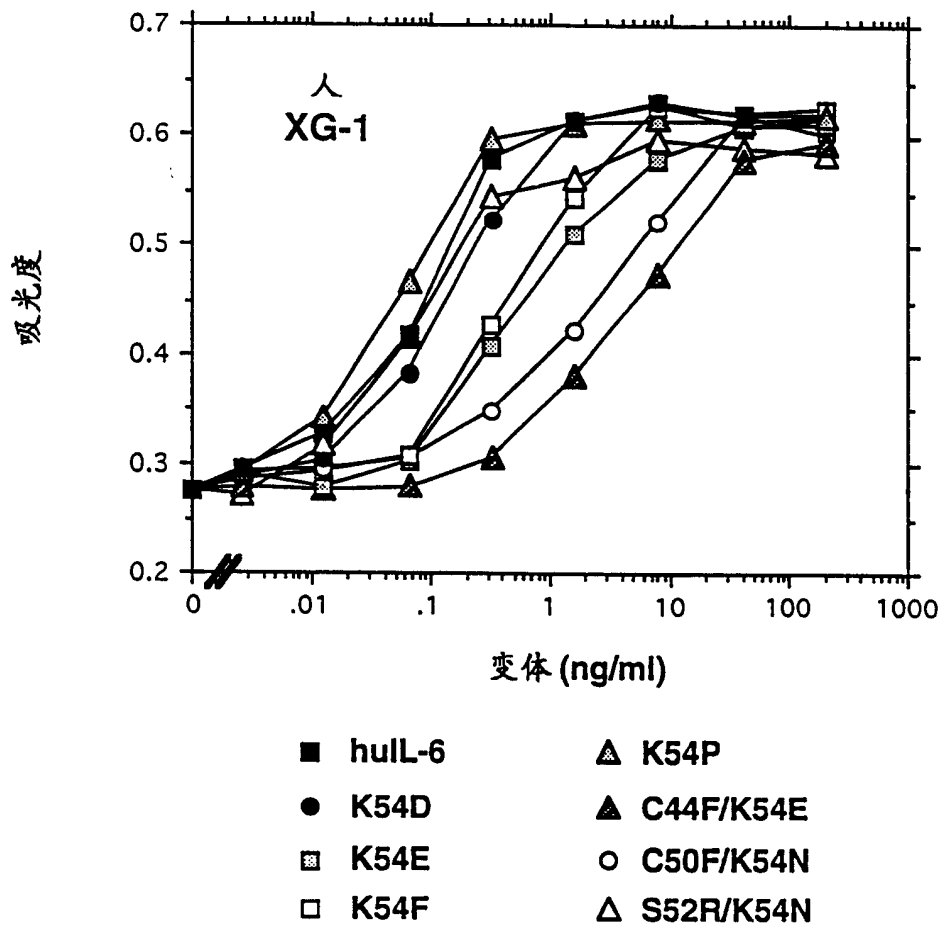


图 3C

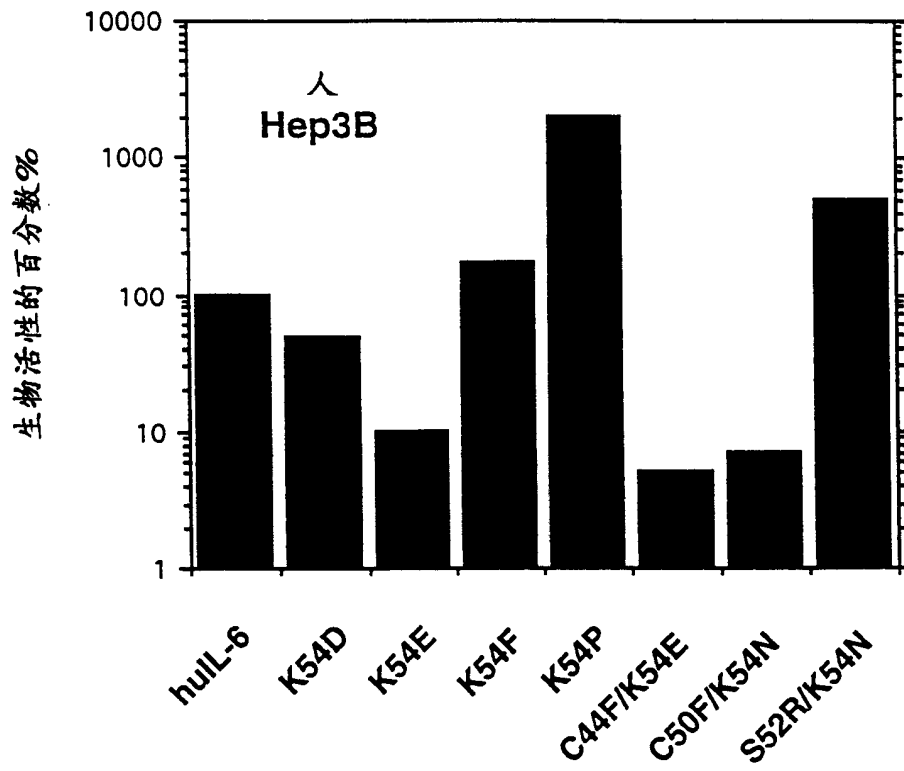


图 3D

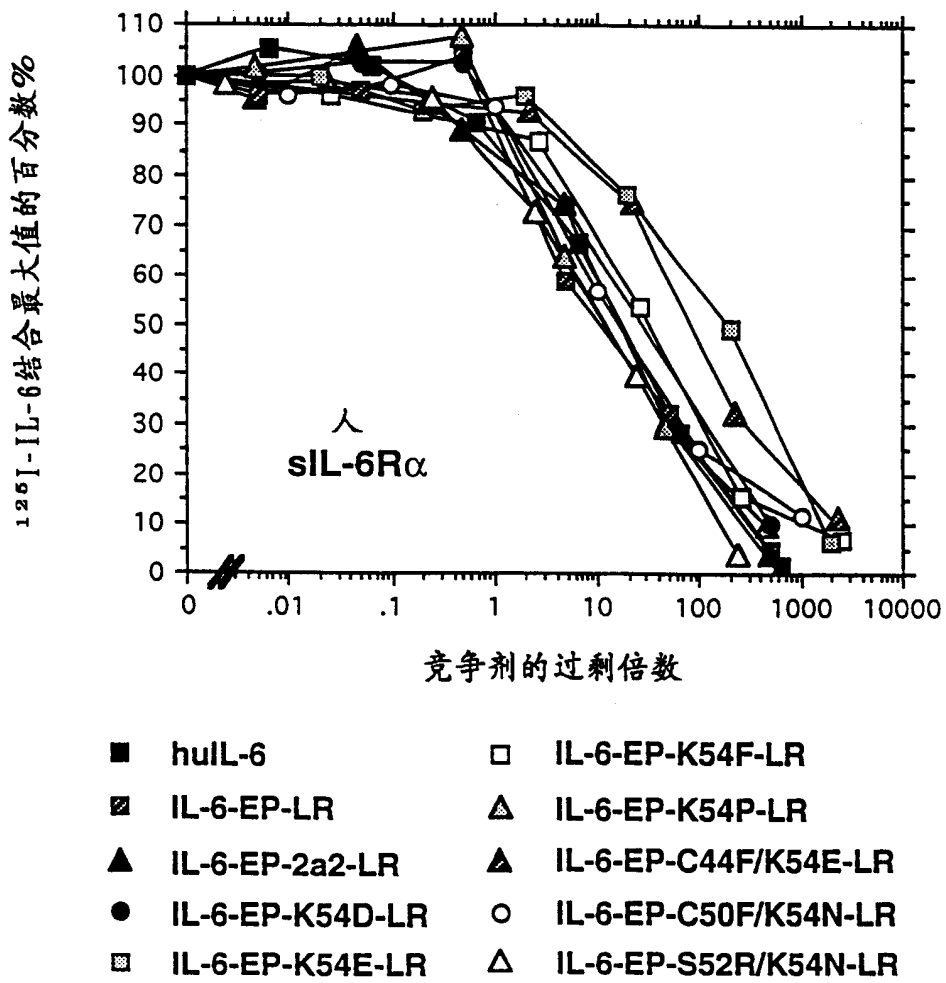


图4A

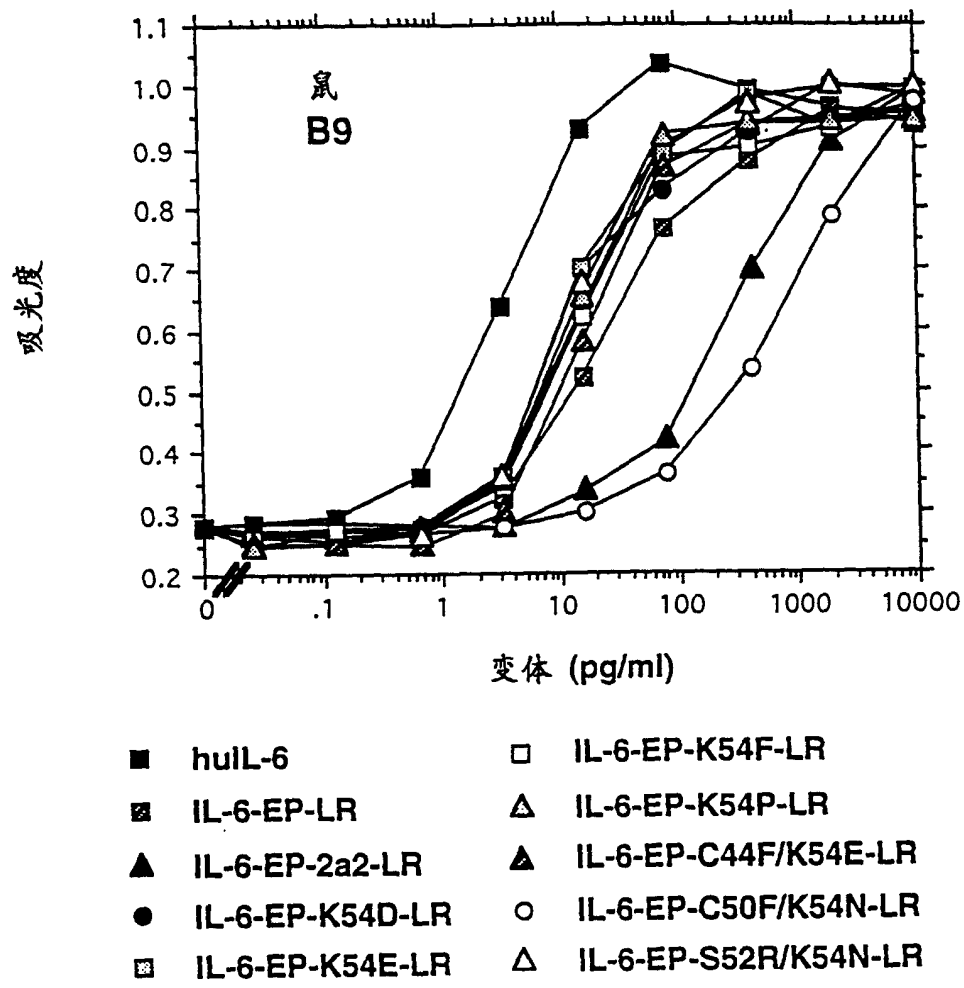


图4B

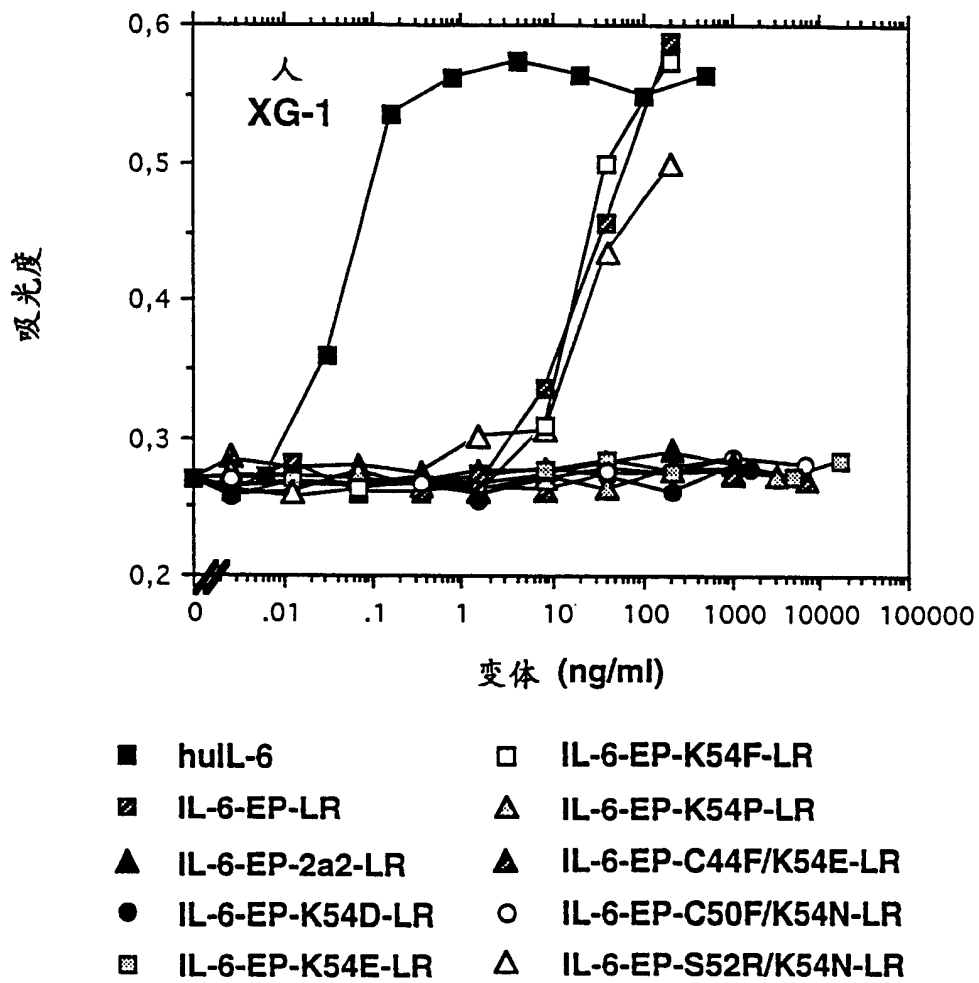


图4C

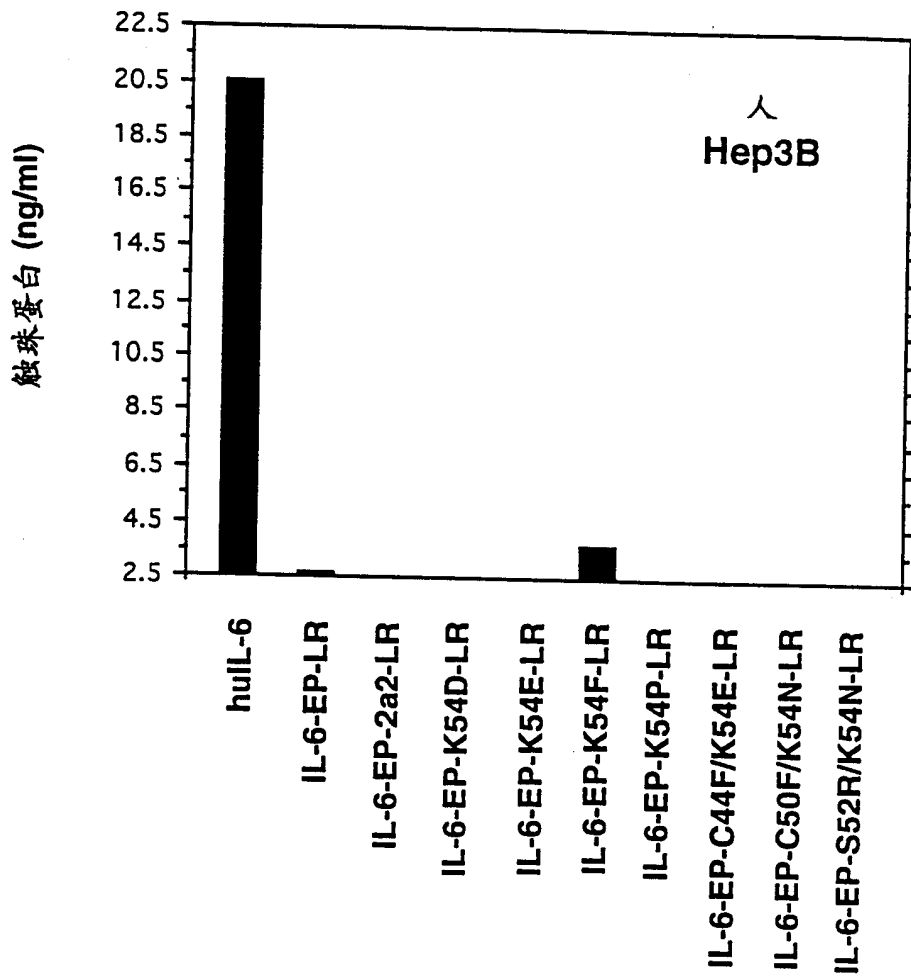
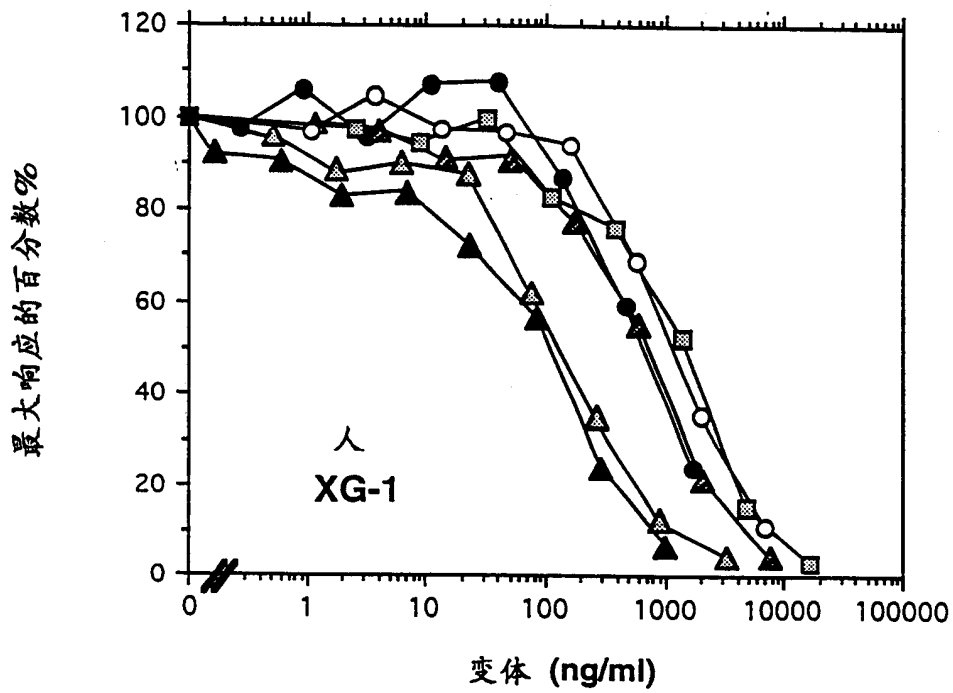


图 4D



- ▲ IL-6-EP-2a2-LR ▲ IL-6-EP-K54P-LR
- IL-6-EP-K54D-LR ▲ IL-6-EP-C44F/K54E-LR
- IL-6-EP-K54E-LR ○ IL-6-EP-C50F/K54N-LR

图5