



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94192453.X

[51]Int.Cl⁶

C12Q 1/68

[43]公开日 1996 年 6 月 26 日

[22]申请日 94.5.27

[30]优先权

[32]93.5.27 [33]DE[31]P4317577.5

[86]国际申请 PCT/EP94/01735 94.5.27

[87]国际公布 WO94/28170 德 94.12.8

[85]进入国家阶段日期 95.12.15

[71]申请人 贝林格尔·英格海姆国际有限公司

地址 联邦德国英格海姆

[72]发明人 阿明·P·彻劳夫斯基

乌尔里克·韦耶 伊恩·G·扬

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 范明娥

C12N 15/85

权利要求书 4 页 说明书 33 页 附图页数 6 页

[54]发明名称 一种对白细胞介素-5受体依赖细胞信息
传递通路有调整作用的物质筛选方法

[57]摘要

本发明涉及对白细胞介素-5受体依赖的哺乳动物细胞信息传递通路有调整作用的物质的筛选方法,把检测物放在能表达有功能的白细胞介素-5受体的细胞上,用重组DNA转化细胞,重组DNA含有一个指示基因和一个功能上与其连结的调节顺序,该顺序对白细胞介素-5受体依赖的信息传递通路的第二信息使物质的浓度变化有反应,这种筛选方法可以鉴别具有潜在的药理作用的和对白细胞介素-5受体依赖的信息传递通路特异的物质。

权 利 要 求 书

1、测定一种物质对人或动物细胞的依赖于受体的信息传递通路的调节作用的方法，其特征在于，物质对信息传递通路某一成份的调节作用，该通路是通过活化白细胞介素-5(IL-5)受体来启动，该物质的调节作用是通过培养哺乳动物细胞而测定的，该细胞

a) 用含一个指示基因和一个调节顺序的重组DNA转化，这些细胞对耦连到白细胞介素-5受体的信息传递通路的一个或多个第二信使物质的浓度变化起反应用，以致通过第二信使物质的浓度变化调整指示基因的表达；

b) 表达功能性白细胞介素-5受体

细胞和待测物一起孵育，测定指示基因产物的浓度并研究确定检测物的作用是否对依赖于白细胞介素-5受体的信息传递通路有选择性。

2、按权利要求1的方法，其特征在于，研究检测物对依赖于白细胞介素-5受体的信息传递通路的拮抗作用，其中把细胞介素-5捕获到细胞上。

3、按权利要求1的方法，其特征在于，利用自然表达功能性白细胞介素-5受体的细胞。

4、按权利要求1的方法，其特征在于，利用仅自然表达白细胞介素-5受体的 β -亚基和用重组DNA转化的细胞，该重组DNA含有为白细胞介素-5受体的 α -亚基编码的顺序，因此，该转化细胞可表达功能性白细胞介素-5受体。

5、按权利要求1的方法，其特征在于，利用重组DNA转化的细胞，该重组DNA含有对白细胞介素-5受体的 α -和 β -亚基编码的顺序，因此，该转化细胞表达功能性白细胞介素-5受体。

6、按权利要求5的方法，其特征在于，对 α -亚基和对 β -亚基编码的DNA顺序位于分开的两个质粒上。

7、按权利要求1-6之一的方法，其特征在于，细胞表达功能性人白细胞介素-5受体。

8、按权利要求1-6之一的方法，其特征在于，细胞表达一个功能性大鼠白细胞介素-5受体。

9、按权利要求1-6之一的方法，其特征在于，细胞表达一个功能性白细胞介素-5受体，该受体的 α -亚基和 β -亚基来源于不同物种。

10、按权利要求9的方法，其特征在于， α -亚基来源于人。

11、按权利要求1-10之一的方法，其特征在于，在a)定义的重组DNA作为调节顺序含有c-fos基因的启动子。

12、按权利要求1-10之一的方法，其特征在于，在a)定义的重组DNA作为调节顺序含有ICAM-I基因的启动子。

13、按权利要求11或12的方法，其特征在于，在a)定义的重组DNA作为指示基因含有一个萤光素酶基因。

14、按权利要求2-13之一的方法，其特征在于，研究检测物的拮抗作用，其中，也通过培养细胞，该细胞表达功能性白细胞介素-5受体及其它生长因子的受体，它至少依赖于这些受体之一的配体的存在，一方面，单独用白细胞介素-5孵育这些细胞，另一方面，用白细胞介素-5和检测物一起孵育这些细胞，并比较两种细胞培

养物的增殖情况。

15、按权利要求1-13之一的方法，其特征在于，检测物质对依赖于白细胞介素-5受体的信息传递通路的调节作用的选择性，是通过在相同条件下，把这些物质捕获到哺乳动物对照细胞上，这些细胞表达一个不同于白细胞介素-5受体的对照受体和这些细胞可用a)定义的重组DNA转化，这些重组DNA的调节顺序也对耦联到对照受体的信息传递通路的第二信使物质的浓度变化起反应；并把表达白细胞介素-5受体的细胞内指示基因产物的浓度和对照细胞内的浓度进行比较。

16、按权利要求15的方法，其特征在于，对照受体是白细胞介素-3受体。

17、按权利要求1-13之一的方法，其特征在于，在相同条件下，用研究的物质孵育哺乳动物细胞和测定指示基因产物的浓度，该细胞用a)定义的重组DNA转化的、不表达功能性白细胞介素-5受体。

18、按权利要求1-17之一所述的方法，其特征在于，这作为筛选分析而加以利用，其中，要研究的物质是很多种物质中的一种，用预定哺乳动物细胞数和在预定条件下把细胞与这些物质一起孵育，测定指示基因产物的浓度，并检查物质对依赖于白细胞介素-5的信息传递通路的选择性。

19、哺乳动物细胞，其特征在于：a)它们是用含有一个指示基因和一个调节顺序的重组DNA转化的细胞，调节顺序对耦联到白细胞介素-5受体的信息传递通路的一个或多个第二信使物质浓度变化起反应和b)它们是用为白细胞介素-5受体的 α -亚基或 α -和 β -亚基编码的重组DNA转化的，因此，它们表达功能性白细胞介素-5

受体。

20、按权利要求19的哺乳动物细胞，其特征在于，这里的哺乳动物的细胞是人细胞。

21、按权利要求19的哺乳动物细胞，其特征在于，这里的哺乳动物的细胞是大鼠细胞。

22、按权利要求19到21之一的哺乳动物细胞，其特征在于，这些哺乳动物在天然状态下只表达白细胞介素-5受体的 β -亚基和它们可用重组DNA转化，这些重组DNA含有对 α -亚基编码的顺序。

23、按权利要求22的哺乳动物细胞，其特征在于， α -亚基来源于别的物种。

24、按权利要求22的人细胞，其特征在于，这些人类细胞是用重组DNA转化的细胞，重组DNA含有为人 α -亚基编码的顺序。

25、按权利要求22的鼠细胞，其特征在于，这些大鼠细胞是用重组DNA转化的细胞，重组DNA含有为大鼠 α -亚基的编码的顺序。

26、按权利要求19-25之一的哺乳动物细胞，其特征在于，在a)定义的作为调节顺序的重组DNA含有c-fos基因的启动子。

27、按权利要求19-25之一的哺乳动物细胞，其特征在于，在a)定义的作为调节顺序的重组DNA含有ICAM-1基因的启动子。

28、按权利要求19-27之一的哺乳动物细胞，其特征在于，在a)定义的作为指示基因的重组DNA含有萤光素酶基因。

说明书

一种对白细胞介素-5受体依赖细胞 信息传递通路有调整作用 的物质筛选方法

本发明涉及一种寻找药理活性物质的方法，该方法是通过测定物质对人或动物细胞的白细胞介素-5受体依赖的信息传递通路的调整作用进行的。

通常所称的“放射性配体检测”（检测配体）方法，其中检测一个物质，它以何种程度代替结合到受体的配体，并可用这种方法来寻找具有药理作用的物质，在这种情况下，只有那些影响熟知的配体结合的受体结合点的物质才被特异性地识别。这种检测不能区别结合物质是否有竞争作用或拮抗作用。

高等真核细胞的越膜信息传递系统通常有下列结合到膜上的成分组成：

- a) 细胞表面的受体，它可能有多个亚基组成，也有可能是
- b) 一个结合鸟苷和裂解GTP的调节蛋白，人们称这种蛋白为G-蛋白，这种蛋白甚至也能与受体耦联，把受体作为自己的效应物。
- c) 所谓“效应物”，它常常导致第二信使分子，如cAMP、DAG、IP₃等浓度改变，例如离子通道、腺苷酸环化酶、鸟苷酸环化酶或磷酸酯酶；和/或
- d) 各种激酶。

细胞表面的受体能从受到的众多的细胞外刺激中识别出适当的配体。配体结合到受体上后，活化信息级联。与G-蛋白耦联的受体的情况下该信息传递通路了解得相对清楚，并随着异型三聚体G-蛋白的活化开始使细胞外的信息产生各种各样的作用。

低分子量的第二信使，如cAMP(环状AMP)(通过腺苷酸环化酶活化产生)；cGMP(环状GMP)(通过鸟苷酸活化酶作用产生)；肌醇-1,4,5-三磷酸酯(IP₃)，和二酯酰丝氨酸(DAG)(通过磷酸酯酶活化产生)，如磷酸酯酶C，或在羟化酶参与下的磷酸酯酶D(Billah et al., 1989)导致细胞内变化，即通过蛋白激酶的活化使蛋白质选择性地磷酸化(如通过IP₃/DAG的PKC，通过cAMP的PKA)，它们都能影响特定基因的转录调节和细胞增殖。(一个具有拮抗作用的物质能消除通过竞争作用物引起的相互作用和部分地或全部地消除由此产生的第二信使的浓度变化，也就是说本身导致了可逆的功能效应)。细胞能通过这个信息传递系统，进行通讯和协调功能。

因为一个单独的受体亚型(可能存在于同一个细胞里，也可能存在于不同的细胞里)能和一个以上的效应物耦联，并多个受体亚型能活化相同的效应物，这样就构成了复杂的信息传递网。受体在信息传递级链中活化的结果导致活化的转录因素(例如CREB-蛋白，AP1-蛋白)并与调节DNA的成份相互作用。这方面的实例是CRE

(CRE-成份，cAMP反应成分)及TRF(TRF=TPA反应成份；TPA=佛波醇(phorbol)-12-肉豆蔻酸酯-13-乙酸酯=佛波醇酯(phorb-olester))。CRE和TRE与CREB或AP1结合。很多通过cAMP调节转录的基因(例如，大白鼠的生长激素释放抑制因子，人的 α -促性腺激素，c-fos)，其5'一侧区域含有一个作为调节成份的保守顺序。

CRE—顺序与回纹八聚体TGACGTCA一致或相似(Montminy et al., 1990), TRE—区含有很相似的七聚物区TGAGTCA, 它和CRE成分的保守顺序只有一个核苷酸之差(Deutsch et al., 1988), TRE区, 或非常相似的区, 已从很多基因中辨别出来, 通过佛波酯活化这些基因的转录(Angel et al., 1987 a和b; Lee et al., 1987)相邻的DNA顺序或蛋白质—蛋白质和其它因子相互作用决定着对一个特定基因的具体调节现象。

其它DNA调节区就是所称的“SRE成分”, 这个成分对血清因子起反应 (“血清反应成分”, Treisman, 1985) SRE区是可诱导的顺式成分, 这个成分由20个碱基对组成, 具有双向对称结构。SRE成分对不同生长因子有反应, 不久前报导, 通过不同的细胞激动素(Cytokine)诱导c-fos时, SRE起着决定性作用(Hatakeyama et al., 1989)对糖皮质激素浓度变化起反应的区域称为GRE—成分(Yamamoto, 1985; Scheidereit et al., 1986; Jantzen et al., 1987; Straehle, et al., 1987)。

假如由于信息传递通路网很复杂, 而使信息传递通路间发生所谓串话(Crosstalk), 如腺苷酸环化酶—和磷酸酯酶C的信息传递通路之间进行的。“串话现象”理解为, 一个效应物系统的影响也对另一个效应物系统的影响进行(Sassone-corsi et al., 1990; Houslay, 1991), 为了产生多余信息, 也就是说为了保证不同信息传递系统的通讯, 这种串话现象在生理学上可用于信息的组合, 即信息入网。串话能在信息传递通路的不同层次上进行。细胞病理学变化的一个可能原因是干扰了这种相互作用, 例如: 当一个有生理意义的特定受体不能正确地与效应物系统相互作用时, 细胞就会出现

病变。

细胞激动素(cytokine)的受体是不能和G-蛋白耦联的受体。据认为, 这些受体和更多的信息传导通路相耦联, 这些通路在不同受体搭接, 以便在细胞内部获得多层次的串话网。

在免疫反应和炎症反应 [淋巴因子和单核细胞增多性李氏杆菌素(Monokine)] 的协调方面, 在防御病毒感染(干扰素)方面和在血细胞生成(集落刺激因子, CSF)时, 细胞激动素起重要作用。它调节造血组织, 淋巴组织或其它组织内的大多数细胞的增殖、分化和功能。每种细胞激动素都对不同类型的细胞有作用, 一个细胞常能对多种细胞激动素发生反应, 这样, 产生细胞激动素的细胞和可被细胞激动素调节的细胞就构成了一个复杂的细胞间联络网, 在这个联络网里, 细胞激动素协同地或拮抗地起作用。这样, 一种细胞激动素(Cytokines)的生理活性作用就取决于许多不同的细胞类型, 它们表达细胞激动素的特定的受体。白细胞介素-3(IL-3)和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)就是一种具有多效性因素的实例, 这类因子刺激多潜能的造血系统细胞以及造血系统的一系列早幼细胞系。相反, 白细胞介素-5(IL-5)的作用范围窄得多, 它主要作用于嗜酸性早幼细胞(Miyajima et al., 1992)。

分析它们的蛋白质结构表明, 所有细胞激动素受体都是与膜结合的糖蛋白(Glycoprotein), 它由三个区, 即细胞外的N-端区, 跨越细胞膜的区和在细胞质的区组成。现已证明: 细胞外区有一系列共同结构成份, 据此细胞激动素受体分属于许多受体基因家系。据认为, 这些性质上不同的受体起源于共同的祖先基因(Gillis, 1991)。白细胞介素-5的受体基因属于造血受体基因家系。这个家

系成员含有特征的保守半胱氨酸残基，这些残基在细胞外区域一次或多次拷贝。除此之外，这个家系的成员还含有一个色氨酸-丝氨酸-X-色氨酸-丝氨酸区（其中X是任意的氨基酸），这个区常出现在靠近横跨膜区的细胞外区域。另外，业已证明，这个家系的受体含有一个或多个纤粘蛋白III结合区的拷贝，分散在细胞外的整个区域(Gillis, 1991)。

除白细胞介素-5受体（含两个亚基）外，IL-3、IL-6的受体和GM-CSF的两个亚基、IL-4、IL-7，红细胞生成素(EPO)和“白血病抑制因子”(LIF)受体IL-2受体的 β -亚基以及“生长激素”(GH)、促乳素和G-CSF的受体也都属于造血因子受体家系。

白细胞介素-5由一个 α -亚基和一个 β -亚基组成， α -亚基含有细胞激动素特异性结合区， β -亚基是信息传导必需的亚基，含有与IL-5受体有高度亲和性的区。已经克隆了人(Tavernier等, 1991; Murata等, 1992)和鼠(Takaki等, 1990)细胞的IL-5-受体的 α -亚基以及人(Tavernier等, 1991)和鼠(Devos等, 1991; Takaki等, 1991)细胞的IL-5受体的 β -亚基的编码的DNA。IL-5、IL-3和GM-CSK受体的 β -亚基相同(Kaitamura et al., 1991; Tavernier et al., 1991)。如果同一个细胞表达多于这三种受体中的一个，则在细胞激动素之间，在受体水平上就会出现“串话”。

细胞激动素受体的亚基不含有固有的酪氨酸激酶活性，而生长因子（如EGF或PDGF）受体则含有。然而，业已表明，通过任意选择配体刺激IL-5受体、IL-3受体或GM-CSF受体可诱导特定细胞蛋白的快速酪氨酸磷酸化(Koyasu et al., 1987; Isfort et al.,

1988, Moral et al., 1988, Murata et al., 1990), 已经鉴定出了一个酪氨酸激酶, 用GM-CSF刺激后, 这个激酶与上述受体的 β -亚基结合(Hanazono et al., 1993)。由GM-CSF诱导发生信息的转导过程中, 已表明p21^{ras} (Sato et al., 1991, 1992)和c-raf (Carroll等, 1990)的活化, 在IL-3诱导的信息传导过程中, 不仅p21^{ras} (Sato等, 1991, 1992)和c-raf (Carroll et al., 1990)被活化, 而且蛋白激酶C(Whetton et al., 1998)活化并“促细胞分裂素活化的蛋白”(MAP)激酶被磷酸化(Welham和Schrader, 1992)。但是, 至今信息转导各环节内过程的正确顺序仍还不清楚。

细胞激动素受体刺激后的诱导基因通过信息转导机构成分还未进一步鉴定。因而有关在这些基因的启动子中的调节成分所知就更少。例如, IL-6刺激受体导致一个特异性DNA结合蛋白, NF-IL-6被激活, 这个蛋白通过结合到目的基因启动子区的IL-6反应区使该基因表达, 并从而介导了IL-6依赖的生物学效应(Akira et al., 1990)。c-fos原癌基因的启动子区含有多个可诱导的顺序段(Verma和Sassone-Corsi, 1987), 它可通过IL-2, IL-3和EPO诱导, 其中自诱导即c-fos启动子所含的“血清反应区”(SRE)参与此过程(Hatakeyama et al., 1989, 1992)。

IL-5受体是通过结合本身配体IL-5而活化。IL-5是肽类激素, 它由T-细胞和肥大细胞(Mast cells)产生, 在嗜酸性细胞的终分化中起关键作用。

有关IL-5受体耦联的信息传递通路几乎一无所知。除一些尚未准确鉴定的细胞蛋白磷酸化外(Murata et al., 1990), 并不清楚刺激IL-5受体触发信息转导的过程。因这三种细胞激动素: IL

- 5, IL-3和GM-CSF有不同生物学功能, 很有可能, 除三种受体共同的 β -亚基外, 受体的细胞激动素有特异性的 α -亚基在诱导细胞内信息通路, 特别对细胞激动素有特异性的信息传导和功能 (Tominaga et al., 1992) 方面起重要的作用。但是, 这并不表明人们已经清楚了通过IL-3受体或GM-CSF受体活化所产生的信息传导过程对IL-5受体耦联的信息通路的影响。因为, 尚未鉴定出刺激IL-5受体后诱导的基因。所以, 关于在这些基因启动子区存在的调节成份和在通过IL-5受体活化信息传递通路过程的反应都还一无所知。

IL-5受体通过与自己的配体结合而被激活, 它与一些疾病的发生有关系, 例如, 它与血液中的嗜酸性粒细胞和其增殖有关, 也与下列疾病有关: 自身免疫缺陷病, 组织移植排斥, 过敏性疾病, 某些寄生物引起的疾病以及哮喘引起的疾病。现在治疗这些具有因果关系的疾病的方法, 都是从两个方面入手, 一方面, 使用IL-5受体的可溶性 α -亚基作拮抗剂 (EP-AO 492214), 另一方面, 根据IL-5的晶体结构, 设计出合适的拮抗剂或竞争剂 (Milburn et al., 1993)。

最近研制出一种筛选方法, 这种方法可以找出用于临床治疗的药物。这种药物对一定的受体或受体亚型具有专一性, 并进而特异地影响受体依赖的信息传递途径, 这种方法依据的原理是: 物质对受体依赖的信息传递途径的调整作用能通过基因表达来证明。

一种由King等人, (1990) 描述的分析方法是依据对信息传递通路的影响, 这条通路用于啤酒酵母 (*Saccharomyces Cerveisiae*) G-蛋白耦联的信息素受体, 用比色法测定在酵母细胞中竞争性有效

作用物结合到转染入酵母细胞的受体上的反应。

Montmayeur和Borelli (1991)描述了一种分析方法，它是基于通过活化G-蛋白-偶联的受体对腺苷酸环化酶-信息传递通道上的影响（它是使用D₂-受体和β-肾上腺素能的受体）。

Himmler等(1993)进行了一种功能性试验，其中受体-耦合(人的多巴胺D1和D5-受体)到cAMP-信息传递通道的活性是按指示基因(Reportergen)的转录活化而测量的。

直到今天，已知测量方法是限于测定基因表达。这些基因通过cAMP浓度改变来调节。cAMP是G-蛋白耦联受体的信息传递通路的一个信使物质。

与此相反，本发明的工作目的是建立了一种能鉴别物质的筛选方法，这些物质能调整IL-5受体依赖的信息传递通路，有关其机制和信使物质知道甚少。特别是借助于本发明，能建立一种适于自动地和物质快速通过时的筛选方法，这种方法也适于研究象有机体抽提物这样的多种物质混合的复杂体系，而这些有机体抽提物含有药理学上的有用物质。

根据物质是否是调整IL-5受体依赖的信息传递的通路，特别是根据是否是IL-5受体的拮抗物来鉴别物质，构成了研制可用于临床的药物的出发点，这些药物参与调整，更多的是参与活化IL-5受体。

本发明指出，在细胞内，该细胞表达IL-5受体功能所需要的结构成份及IL-5受体依赖的信息传递通路成份（这种细胞以下称为：“表达有功能的IL-5受体的细胞”）并用含有调节DNA成份的指示基因结构(Reportergenkonstrukt)进行转换，通过IL-5受体

与相应配体结合后的被活化，而诱导出指示基因结构。

根据IL-5受体依赖的信息传递通路的有限知识得出的结果是令人惊讶的，特别是在此之前没有人预言存在有这种可能性：是否，或者说至今表征的调节DNA成份中的那一个能通过IL-5受体启动而对信息传递途径的信使物质应答。

本发明涉及到一种方法，用这种方法可以测定一种物质对人或动物细胞的受体依赖的信息传递通路的调整作用，这种方法的特征在于物质对信息传递通路的一种成份的调整作用，它是通过活化IL-5受体而引起的，它取决于培养的哺乳动物的细胞，其中

a) 用重组DNA转化哺乳动物细胞，该重组DNA含有一个指示基因和一个调节顺序，这个调节顺序对一个或多个信息传递通路的第二信使物质浓度变化有反应，该信息传递通路耦联到IL-5受体，因此，指示基因的表达要通过第二信使物质的浓度变化来调节；

b) 哺乳动物细胞继续表达有功能的IL-5受体，
和检测物一齐孵育，测定指示基因产物的浓度，并研究所确定的检测物的作用是否对IL-5受体依赖的信息传递通路有选择性。

本发明中的“IL-5受体依赖的信息传递通路”一词，概念上也包括IL-5受体依赖的信息传递机构，它可由多于一个的信息传递通路组成。

本发明中“信息传递通路的成份”一词，概念上指信息传递通路的参与分子的所有机构，包括IL-5受体本身及它的亚基。

当人们寻找IL-5依赖的信息传递通路的抑制因子时，得研究检测物的拮抗作用。当人们把检测物和IL-5一起引入细胞时，这时，就得同时或稍后把检测物引入细胞。

对第二信使物质的变化有反应的重组DNA也是本发明的一部分，在下文中称为敏感DNA (Sensor-DNA)，指示基因的定义是，通过测定与浓度成比例的信息，可检测和定量它的表达产物。

下面把用敏感DNA转化，并表达IL-5受体的细胞称为“检测细胞”，这些细胞也是本发明的目的。

本发明的“IL-5受体”指的是功能性IL-5受体，在这定义下也包括任何IL-5受体亚型。本发明的“功能性受体”一方面指天然的IL-5受体，由同种 α -和 β -亚基组成。另一方面，指在检测细胞，特别是人类细胞，不同种（例如人受体 α -亚基和鼠受体 β -亚基或反过来）的IL-5受体的 α -亚基和 β -亚基的功能性组合，从该定义上讲，如有功能性受体存在则在细胞中其中一个 β -亚基和其它受体的 α -亚基（如IL-3和GM-CSF受体）天然地作用，IL-5-受体的 α -亚基引入细胞内并进行表达，这种情况下， α -亚基也可以来自不同的种，提出了二个亚基的共同作用保证了有关信息通道的启用。

下面把含有一个或多个为IL-5受体亚基编码顺序的重组DNA称为“受体DNA”。

适合于作制备检测细胞的起始细胞是那些含有内源的具有完全功能的IL-5受体，但是，具备下列特征的细胞也适合于作制备检测细胞的起始细胞，即含有用于诱导敏感DNA必要的受体耦联的信息传递通路的成分。对于适用的这些细胞表达完整的IL-5受体或只表达它的一个亚基的不需要特别考虑。在缺失一个或二个亚基时，可以用敏感DNA、也可以用为缺失的受体亚基或亚基编码的顺序来转化细胞。

在本发明的实施方案中，检测细胞来源于一个细胞，它自然地表达功能性IL-5受体所需的二种亚基。

在本发明的又一实施方案中，检测细胞来源于一个起始细胞，它只表达 β -亚基，在这种情况下，细胞除用敏感DNA转化外，也用质粒来转化，该质粒含有对IL-5受体的 α -亚基编码的DNA顺序。

本发明的另一个实施方案中，用于检测细胞的出发细胞既不天然地含有IL-5受体 α -亚基，也不含有该受体的 β -亚基。在这种情况下，必须用两种DNA顺序来转化细胞，DNA顺序可以共同在一个质粒上，也可以在两个分开的质粒上。

研究合适的物质时，应该考虑其治疗人类疾病的药物作用，受体DNA应优选含有对人类IL-5受体编码的顺序。（本发明的方法用于寻找适于治疗人类疾病的物质，它也能用于筛选治疗动物疾病的药物，若为后一目的，应使用相应的动物IL-5受体）。

首先选出用于制备检测细胞的出发细胞，出发细胞是：用物质刺激后第二信使物质浓度提高，作为IL-5受体的函数指示基因强烈表达。这是方便地测试通过用敏感DNA逐步转化表达功能性IL-5受体的细胞和检查用IL-5刺激受体后指示产物的浓度。

作为检测细胞的出发细胞，考虑一些特殊细胞，其中已知它们表达IL-5受体或含有 β -亚基的受体，以及基于其来源或有机体的功能以表达有关受体中的一个尤其是那些造血系统的初级细胞值得考虑。受体的表达可用结合分析和/或扩增分析来证实，在分析时，在有关配体(IL-5, IL-3和GM-CSF)存在下测定细胞的生长。

来自骨髓细胞所确立的因子依赖细胞系是适合作出发细胞的实例，Dexter等(1980)描述了制备这种细胞方法，它表达鼠细胞 β -

亚基，本发明中用大鼠IL-5受体的 α -亚基转染这种大鼠的细胞系的实例，并把它用作检测细胞。另一个适于作检测细胞的实例是IL-5依赖的造血细胞，如Kitamura等(1989, 1991)描述的TF-1细胞系。

其中两个亚基都来自大鼠细胞，如1H3鼠细胞系的细胞中，其中 α -和可能的 β -亚基能通过同源重组来中断，也能通过相应的人顺序来代替。

作为出发细胞，原则上各种哺乳动物细胞都可考虑，其中人类细胞要优先考虑。在使用非人类细胞时，要优先考虑那些用人的IL-5受体DNA (β -和/或 α -亚基) 转化过的细胞。

适用于本发明作检测细胞的细胞另一个先决条件是细胞的稳定性。为了检查细胞的稳定性(生活能力，外源DNA稳定地整合入基因组)，在和检测细胞相同的条件下，长时间地进行试验，并检查测定结果的可重复性。

敏感DNA优先位于一个质粒里，这个质粒在合适的寄主里，特别在E.Coli (大肠杆菌) 里能扩增很多拷贝，它在转染入哺乳动物细胞和整合到寄主基因组里后，指示基因能在调节区的控制下进行表达。这首先涉及到一个往返性载体，该载体含有一个指示基因

(敏感DNA) 的表达盒(Expressionskassette)，一个适合于哺乳动物细胞的可选择性标记物，以及至少一个复制源和一个用于大肠杆菌扩增和选择的标记物。

制备一种含有稳定插入其基因组的敏感DNA的永久性细胞系时，载体含有一个显性选择标记物。使用特定选择标记物并不是关键。下列基因都适合作标记物，例如：新霉素磷酸转移酶基因(neo)，

这个基因具有对抗生物素的遗传素 (geneticin) (G-418) 的一种抗性 (Southern & Berg, 1992): DHFE 缺失细胞的 DHFR 基因 (二氢叶酸还原酶), 对黄嘌呤 - 鸟嘌呤 - 磷酸核糖转移酶 (gpt) 的基因, 它对霉酚酸有抗性 (Mulligan & Berg, 1981) 以及潮霉素 - B - 磷酸转移酶基因 (hph: Gritz Davies, 1993)。进行选择标记物基因的启动子的实例有: SV-40-早期 (Early) - 启动子、细胞肥大病毒 (Zytomegalovirus) 启动子 (CMV-启动子)、疱疹单病毒的胸腺嘧啶激酶基因启动子 (TK-启动子)、劳斯氏肉瘤病毒 (RSV) 长端的重复区 (LTR)。为了能满足可能变化的需求, (这些实际需求发生在特定的使用情况下, 例如, 根据需要使用相应的其它细胞系等,) 质粒的优选构建要使其中的一个重要成分, 象指示基因, 该指示基因的启动子, 选择标记物的调节顺序等能易于调换或改变。这种方法例如可以在启动子或指示基因前的多个克隆位置上进行, 以便能克隆调节启动子的可调顺序或各种指示基因。

选择合适的指示基因时, 选择优选不用放射性, 可以高灵敏地自动分析的方法。

本发明范围内, 按理论上来说任何指示基因, 只要具备下列条件都可以使用:

当使用一个化学荧光基质时, 则可高灵敏地测定碱性磷酸酶, 其缺点是: 很多哺乳动物细胞表达这个酶的能力较强。它基本上只适用于作为不表达或很少表达的细胞的指示基因。

β - 半乳糖苷酶和 β - 葡萄糖苷酶的基因表达产物能分解相应的甲基羟基香豆素基 - 半乳糖苷和甲基羟基香豆素基 - 葡萄糖苷以形成荧光基团, 借助于建立的荧光分析方法检测酶反应 (Wieland

et al., 1985, Krioka, 1988)。

已证明氯霉素-乙酰基转移酶(CAT)的表达能高灵敏地检测, 但是这种方法也有缺点, 因为具有放射性和难以进行自动分析(Hartmann, 1991)。

本发明使用为光螟虫荧光素酶编码的基因作指示基因(De, Wet et al., 1987)这个酶的优点是: 在加入ATP并用它的底物荧光素它可产生大量生物荧光物质, 并可用已建立的自动分析方法对这些荧光物质进行测定, 哺乳动物细胞内不产生这个酶。另外, 荧光素酶在体内的半衰期相当短, 并且在高浓度时也无毒性(Hartmann, 1991; Brasier et al., 1989)。

在敏感DNA构建时, 指示基因放置在启动子控制下, 启动子含有可调整的调节成份, 如TRE和/或CRE-和/或SRE和/或GRE成份。因为并不清楚IL-5受体的每一个信息传导通路, 在预实验中, 只能按经验确定最合适的敏感DNA结构。为此, 用不同敏感DNA结构瞬时转化表达功能性IL-5受体的细胞, 这样, 一方面可考虑改变指示基因, 另一方面可考虑改变控制顺序, 同时, 通过用竞争物(最好用IL-5)刺激受体后, 测定指示基因产物浓度而研究测定指示基因产物的灵敏性。在敏感DNA中适合于作调节顺序、可为启动子激活导致的全部DNA成份例如可选自TRE, CRE, GRE或SRE或者这些不同成份的组合物的成分。用一个含有两个或多个不同的成份的这种敏感DNA单个地活化多个信息转导通路, 也包括平行活化多个信息转导通路。选择用于制备检测细胞的敏感DNA是基于在前面提到的这些细胞系里获得尽可能高的指示基因诱导率。调节DNA区可以是天然存在的启动子区, 也可以是人工制造的DNA片段。

也有可能使用一个能为多个第二信使物质诱导的基因的完整的启动子, 例如ICAM-1基因(细胞粘连分子1)或c-fos基因的5'端可调顺序。一个天然的、对IL-5受体活化有反应的启动子, 并含有多个可调节成份, 例如ICAM-1启动子(它含有TRE-、NK κ B-、SP1-和AP2-成份(Voraberger等))或c-fos启动子,(除了CRE-和SRE-成份外, 它含有称作“SIF-E成份”及“AP1-相似成份”的可调顺序(Hipskind & Nordheim, 1991)), 因而能研究那些成分本身是用于活化的。对此, 这涉及与天然启动子相比, 具有各种突变和/或缺失的合成的启动子顺序而研究它们的活化性。从这样的研究结果中得到的知识, 如有必要可以再优化启动子, 其中例如使用成份的多次拷贝以用作标准。

通过把这些启动子剪切到保持启动子功能所需的最短顺序时, 那些已知的天然或合成的启动子有可能得到修改。

对其中指示基因由非天然启动子来操作的敏感DNA构建时, 最好在弱启动子成份前放置一个或多个调整启动子的成份, 如TRE和/或CRE和/或SRE和/或GRE调节成份。专业人员已知的这些适合于在特定哺乳动物细胞里表达的调控顺序, 根据有关的文献(如landschulz et al., 1988; Turner & Tjian, 1989)首先进行行选择, 最具体, 也是最佳的方法是用上面介绍的、进行过渡性的转染实验。 β -球蛋白启动子和TK-启动子是合适启动子的代表。

在选择含于敏感DNA的调节顺序的(包括它的二侧顺序)时, 要选用文献已知的成份作起始物质, 例如TRE-或CRE成份(Montminy et al., 1990; Deutsch et al., 1988), 这些在初步试验中测试其在一个给定的细胞系统指示基因诱导性的灵敏检测的适应性。

适合于TRE成份（包括它的二侧顺序）的实例是生长激素抑制素的顺序、“血管活性肠肽”、巨噬细胞病毒强化因子、牛白血病病毒长端重复序列(BLV LTR) (CRE-成份)、以及ICAM-I、胶原酶、甲状腺旁腺激素(TRE-成份)。如果证明在天然顺序里所含的区没有完整的共同顺序，而又希望得到它的完整顺序时，则可以通过更换其一个或多个核苷酸而改变相邻顺序而得到。

调节成份和其两侧顺序能是天然来源的或人工合成的。

为了加强第二信使物质对指示基因表达的调整效应，可使用一种含有多重、同质或异质的调节顺序串联在一起的结构。当把各个成份排列成这种结构时，可以对这些成份进行选择其彼此间的间隙，以保证转录因子结合到这些成份上。安排这些调节成份的最佳空隙要根据预实验经验来确定，也要考虑空间配置，或许还要考虑距离别的对转录有影响的调节DNA成份的空隙，如对转录有影响的TATA-盒。如果是多种调节顺序，各成份和/或二侧的顺序可以是相同的或至少部分地不同，后者的结构优选的是成串联式。

对各成分调节性质同时有影响的调节成分的两侧顺序，特别是其紧邻的则优先使用天然围绕特异性调节成分的顺序，(Montminy et al., 1990; Deutsch et al., 1988)。根据经验来确定顺序和对它们的排列。

也许会遇到，敏感DNA的成份和选择用的标记基因在两个分开的质粒上的情况，一个含有指示基因结构（包括含有调节顺序的表达控制顺序）和一个含有选择性标记基因结构。例如，适于作选择标记基因结构的质粒有PRSVneo, PRSV2neo, PRSVgpt, PSV2gpt,

有关这些质粒的构建方法，请参阅手册《克隆载体》。使用分开的质粒时，用两种质粒协同转染细胞，并选出标记物。选择标记物的存在导致要使细胞最终含有指示基因结构，因为已经知道，若位于DNA片段的两个基因在物理学上是互不结合的，其协同转化常常导致两个协同转化的基因表达(Winnackerm, 1995)。

考虑在检测方法中具体使用的测定步骤，以便在通过敏感DNA结构变化如通过启动子排列的结构变化而优化测量信号的最大变化和正常值之间的比例，为了高灵敏地测出指示基因的表达诱导，背景信号首先要足够低，但另一方面，为了能测出检出的极限（考虑到负对照），背景信号也要足够的大。

除了受体顺序被优先放到一个强结构性的启动子控制之下，对受体-DNA结构，基本上认为它和敏感DNA结构同样的。借助于经典分子生物学方法能获得受体DNA，例如，从表达IL-5受体的细胞获得的RNA制备物，通过反转录酶PCR制备cDNA，这样就根据发表的顺序制成了引物并在合适的载体上进行克隆。用PCR由cDNA库里扩增，也可获得大量cDNA。

对受体DNA来说，也会出现这种情况：为受体亚基编码的顺序和显性选择标记物存在于分开的质粒上，用这种质粒，细胞被协同转化。

用敏感DNA或受体DNA转染的细胞要比用通常转染方法好(Vgl. z. B. Potter et al., 1984; Felgner et al., 1987)其中优先使用的方法有：电冲击转染法，磷酸钙沉淀法，脂质体转染法等。

为了测试用于IL-5受体检测物的选择性，要适宜地制备用于不同的其它受体的测试细胞以进行另外对照测试并用物质处理。当

一种物质只可专一性地影响IL-5受体，考虑到药物的专一性，则通常情况下，这种物质就只能调节该一种受体。

在对照细胞里，原则上，对照受体或是由内源的，或转化入细胞。当对于对照受体编码的顺序是内源的或另外在细胞内转化形成时，用于IL-5受体-检测细胞的敏感DNA，也通过刺激该受体（通过竞争物，如IL-5）而被大量诱导，IL-5受体-检测细胞就适用于用作对照细胞。（对照受体也包括具有与IL-5受体一样的 β -亚基，（如IL-3受体））。正因如此，含有敏感DNA和对照受体，而不含IL-5受体的细胞，在这种情况下也用作对照受体。相反，如果用于IL-5受体检测细胞的敏感DNA，不为刺激对照受体所诱导，必须根据经验确定一个合适的敏感DNA，由文献报道的成分开始

（如Montminy et al., 1990; Deutsch et al., 1988），考虑到给定细胞系统中指示基因的可诱导性灵敏性检测，在针对它们的适合性作的预实验里对这些因素进行研究。如果对照受体不是内源的，敏感DNA和编码对照受体顺序一齐在细胞内得到转化。

通过在相似条件下把物质放到对照细胞的方法，首先检查物质对IL-5受体依赖的信息传递通路的调整作用的选择性，对照细胞表达一种对照受体并经过敏感DNA转化的，它的调节顺序不仅对IL-5受体，而且也对对照受体的活化起反应，人们还能把表达IL-5受体的细胞内的指示基因产物的浓度同对照细胞的进行比较。

用受体DNA转化细胞后，研究阳性克隆（例如，借助于结合分析）表达受体的能力。在进行结合分析时，使用已知放射性标记的竞争物和拮抗物。

借助于Scatchard-blots (人类药理学, 1991) 可测定每个细胞分子中的受体数。

优先地带有受体数尽可能代表生理学的受体浓度的克隆是选自含有受体DNA的稳定转化株。(如果受体数太高, 可以发生不完全或可能非特异性的耦联或者除了特异性耦联可发生非特异性耦联。这样, 有可能其它效应系统被同时活化。如果受体数太低, 说明可以测定的信息量太低)。

“调整作用”指对IL-5受体依赖的信息传递通路的竞争或拮抗结果。

在检测过程中, 对IL-5受体依赖的指示基因表达有抑制作用的物质, 能进一步检验, 是否它们抑制的细胞依赖于IL-5的增殖。用这种方法, 人们能测定物质对细胞增殖的抑制作用, 有些细胞除表达其它生长因子的受体外, 还表达功能性的IL-5受体, 而且, 在其生长中, 它们的依赖于配体IL-5 (或至少对这类受体的一个配体), 人们能单独用IL-5或进一步用IL-5和待测的物质来培养这些细胞和测定它们存在下的细胞增殖。

这种增殖分析方法有许多, 可以在96孔微滴度板上并易于用自动分析方法进行。例如这种分析是基于测定 ^3H -胸腺嘧啶或5-溴脱氧尿苷(BrkUrd)的加入 (BrkUrd-加入量的测定例如是通过与荧光标记的抗BrkUrd抗体结合)。

另外一个增殖分析原理是以测定有色物为依据, 有色物是通过使用细胞酶的合适的底物而产生的。一个以这一原理为基础建立的方法, 是已经广泛使用的四唑鎓方法(MTT方法), 在这种方法里, 由脱氢酶转化四唑鎓而形成的有色物甲臞类化合物(formaza)的浓

度可以用比色法进行测定。

适合于作扩增分析的细胞实例是IL-5依赖的造血细胞，如 Kitamura等(1989和1991)所描述的TF-1细胞。

使用本发明方法测试其潜在的药理活性的物质可以是提纯的或混合的天然的或合成的物质（如植物提取物，发酵用液体等）。如果是纯化的物质，该方法特别适合于那些合成的低分子量有机化合物，对那些通过筛选而获得的物质来说，主要指那些能结合到受体的配位结合部位，变构活性的物质，以及那些非竞争性的优先结合到配位结合位点的物质。这些物质可以是肽类，也可以是非肽类物质。

为了达到尽可能宽的浓度范围，根据需要按系列稀释这些物质。根据经验，例如，用已知的受体竞争物处理检测细胞，确定时间，从该时间可以重复测定诱导指示基因的表达。这时培养停止。通常最少需孵育一个小时。细胞数初步决定于测量信号的检出极限和细胞达到的生长期而下限由细胞均匀分配到试验单位的技术能力所限制。使用96孔微滴度板的情况下，每个测试单位约含1000-100000个细胞但如果测量信号适当地灵敏和细胞更精确地分配则细胞数量可以少些。细胞使用的生长期决定于原细胞的类型特性，此外，由涉及的受体初步决定（受体不同时，相同效应系统因细胞生长期不同而活化情况不同强度也不同），细胞生长期和细胞数量可通过预实验中指示基因表达动态的测定和不同生长期的测试细胞而在初步实验中经验地测定。

本发明通过诱导指示基因表达而表明，表达IL-5受体，并能用敏感DNA转化的细胞对IL-5、IL-5受体的天然配体的加入有反应。

(可用大鼠细胞测定, 它们在自然状态下表达 β -亚基并用 α -亚基转化, 也可用人细胞转化, 人细胞自然态地表达功能性IL-5受体所需的 α 和 β -亚基)。所用的敏感DNA作调节成份时, 它或者含有人ICAM-1基因的1.3 kb 5'-调节区(这个区含一个TRE-成份), 或者含有人c-fos基因的0.756 kb 5'-调节区(这个区含一个TRE, 一个CRE和一个SRE)。用IL-3或GM-CSF刺激含有内源IL-3和GM-CSF受体的细胞, 就能测定诱导指示基因的表达。而对不含IL-5受体的(配体结合在受体上) α -亚基的上述所用相同的对照细胞进行处理时, 只有用IL-3或GM-CSF处理才能诱导指示基因表达, 而用IL-5则不能。

本发明提供的是一个灵敏和多功能的方法用于寻找一种在细胞内的存在的特异性地影响依赖于IL-5受体的一个或多个信息传递通路的物质。借助于本发明的方法找到的物质, 用作研究治疗某些疾病药物的引导物(Leitsubstanzen)(这些疾病由于IL-5受体不正常功能, 或者由于IL-5受体不能和信息传递通路偶联而引起), 并在第二次筛选中再进行研究, 例如在有拮抗物存在条件下, 在使用细胞系扩增分析时, 或用原代细胞, 或仅用实验动物以详细研究其药物性质。因而需用的实验动物的数量通过本发明的方法可以大大减少。

本发明方法的优点是: 可作自动分析, 如在作细胞培养器皿的96孔微滴度板中, 加入检测物溶液, 培养和洗涤步骤及测定, 例如, 用荧光素酶作指示基因产物, 用荧光度计测定均可用机器人自动进行, 本发明方法适于高产量的筛选程序, 每周可测2000个物质或混合物质。

借助于本发明的方法，有可能检出变构活性的物质和对配体结合位点非竞争性的作用物。

借助于本发明的方法还有可能进一步克隆具有药理学和生物化学特征的受体和已知的配体。所用原料是cDNA或基因库的，由基因库的转化为相应细胞系。受体通过与配体结合而被活化后通过指示基因表达来指示受体的表达。

附图

图1、敏感NDA质粒PBHluc1.3，含有ICAM-1基因的启动区

图2、敏感NDA质粒PBHfosluci，含有c-fos基因的启动区

图3、通过刺激1H3细胞的受体诱导PBHluc1.3和PBHfosluci

图4、通过刺激鼠FDC-P1细胞受体诱导PBHluc1.3

图5、通过刺激人TF-1细胞受体诱导PBHluc1.3

图6、通过刺激受体诱导TF-1细胞增殖

实施例1

制备具有通过第二信使物质调控成份的指示质粒（敏感DNA）

a) PBHluc1.3质粒的构建

克隆和缺失分析人基因的5'侧1.3kb区的细胞间粘连分子ICAM-1发现，该片段，i)能通过TPA在肺癌细胞系A549(ATCC CCL 185)诱导；ii)这个片段含有一个带有DNA顺序的TGATTCA的TPA反应成份(TRE)(Voraberger等，1991)。PBHluc1.3质粒(图1)含有ICAM-1基因的1.3kb的长调节区，这个区域优先启动荧光素酶基因，制备这个质粒的方法按Voraberger描述的方法进行。

b) PBHfosluci质粒的构建

PBHfosluci质粒含有荧光素酶基因，这个基因位于人c-fos基

因的启动子控制下，这个启动子含有各种调节成份，如TRE，CRE和一个SRE。包括 - fos启动子 (- 711至 + 45位置)的一个片段与pfos-CAT质粒分离 (schonthal等1988)，立即克隆在pBluescriptSK载体 (层基因) 中，并在荧光素酶基因之前插入pBhluc结构里，(Voraberger等，1991)。

pfosCAT质粒 (Schoenthal等，1988)可用Xba I和Hind III切割。分离含有c - fos启动子的756个bp片段，并与用Xba I和Hind III剪切的pBluescriptSK载体结合，一个从大肠杆菌转化后获得的质粒被称为pBS-fos质粒。该质粒用Xba I剪切，该质粒的DNA一端通过加入称为Klenow酶而使全部4个dNTPs “钝化(blunt)”，然后可用Sal I剪切。将这种含有c - fos启动子的Sal II/钝化片段分离。用Hind III剪切pBhluc质粒 (Voraberger等，1991)使DNA端钝化，再用Sal I剪切。这样剪切下来的载体用含有c - fos启动子的Sal I/钝化片段结合，这样经转化大肠杆菌而获得的质粒称为pBHfosluci (图2)。

实施例2

受体介导的敏感DNA的诱导

为了显示在表达IL - 5受体的细胞内，敏感DNA在竞争性作用物质刺激后被诱导，就用敏感DNA质粒 (pBhluc1.3或pBHfosluci)暂时转染鼠和人细胞系细胞：

大鼠1H3细胞是由一种鼠的FDC - P1细胞制备的，因子依赖细胞来源于骨髓细胞 (Dexter等，1980)，用大鼠IL - 5受体的 α - 亚基转化该细胞而得到的1H3细胞，具体方法是：合成一个用于大鼠IL - 5受体 α - 亚基编码的cDNA (Takaki等，1990)，使用从BCL1细胞

系制备的RNA, 在反(Reverse)-转录酶-PCR反应仪上克隆5B1b (ATCC TIB 197)。所用引物是MF71 (SEQ ID NO:1) (5' TCGGCTACCATGGTGCCT-GTG3') 和MF73 (SEQ ID NO:2) (5' ATGGCAAAATGCCATCAAAACGTG3');

它们位于对受体的 α -亚基编码的区域两侧(Takaki等, 1990),

(在顺序报告中合成的寡聚脱氧核糖核苷酸以“cDNS”给出)。在pUC19质粒(Pharmacia)的Sma I剪切位置上亚克隆1272bp PCR-产物。用BamHI和EcoRI切出编码顺序, 并插入用同样酶切出的表达质粒PcD-NAI(体外基因Invitrogen)。用电击转染方法(300V, 960uF, BioRad Gene Pulser)把25 μ g线状质粒转染入 4×10^7 FDC-P1细胞里。

在富含大鼠IL-5的RPMI-1640培养基内选择IL-5受体表达的细胞。与只表达IL-5受体 β -亚基的FCS-P1细胞相反, 1H3细胞表达功能性IL-5受体(α -加 β -亚基)。1H3细胞和FDC-P1细胞有内源的IL-3和GM-CSF受体。IL-5, IL-3和GM-CSF受体的 β -亚基是相似的。

人TF1细胞系是从一个红白血病人的骨髓细胞建立的(Kitamura等, 已有描述)。该细胞系表达IL-5, IL-3和GM-CSF功能性受体, 它们的增殖至少依赖于存在的三个血红细胞生长因子的一个(Kitamura等, 1989, 1991)。

用敏感DNA转染1H3-或TF-1细胞一天后, 在不含因子的培养基, 培养12小时, 接着用受体特异性的配体IL-5处理。作为1H3细胞的阴性对照, 用不能表达功能性IL-5受体的鼠FDC-P1细胞作相同的实验。用IL-3或GM-CSF替代IL-5处理1H3, FDC-P1或TF-1细胞作另外的对照试验。

a) 通过在1H3细胞刺激受体而诱导pBHluc1.3或pBHfosluci

表达功能性IL-5受体的1H3细胞系在37°C, 5% CO₂下, 在RPMI-1640培养基(Gibco)中培养, 该培养基含10%热灭活的胎牛血清(FCS), 1%小鼠滋补添加物 [1M NaCl, 0.1M丙酮酸钠, 11.3M单巯基甘油] 并添加有500单位/ml IL-5(重组大鼠IL-5)。每次转染3×10⁷个细胞, 1000rpm离心细胞5分钟, 并在200 μm完全培养基(含所有添加成份)中悬浮细胞。然后每10⁷个细胞添加15 μg质粒DNA, 加完全培养基到400 μm。用电击法转染细胞(仪器: Biorad基因脉冲器, 电强度: 300V, 960 μF), 然后在有IL-5添加物的新鲜的完全培养基里, 37°C下孵育过夜, 第二天, 用1000rpm离心细胞5分钟, 用不含IL-5的完全培养基洗细胞两次。然后将细胞悬浮在无IL-5的完全培养基里, 并孵育过夜。在进行诱导时, 要把细胞重新离心一次, 在60ml不含IL-5的培养基里, 重新悬浮, 并平分到三个组织培养瓶里。其中一瓶作为阴性对照不被诱导, 它是在不含因子的培养基里, 保持到进行萤光素酶分析时, 另外两瓶或加入约1000单位/ml IL-5, 或加入IL-3。在37°C孵育8小时后, 把细胞离心下来, 用PBS洗后, 加入500 μl解离/分析缓冲液(lyse/Assay-buffer) [25mM麦黄酮(Tricin), 0.5mM EDTA, 0.54mM焦磷酸钠(Natriumtripolyphosphat), 6.5mM DTT, 16.3mM MgSO₄·7H₂O, 0.1% Triton x-100, 1.2mM ATP, 0.05mM萤光素, pH 7.8]。取400 μl(加有20 μl 1mM萤光素)在荧光光度计(Lumat 9501)上测定。实验结果见图3, 结果表明, 两种敏感结构, pBHluc1.3或pBHfosluci可为IL-5诱导多于10倍。用IL-3刺激细胞导致通过内源的IL-3受体同样诱导两个敏感结构。

b) 通过在FDC-P1细胞中刺激受体而诱导pBHluc1.3

FDC - P1细胞系 (Dexter等, 1980)培养的条件(培养基及添加物)完全按a)培养1H3细胞进行, 但是添加约500单位/ml IL - 3代替了IL - 5。如a)那样, 大约 4×10^7 个细胞用每 10^7 个细胞 $15 \mu\text{g}$ pBHluc-1.3 DNA进行电击转染。培养并在不含IL - 3培养基里保温, 同时把细胞均分到四个组织培养瓶里。作为阴性对照瓶, 细胞放在不含因子的培养基里保持到进行荧光素酶分析, 另外三瓶分别用约1000单位/ml IL - 5, IL - 3和GM - CSF处理。孵育8小时后, 按a)描述的方法进行荧光素酶分析, 实验结果示于图4, 在不存在和配体结合的 α - 亚基时, 在仅表达IL-受体的 β - 亚基的FDC - P1细胞内, 敏感DNA pBHluc1.3不能为IL - 5诱导, 相反, 用IL - 3和GM - CSF处理细胞导致通过刺激存在于1H3细胞的内源IL-3和GM - CSF受体而诱导敏感DNA。

c)通过在TF - 1细胞刺激受体而诱导pBHfosluci。

把TF - 1细胞系在 37°C , 5% CO_2 的条件下, 在RPMI - 1640培养基 (Gibco) 里培养, 培养基含10% 热灭活的胎牛血清 (FCS) 并加有1 ng/ml IL - 3。每份转染物含约 3×10^7 个细胞1000rpm离心转染细胞5分钟。把细胞悬浮在 $200 \mu\text{l}$ 有全部添加物的培养基里。每 10^7 个细胞加入 $15 \mu\text{g}$ 质粒DNA后, 用完全培养基加到 $400 \mu\text{l}$, 用电击法转染细胞 (仪器: Biorad基因脉冲器; 电强度: 280V, $980 \mu\text{F}$) 接着在添加有IL - 3的新鲜完全培养基和 37°C 孵育过夜, 第二天, 用1000rpm离心细胞5分钟, 用不含IL - 3的完全培养基洗细胞两次, 将细胞再悬浮在不含因子的完全培养基里并孵育过夜。进行诱导前, 再离心细胞一次, 将细胞再悬浮在不含因子的60ml培养基里, 再平均分到四个组织培养瓶里。其中作为阴性对照的一瓶不进行诱导,

并保持在上述不含因子的完全培养基里直到进行萤光素酶分析为止, 另外三瓶用10ng/ml IL-5或1ng/ml IL-3或100 ng/ml GM-CSF处理。在37℃孵育8小时后, 离心收集细胞, 用PBS洗涤细胞后加入500 μ l裂解/分析缓冲液(25mM麦黄酮、0.5mM EDTA、0.54mM三聚磷酸钠、6.5mM DTT、16.3mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1% Triton x-100、1.2mM ATP、0.05mM萤光素; pH = 7)。取400 μ l(加有20ml, 约1mM萤光素)在荧光光度计(Lumat 9501, Berthold)上测定, 实验结果(见图5)表明, 敏感结构pBHfosluci通过IL-5, 以及通过IL-3和GM-CSF都可被诱导。

d) 通过刺激受体诱导TF-1细胞扩增。

为了表明表达IL-5受体的TF-1细胞用有竞争作用物质的物体刺激后扩增, 把细胞接种在96孔微滴度板里, 两板共加有约 3×10^3 个细胞, 每孔加100 μ l含2%胎牛血清的RPMI-1640培养基。每个板上都有三排不含IL-5作阴性对照, 其它含0.001%, 0.01%和0.1%重组人的IL-5各有三排, 其中在37℃第一板孵育约48小时, 另一板孵育约72小时后, 每孔加入1 μ Ci [$6\text{-}^3\text{H}$]胸腺嘧啶(Amersham)后再孵育12小时, 然后把板放到-20℃直到用Packard FilterMate Cell Harvester和TopCount Microplate液体闪烁计数器测定放射性胸腺嘧啶掺入量, 实验结果示于图6, 在IL-5最高的浓度组(0.1%)孵育48小时后, 胸腺嘧啶的掺加量比对照(不含IL-5的培养基)增加8.1倍, 72小时后比对照增加8.7倍。

参考文献

- Akira, S., Isshiki, H., Sugita, T., Tanabe, O.,
Kinoshita, S., Nishio, Y., Nakajima, T., Hirano,
T. und Kishimoto, T., 1990, EMBO J. 9, 1897-1906.
- Angel, P., Baumann, I., Stein, B., Delius, H.,
Rahmsdorf, H.J. und Herrlich, P., 1987a, Mol.
Cell. Biol. 7, 2256-2266.
- Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra,
R.J., Rahmsdorf, H.J., Jonat, L., Herrlich, P. und
Karin, M., 1987b, Cell 49, 729-739.
- Billah, M.M., Pai, J.-K., Mullmann, T.J., Egan, R.W.
und Siegel, 1989, J. Biol. Chem. 264, 9069-9076.
- Brasier, A.R., Tate, J.E. und Habener, J.F., 1989,
BioTechniques 7, 1116-1122.
- Carroll, M.P., Clark-Lewin, I., Rapp, U.R. und May,
W.S., 1990, J. Biol. Chem. 265, 19812-19817.
- Deutsch, P.J., Hoeffler, J.P., Jameson, J.L. und
Habener, J.F., 1988, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85,
7922-7926.
- De Wet, J.R., Wood, K., DeLuca, M., Helinski, D. und
Subramani, S., 1987, Mol. Cell. Biol. 7, 725-737.
- Devos, R. et al., 1991, EMBO J. 10, 2133-2137.
- Dexter, T.M., Garland, J., Scott, D., Scolnick, E. und
Metcalf, D., 1980, J. Exp. Med. 152, 1036-1047.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan,
H.N., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M., und
Danielsen, M., 1987, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 84,
7413-7417.
- Frohman et al., 1988, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85, 8998-
9002.
- Gillis, S., 1991, Current Opinion in Immunology 3, 315-
319.
- Gritz, L. und Davies, J., 1983, Gene 25, 179-188.

- Hanazono, Y., Chiba, S., Sasaki, K., Mano, H.,
Miyajima, A., Arai, K.-i., Yazaki, Y. und Hirai,
H., 1993, EMBO J. 12, 1641-1646.
- Hartmann, A., 1991, BioTec 5, 40-45.
- Hatakeyama M., Mori, H., Doi, T. und Taniguchi, T.,
1989, Cell 59, 837-845.
- Hatakeyama M., Kawahara, A., Mori, H., Shibuya, H. und
Taniguchi, T., 1992, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 89,
2022-2026.
- Himmler, A., et al., 1993, Journal of Receptor Research
13, 79-94.
- Hipskind, R.A. und Nordheim, A., 1991, J. Biol.
Chemistry 266, 19583-19592.
- Houslay, M.D., 1991, Eur. J. Biochem. 195, 9-27.
- Isfort, R., Huhn, R.D., Frackelton, A.R., Jr. und Ihle,
J.N., 1988, J. Biol. Chem. 263, 19203-19209.
- Jantzen et al., 1987, Cell 49, 29-38.
- Julius, D., Huang, K.N., Livelli, T.J., Axel, R. und
Jessell, T.M., 1990, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 87,
928-932.
- King, K., Dohlman, H.G., Thorner, J., Caron, M.G. und
Lefkowitz, R.J., 1990, Science 250, 121-123.
- Kitamura, T., Tange, T., Terasawa, T., Chiba, S.,
Kuwaki, T., Miyagawa, K., Piao, Y.-F., Miyazono,
K., Urabe, A. und Takaku, F., 1989, J. Cell.
Physiol. 140, 323-334.
- Kitamura, T., Takaku, F. und Miyajima, A., 1991,
International Immunology 3, 571-577.
- Koyasu, S., Tojo, A., Miyajima, A., Akiyama, T.,
Kasuga, M., Urabe, A., Schreurs, J., Arai, K.-i.,
Takaku, F. und Yahara, I., 1987, EMBO J. 6, 3979-
3984.
- Kricka, L.J., 1988, Analyt. Biochem. 175, 14-21.
- Lee, W., Mitchell, P. und Tjian, R., 1987, Cell 49,
741-752.

- Landschulz, W.H., Johnson, P.F. und McKnight, S.L.,
1988, Science 240, 1759-1764.
- Milburn, M.V., Hassell, A.M., Lambert, M.H., Jordan,
St.R., Proudfoot, A.E.I., Graber, P. und Wells
T.N.C., 1993, Nature 363, 172-176.
- Miyajima, A., Kitamura, T., Harada, N., Yokota, T. und
Arai, K., 1992, Annu. Rev. Immunol. 10, 295-311.
- Montmayeur, J.-P. und Borrelli, E., 1991,
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 88, 3135-3139.
- Montminy, M.R., Gonzalez, G.A. und Yamamoto, K.K.,
1990, Trends Neurosci. 13, 185.
- Morla, A.O., Schreurs, J., Miyajima, A. und Wang,
J.Y.J., 1988, Mol. Cell. Biol. 8, 2214-2218
- Mulligan, R. und Berg, P., 1981, Proc.Natl.Acad.Sci.
USA 78, 2072-2076.
- Murata, Y., Yamaguchi, N., Hitoshi, Y., Tominaga, A.
und Takatsu, K., 1990, Biochem. Biophys. Res.
Commun. 173, 1102-1108.
- Murata, Y., Takaki, S., Migita, M., Kikuchi, Y.,
Tominaga, A. und Takatsu, K., 1992, J. Exp. Med.
175, 341-351.
- Potter, H., Weir, L., und Leder, P., 1984,
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 81, 7161.
- Sassone-Corsi, P., Ransone, L.J. und Verma, I.M., 1990,
Oncogene 5, 427-431.
- Satoh, T., Nakafuku, M., Miyajima, A. und Kaziro, Y.,
1991, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 88, 3314-3318.
- Satoh, T., Uehara, Y. und Kaziro, Y., 1992, J. Biol.
Chem. 267, 2537-2541.
- Scheidereit et al., 1986, DNA 5, 383-391.
- Schönthal, A. et al., 1988, Cell 54, 325-334.
- Southern, P. und Berg, P., 1982, J. Mol. Appl. Gen. 1,
327.
- Strähle, U. et al., 1987, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 84,
7871-7875.

- Takaki, S., Tominaga, A., Hitoshi, Y., Mita, S.,
Sonoda, E., Yamaguchi, N. und Takatsu, K., 1990,
EMBO J. 9, 4367-4374.
- Takaki, S., Mita, S., Kitamura, T., Yonehara, S.,
Yamaguchi, N., Tominaga, A., Miyajima, A. und
Takatsu, K., 1991, EMBO J. 10, 2833-2838.
- Tavernier, J., Devos, R., Cornelis, S., Tuypens, T.,
Van der Heyden, J., Fiers, W. und Plaetinck, G.,
1991, Cell 66, 1175-1184.
- Tominaga, A., Takaki, S., Hitoshi, Y. und Takatsu, K.,
1992, BioEssays 14, 527-533.
- Treisman, R., 1985, Cell 42, 889-902.
- Turner R. und Tjian, R., 1989, Science 243, 1689-1694.
- Verma, I.M. und Sassone-Corsi, P., 1987, Cell 51, 513-
514.
- Voraberger, G., Schäfer, R. und Stratowa, Ch., 1991, J.
Immunol. 147, 2777.
- Welham, M.J. und Schrader, J.W., 1992, J. Immunol. 149,
2772-2783.
- Whetton, A.D., Monk, P.N., Consalvey, S.D., Huang,
S.J., Dexter, T.M. und Downes, C.P., 1988,
Proc.Natl.Acad.Sci. USA 85, 3284-3288.
- Wieland, E. et al., 1985, Ärztl. Lab. 31, 203-214.
- Winnacker, E.L., 1985, Gene und Klone, Eine Einführung
in die Gentechnologie, VCH Verlagsges. Weinheim,
264.
- Yamamoto, K.R., 1985, Annu. Rev. Genet. 19, 209-252.
- Cloning Vectors: Chapter VIII, Hsg. Pouwels, Enger-
Valk, Brammer, Elsevier, Amsterdam, New York,
Oxford, 1985.
- Human Pharmacology - Molecular-To-Clinical, Chapter 2:
Sites of Action: Receptors, Hsg. Wingard., L.B.,
Brody, T.M., Larner, J. und Schwartz, A., Mosby
Year-Book Inc., St.Louis, 1991.

顺序报告

(1) 一般资料

(i) 申请人

(A) 姓名Boehringer Ingelheim Internafional GmbH

(B) 街: Postfach 200

(C) 区: Ingelheim am Rhein

(E) 国: 联邦德国

(F) 邮政信箱: 55216

(G) 电话: 06132/772282

(H) 电传: 06132/774377

(ii) 登记标题: 根据对依赖于细胞介素-5受体的细胞信息传递通路的调整作用的物质筛选方法

(iii) 顺序数: 2

(iv) 计算机可读性来自:

(A) 资料放置: Floppy盘

(B) 计算机: IBM-PC兼容机

(C) 工作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: PatentIn发布的第一版1.25号(EPA)

(2) 第一顺序的资料:

(i) 顺序特征:

(A) 长度: 21个碱基对

(B) 种类: 核酸

(C) 链的形式: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子种类: cDNA

(iii) 抗敏性: 不

(ix) 标志

(A) 名字和关键词: 5' UTR

(B) 位置: 1 - 21

(xi) 顺序描述: 顺序号1: TCGGCTACCATGGTGCCTGTG 21

(3) 第二顺序的资料

(i) 顺序特征

(A) 长度: 24个碱基对

(B) 种类: 核酸

(C) 链的形式: 单链

(D) 拓扑学: 线性

(ii) 分子种类: cDNA

(iii) 抗敏性: 不

(ix) 标志

(A) 名字和关键词: 5' UTR

(B) 位置: 1 - 24

(xi) 顺序描述: 顺序号2:

ATGGCAAATGCCATGCCATCAAAACGTG 24

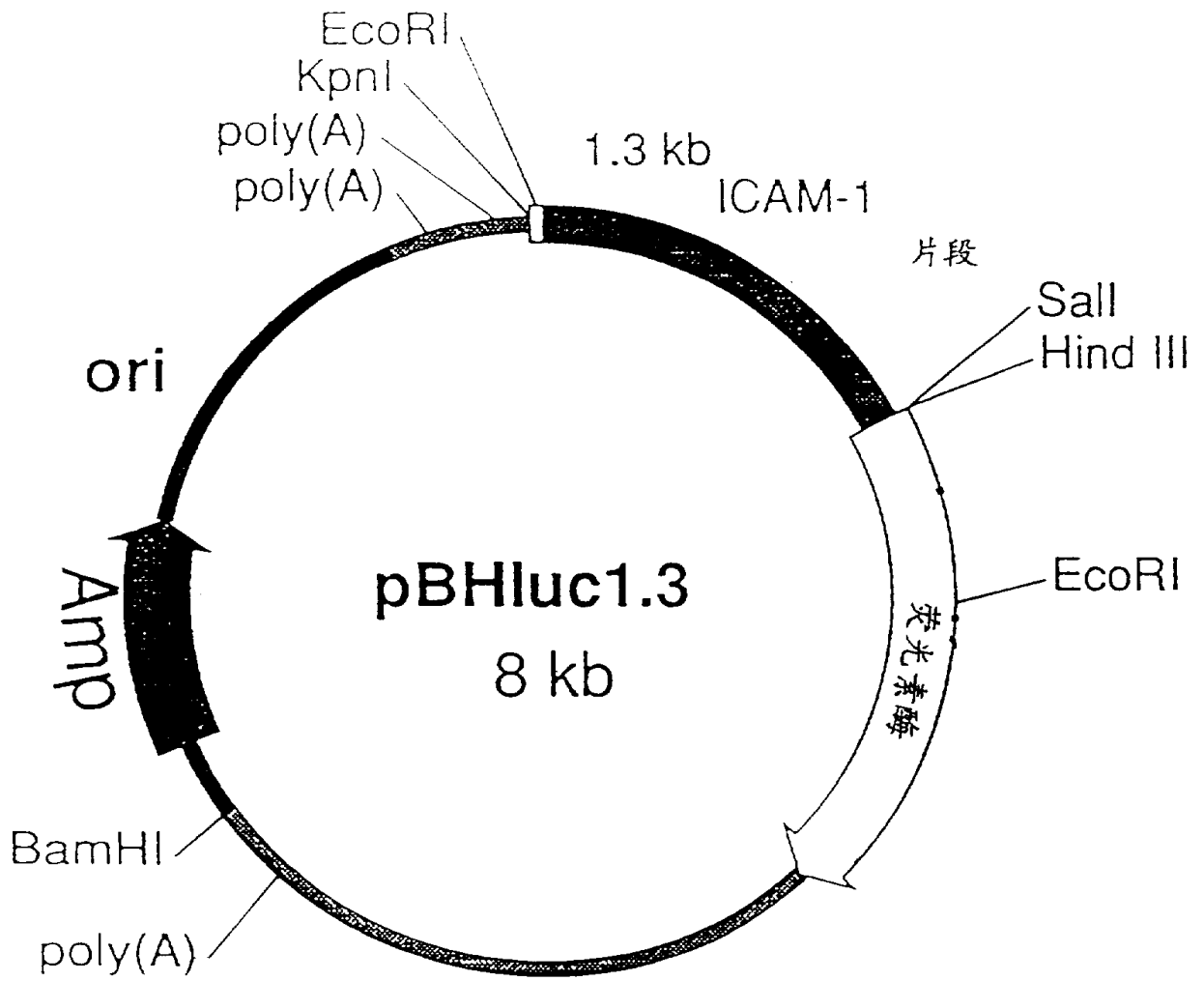


图 1

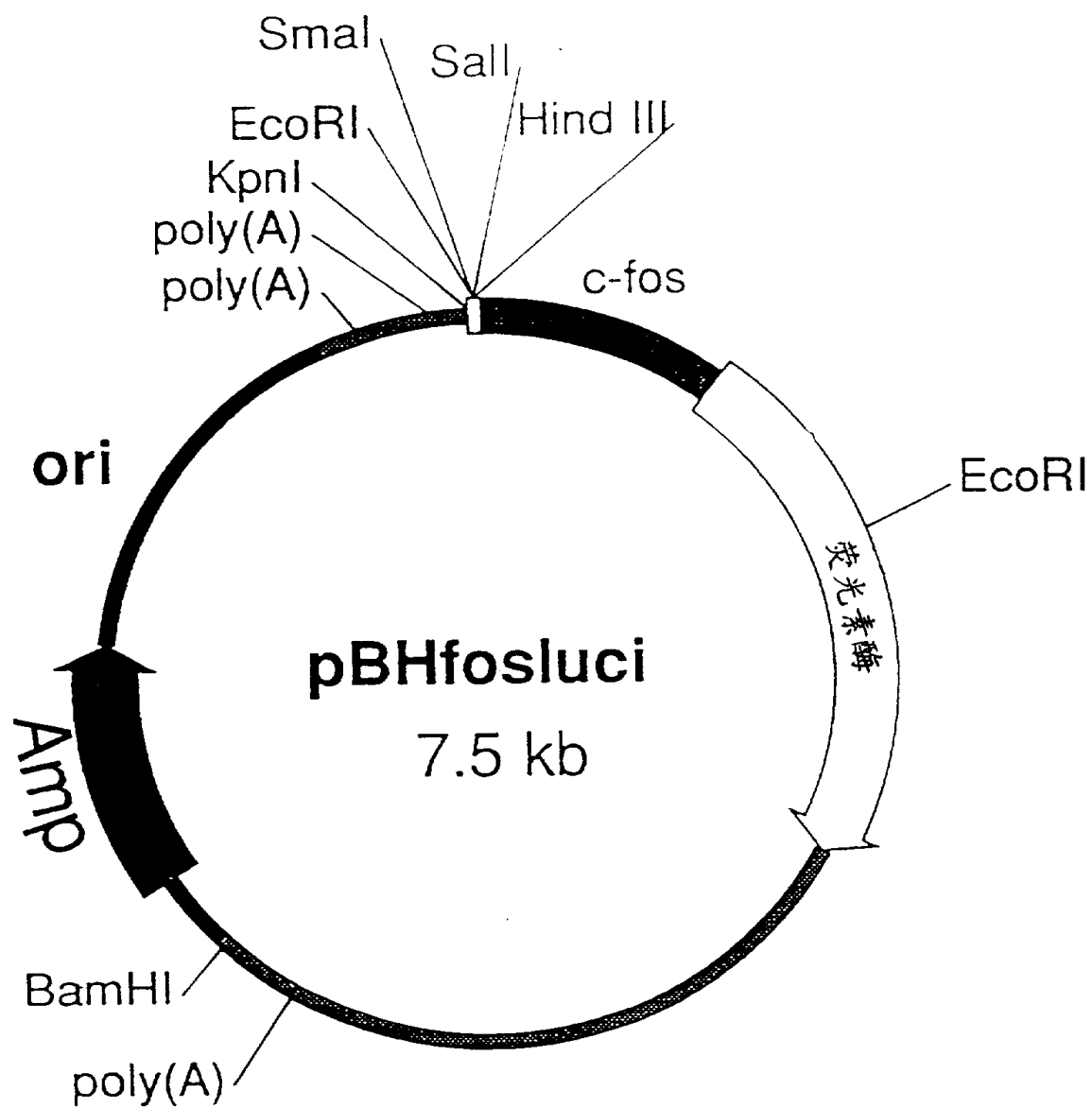


图 2

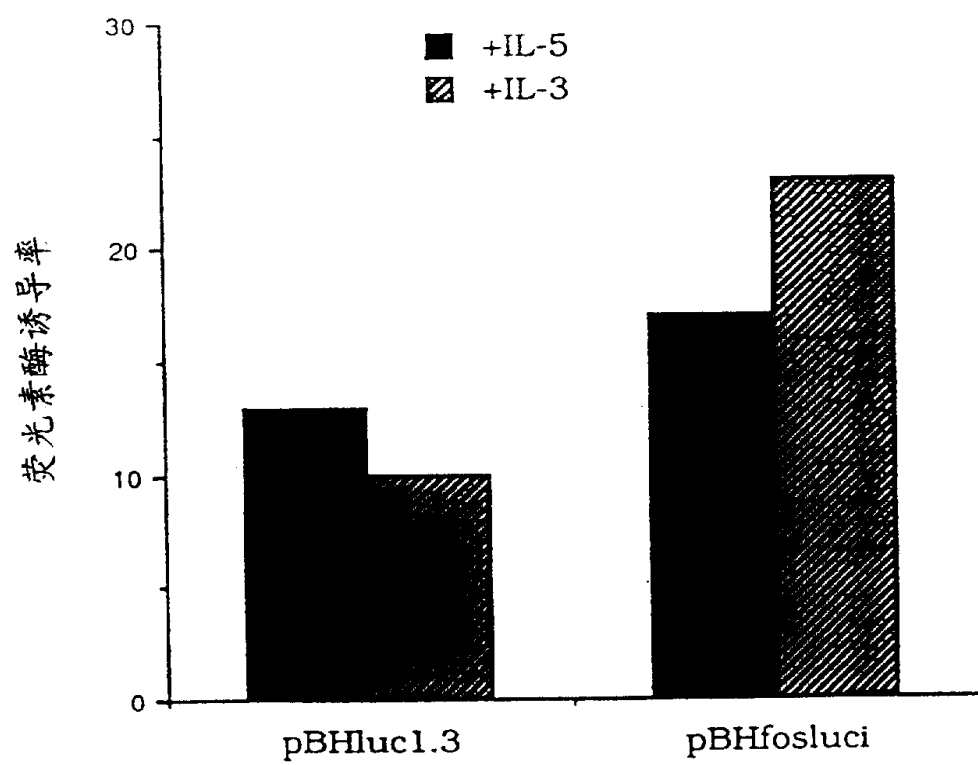


图 3

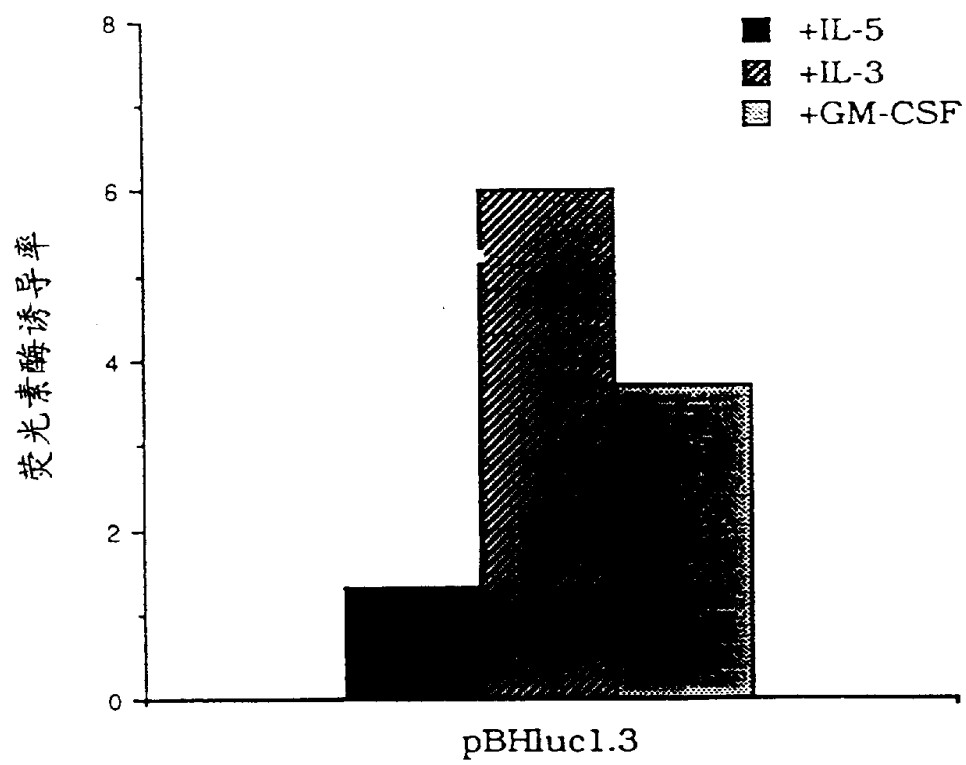


图 4

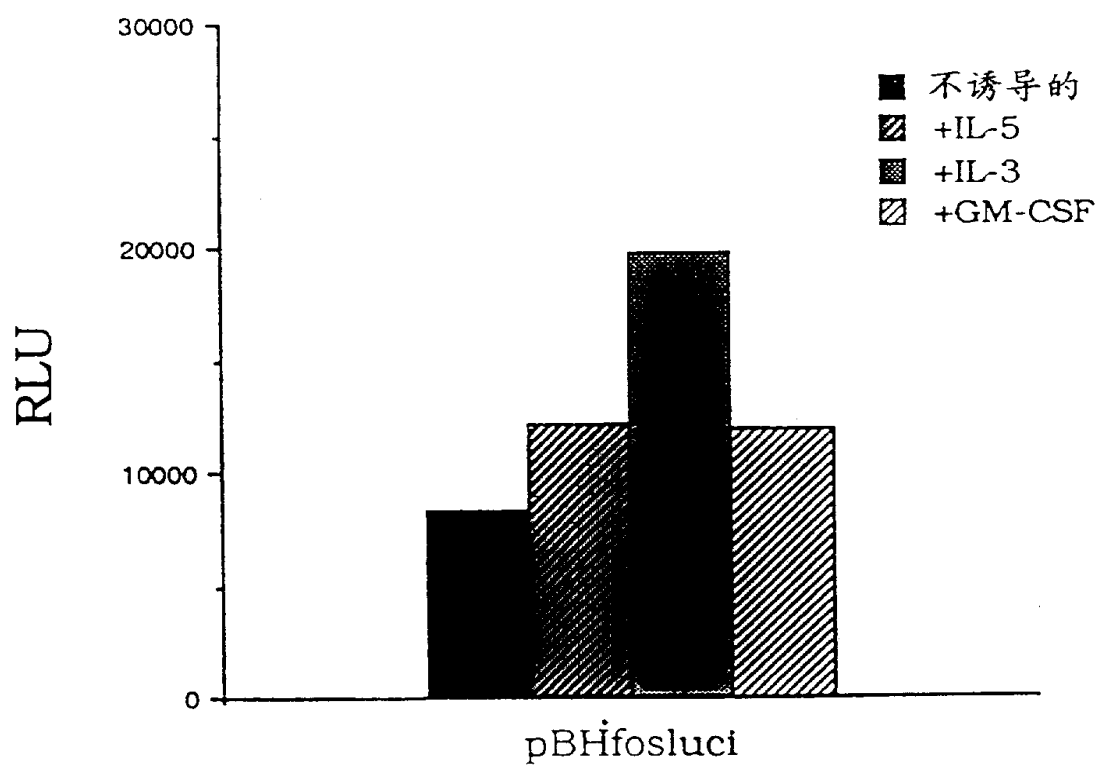


图 5

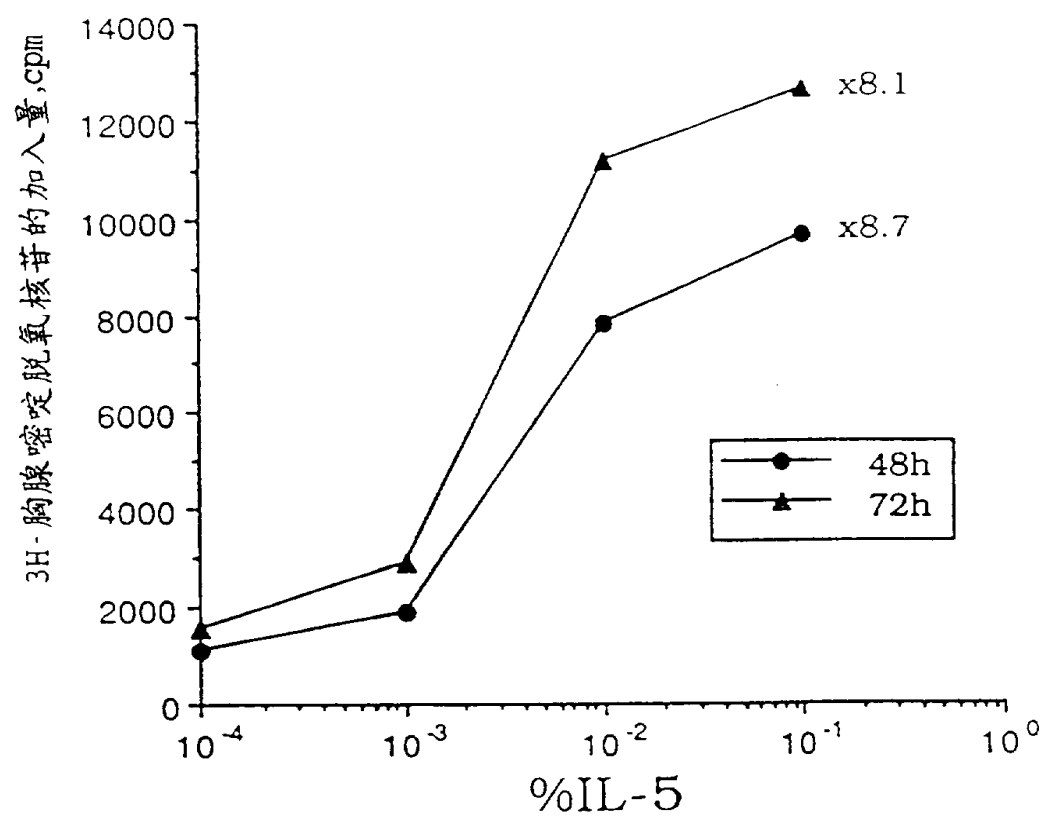


图 6