

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200610090787.0

[51] Int. Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 3 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 100471873C

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/574 (2006.01)

[22] 申请日 2006.6.30

[21] 申请号 200610090787.0

[73] 专利权人 余波

地址 332000 江西省九江市南湖路 35 号
梅园小区 6 栋 1 单元 401 室

[72] 发明人 余波 郑佳

[56] 参考文献

CN1760209A 2006.4.19

Effect of pegylation on pharmaceuticals. J.
Milton Harris 等. Nature Reviews Drug Discovery,
Vol.2. 2003

Multivalent avimer proteins evolved by exon
shuffling of a family of human receptor domains.
Joshua Silverman 等. Nature Biotechnology, Vol. 23
No. 12. 2005

Multivalent avimer proteins evolved by exon
shuffling of a family of human receptor domains.
Joshua Silverman 等. Nature Biotechnology, Vol. 23
No. 12. 2005

审查员 王璟

[74] 专利代理机构 北京华科联合专利事务所

代理人 王为

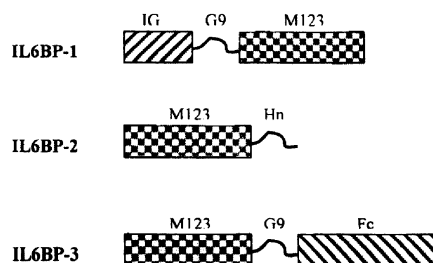
权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一系列可阻断 IL-6 的多肽

[57] 摘要

本发明描述了一系列创新的可抑制 IL-6 的优化多肽蛋白，它们具有高度的生物活性、优异的稳定性、和良好的体内半衰期，可以在体内外高效结合 IL-6，从而阻断 IL-6 的生物作用，可用于治疗多种癌症和自身免疫性疾病，也可用于针对 IL-6 的诊断试剂；本发明包括这些能抑制 IL-6 的优化多肽蛋白、及其编码重组 DNA 序列和表达载体、该重组蛋白的药物用途、含有该重组蛋白的药物及其制剂。



1. 一种融合蛋白质，由可结合人免疫球蛋白的多肽 IG 和可结合 IL-6 的多肽 M123 构成，IG 和 M123 之间由一个优化肽连接段相连，该肽连接段为：Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly，表示为 G9；其中多肽 IG 的氨基酸序列为序列表中 SEQ ID NO.2，多肽 M123 的氨基酸序列为序列表中 SEQ ID NO.1。
2. 如权利要求 1 所述的融合蛋白质，为 IL6BP-1：IG-G9-M123。
3. 编码权利要求 2 的融合蛋白质的重组 DNA，其 DNA 序列见序列表中的 SEQ ID NO.6。
4. 包含权利要求 3 所述重组 DNA 的重组载体，该载体选自质粒、病毒或 DNA 片段。
5. 包含权利要求 4 所述重组载体的重组体，其中宿主细胞是原核细胞或真核细胞。
6. 权利要求 1-2 中任一项所述融合蛋白质在制备治疗癌症或自身免疫性疾病的药物中的应用。
7. 如权利要求 6 的应用，其中所述治疗癌症或自身免疫性疾病的药物是抑制炎症反应的药物。
8. 一种药物组合物，包括如权利要求 1-2 中任一项所述融合蛋白质及药学上可接受的载体。
9. 权利要求 8 所述的药物组合物，是注射剂或鼻腔喷雾剂。
10. 如权利要求 8 所述的药物组合物，其特征在于，还包括任何一种或几种其他的具有协同作用的治疗癌症或抑制炎症反应的药物，所述药物组合物和其他治疗方法一起使用，所述其他治疗方法选自化学疗法、反射疗法、基因疗法。
11. 权利要求 1-2 中任一项所述融合蛋白质在制备诊断癌症或自身免疫性疾病的试剂中的应用。

一系列可阻断 IL-6 的多肽

技术领域

本发明涉及基因工程和蛋白质工程技术领域，具体地说，涉及编码可结合 IL-6 并阻断其信号的创新多肽的 DNA 序列、其所编码的多肽蛋白、该多肽在医疗药物和诊断试剂上的应用。

背景技术

白细胞介素-6 (Interleukin-6, 简称为 IL-6) 是一种多功能的调节免疫和炎症反应的细胞因子，而且在很多人体疾病中起重要作用，包括各种感染、炎症、自身免疫性疾病、和多种癌症 (Ishihara et al, Cytokine Growth Review, 2002, 13: 357-368)。人体内 IL-6 的主要来源是单核细胞、成纤维细胞、内皮细胞，同时 T 细胞、B 细胞、角质细胞、肾系膜细胞、和多种肿瘤细胞也都可以生成 IL-6。IL-6 的生理作用非常复杂，对 B 细胞、T 细胞、骨髓干细胞、嗜中性粒细胞、巨噬细胞、蚀骨细胞等多种细胞的生长、分化、和成熟起重要的调节作用，同时对炎症反应在不同的条件下可以有促进、或抑制的作用。IL-6 的促炎反应和别的促炎因子 (如 $\text{TNF}\alpha$ 和 IL-1) 类似，可以引起发烧和急性期蛋白质 (Acute phase protein) 的生成，包括血清淀粉样蛋白 A (Serum amyloid A)、C 反应蛋白 (C-reactive protein)、 α_1 抗胰蛋白酶 (α_1 antitrypsin)、纤维酶原 (Fibronogen)、触珠蛋白 (Haptoglobin) 等，而 IL-6 抑制炎症反应的作用则是通过抑制促炎因子 $\text{TNF}\alpha$ 和 IL-1 的生成来达到的。

多项研究表明，IL-6 的浓度在多种癌症、自身免疫性疾病、和其他疾病患者体内出现异常升高，而且 IL-6 的作用和这些疾病的症状程度有直接关系，因此阻断 IL-6 的作用是尝试治疗这些疾病的当然选择 (Tripathi et al, Clinical Cancer Research, 2003, 9: 4653-4665)。IL-6 的生物作用是通过和细胞膜表面的受体相结合，引发受体活化，从而把 IL-6 的信号由细胞外传递到细胞内。IL-6 的受体是由二种蛋白 IL-6R 和 GP130 组成的二聚体，阻断 IL-6 信号传递的最有效方法是抑

制 IL-6 与其受体的结合。目前已经有多种阻断 IL-6 或 IL-6 受体的抑制剂正在欧美进行癌症和多种自身免疫性疾病的临床试验，包括类风湿性关节炎（Rheumatoid arthritis）、系统性红斑狼疮（Systemic lupus erythematosus）、克隆病（Crohn's Disease）、幼年型特发性关节炎（Juvenile idiopathic arthritis）等，而且日本在 2005 年已经批准了一个针对 IL-6 受体的单克隆抗体新药 Actemra 以用于治疗 Castleman 病（一种罕见的淋巴增殖性疾病），因此开发阻断 IL-6 的抑制剂在医疗应用上拥有重要意义。

研究表明，一个氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO.1 所述的重组多肽 M123 可以在体外有效地结合 IL-6（Silverman et al, Nature Biotechnology, 2005, 23(12): 1556-1561），但该多肽的生物活性和在人体内的稳定性均不足以满足医疗应用的需要，因此不能直接用于临床。

本发明对此多肽进行了改良，设计并建造了一系列的优化多肽，从而大大增加了其在体内外的稳定性和生物活性，并且具有更长的血清半衰期，从而能够在人体内更有效地中和 IL-6，达到更好的抑制炎症反应的治疗效果。

本发明提供了三种不同的策略对 M123 进行了优化改良，分别得到了更加适合医疗应用的优化多肽。

第一，M123 是个相对较小的多肽，只有共 122 个氨基酸，分子量为 13.3 kD，其在人体内血液中的半衰期预计很短。一种已知的延长 M123 体内半衰期的方法是将其连接一个多肽 IG 形成融合蛋白 C326，IG 的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO.2 所述（Silverman et al, Nature Biotechnology, 2005, 23(12): 1556-1561），由于 IG 具有结合人体免疫球蛋白的功能，因此可以大大提高 C326 在血液中的半衰期。因为融合蛋白 C326 中的 M123 和 IG 是二个完全不同的功能区域，各自必须具备稳定的结构才能保证该融合蛋白具有最佳的结构稳定性和生物活性，而 C326 中连接 M123 和 IG 的肽链 SAPASEPPGSL 没有经过优化选择，不能够保证 M123 和 IG 形成最佳的稳定结构，从而使得 C326 不具备最佳的稳定结构。为了提供一个包含 IG 和 M123 的最佳融合蛋白，本发明设计并建造了一个弹性结构的优化肽连接段 G9 连接于 IG 和 M123 之间，G9 的氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO.3 所述，由于 G9 高度的结构弹性和可塑性，该融合蛋白具有优异的结构稳定

性和生物活性，显著增加了其对 IL-6 的亲合力，大大提高了其医疗应用性。

第二，对蛋白质和多肽进行聚乙二醇修饰（PEGylation）是一种延长药物血清半衰期、及降低其免疫反应的有效方法（Harris et al, *Nature Reviews Drug Discovery*, 2003, 2(3): 214-221），其中常用的化学修饰方法是将聚乙二醇和多肽中唯一的一个自由的胱氨酸（Cystine）相结合，从而可以得到一个只在特定位置联接一个聚乙二醇分子的单一多肽分子。M123 本身不包含自由的胱氨酸，因此本发明将人免疫球蛋白 IgG1 中的铰链（hinge region）N-端包含第一个胱氨酸的短肽链 Hn，其氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO.4 所述，连接到 M123 的 C-端，得到了一个包含 M123 和一个自由胱氨酸的多肽，从而可以在聚乙二醇修饰后进行医疗应用。

第三，利用人免疫球蛋白 Fc 区域形成融合蛋白是一种已经被证明行之有效的医疗应用多肽的策略，不但可以通过 Fc 区域二聚化提高其生物活性，而且因为免疫球蛋白血液中通常高达 3 星期的半衰期，大大延长该融合蛋白的血清半衰期（Chamow SM and Ashkenazi A, *Antibody Fusion Proteins*, 1999, Wiley-Liss）。本发明将 M123 和人免疫球蛋白 Fc 形成了一个融合蛋白，并且在 M123 和 Fc 之间插入了一个弹性结构的优化肽连接段 G9，该融合蛋白在哺乳动物细胞系统表达后二聚化，大大提高了对 IL-6 的亲合力，可达到更佳的治疗效果。

由此，本发明描述了一系列创新的可抑制 IL-6 的优化多肽蛋白，它们可以在体内外高效结合 IL-6，从而阻断 IL-6 的生物作用，可用于治疗多种癌症和自身免疫性疾病，也可用于针对 IL-6 的诊断试剂。

发明内容

本发明目的之一是提供一系列全新的可结合 IL-6 的优化多肽蛋白，其在体内外都具有优良的稳定性和生物活性，并能阻断 IL-6 信号传递，从而抑制炎症的发展。

本发明目的之二是提供编码所述多肽的核苷酸序列。

本发明目的之三是提供含有编码所述多肽的核苷酸序列，其表达载体和由该载体转化的重组体，以及表达细胞。

本发明目的之四是提供该多肽作为抗炎药物在治疗类风湿性关节炎等自身免

疫性疾病中的应用，还有包含上述多肽及可药用载体的药物组合物及其在治疗相关疾病中的应用。

本发明目的之五是提供该多肽作为针对 IL-6 的诊断试剂。

本发明描述的优化的融合蛋白质是通过常规的基因重组技术所建造，具体实验步骤如<<分子克隆>>第三版(Joseph Sambrook, 科学出版社)及类似的实验手册所记载。

本发明的融合蛋白质，由可结合人免疫球蛋白的多肽 IG 和可结合 IL-6 的多肽 M123 构成，IG 和 M123 之间由一个优化肽连接段相连，该肽连接段选自以下组：

- a. Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly，表示为 G9；
- b. 任何一个长度为 4 到 30 的氨基酸序列，其具有弹性结构并能增加融合蛋白的结构稳定性和生物活性。

本发明的融合蛋白质，还可以是，由多肽 M123 和一个多肽短链构成，该肽链选自以下组：

- a. 人免疫球蛋白 IgG1 中的铰链 N-端肽链 Hn，氨基酸序列为 Asp Lys Thr His Thr Cys；
- b. 任何一个包含自由胱氨酸、长度为 4 到 30 的氨基酸序列。

本发明的融合蛋白质，还可以是由多肽 M123 和人免疫球蛋白 IgG1 的 Fc 区域构成。

其中

1. 结合 IL-6 的多肽 M123，氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO.1 所述。
2. 结合人体免疫球蛋白的多肽 IG，氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO.2 所述。
3. 连接 M123 和 IG 的弹性肽连接段 G9，氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO.3 所述。
4. 人免疫球蛋白 IgG1 中的铰链 (hinge region) N-端包含第一个胱氨酸的短肽链 Hn，氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO.4 所述。
5. 人免疫球蛋白 IgG1 中的 Fc 区域，表示为 Fc，氨基酸序列如序列表中 SEQ ID NO.5 所述。

如图 1 所示，本发明提供的融合蛋白质有三种形式，

1. IL6BP-1: IG-G9-M123
2. IL6BP-2: M123-Hn
3. IL6BP-3: M123-G9-Fc

其中 IL6BP-1 和 IL6BP-2 可在细菌中表达，IL6BP-3 可在哺乳动物细胞中表达；其编码 DNA 序列对应于序列表中的 SEQ ID NO.6、7、8。

上述融合蛋白质及其编码 DNA 可通过常规的基因重组技术获得，然后分别克隆到载体中，所用载体可以是分子生物学所常用的质粒、病毒或 DNA 片段。载体序列中包括用于驱动基因表达的启动子、蛋白质翻译起始和终止信号。载体中有抗菌素抗性基因，以利于载体在宿主细胞，如细菌中繁殖。另外，载体中还可以包括真核细胞选择性基因，用于稳定转染宿主细胞株的选择。

由于 M123 和 IG 可以允许一定的氨基酸删除和变异，仍然保持其分别对 IL-6 和人免疫球蛋白的亲和力，所以本发明所涉及的优化多肽的氨基酸序列也可以有一定的变化，它们都属于本发明的范围。

上述优化多肽中的肽连接段 G9 的目的在于提供良好的弹性和可塑性，因此其氨基酸序列和长度都可以有一定的变化，也可以由一个完全随机的肽链文库中筛选而得，它们都属于本发明的范围。

上述优化多肽中的 Fc 来自人免疫球蛋白 IgG1，也可以是亚型 IgG2、IgG3、IgG4、或者人免疫球蛋白 IgM 和 IgA，该免疫球蛋白 Fc 片段可以为 Fc 全长或部分 Fc 序列，如选自 CH2 片断、CH3 片断或绞合区域片段，它们都属于本发明的范围。

在完成含编码上述优化多肽的 DNA 序列的质粒构建以后，即可用该重组载体转染或转化宿主细胞，表达相应的优化多肽。能够用于表达这些优化多肽的表达系统有多种，可以是原核细胞也可以是真核细胞，它们包括（但不限于）细菌、酵母、哺乳动物细胞、昆虫细胞等。含有编码上述优化多肽的重组质粒可经转染进入宿主细胞，转染细胞的方法有多种，其中包括但不限于：电穿孔法 (electroporation)、脂质体介导法、钙介导法等。

由于本发明中的优化多肽 IL6BP-3 的氨基酸序列中包括可糖基化的氨基酸，因此，哺乳动物细胞是其最佳的表达系统。可用于蛋白质大规模表达的哺乳动物细胞有多种，例如 293 细胞、CHO 细胞、SP20 细胞、NS0 细胞、COS 细胞、BHK 细胞或 PerC6 细胞等，许多其他细胞也可用于这些蛋白质的表达和生产，因此都包括在本发明所能使用的细胞之列。一种较佳的表达方法是在已稳定转染的宿主细胞中对重组载体进行基因扩增，以提高相应重组融合蛋白的表达量，例如用含有二氢叶酸还原酶（DHFR）的重组载体稳定转染缺乏 DHFR 的宿主细胞后，可在细胞培养液中增加氨甲喋呤（MTX）的浓度以扩增重组载体在宿主细胞中的拷贝数量；又例如对表达谷氨酰胺合成酶(GS)的稳定转染宿主细胞，利用增加培养液中甲硫氨酸亚砷(MSX)的浓度可扩增重组载体的拷贝数量。

本发明还提供了含有本发明优化多肽和药用载体的药物组合物。该药物组合物可以按照制剂学常规技术制成各种形式的药物制剂，优选的是注射剂，最优选的是冷冻干燥注射剂。

本发明的药物组合物，其中还包括任何一种或几种其他的具有协同作用的抑制炎症反应的药物，所述组合物可以和其他治疗方法一起治疗自身免疫性\炎症性疾病。

本发明还包括，本发明的融合蛋白质在制备治疗癌症或自身免疫性疾病的药物中的应用。其中所述治疗癌症或自身免疫性疾病的药物是抑制炎症反应的药物。

本发明还包括，本发明的融合蛋白质在制备诊断癌症或自身免疫性疾病的试剂中的应用。所述融合蛋白质可以和其他诊断癌症或自身免疫性疾病的方法一起使用。

表 1 列举了 ELISA 实验中 IL-6 结合优化多肽的 EC50。

	IL6BP1	IL6BP2	IL6BP3	C326
EC50 (nM)	6.4	6.9	3.9	13.3
标准偏差 (nM)	0.7	0.7	0.4	2.0

表 2 列举了 ELISA 实验中优化多肽与 IL-6 竞争 IL-6 受体的 EC50。

	IL6BP1	IL6BP2	IL6BP3	C326
--	--------	--------	--------	------

EC50 (pM)	51.2	44.0	22.2	106.8
标准偏差 (pM)	4.0	1.6	0.8	5.8

序列表说明

1. SEQ ID NO.1: 多肽 M123
2. SEQ ID NO.2: 多肽 IG
3. SEQ ID NO.3: 肽连接段 G9
4. EQ ID NO.4: 人免疫球蛋白 IgG1 中的铰链 N-端肽链 Hn
5. SEQ ID NO.5: 人免疫球蛋白 Fc
6. SEQ ID NO.6: IL6BP-1 的编码 DNA
7. SEQ ID NO.7: IL6BP-2 的编码 DNA
8. SEQ ID NO.8: IL6BP-3 的编码 DNA
9. SEQ ID NO.9: C326 的编码 DNA

附图说明

图 1 优化多肽示意图，描述了本发明中优化多肽 IL6BP-1、IL6BP-2、和 IL6BP-3 的蛋白组成结构，其中结合 IL-6 的多肽表示为 M123，结合人免疫球蛋白的多肽表示为 IG，人免疫球蛋白 Fc 区域表示为 Fc，优化肽连接段表示为 G9，人免疫球蛋白 IgG1 中的铰链 N-端肽链表示为 Hn。

图 2 SDS-PAGE 凝胶电泳中的多种优化多肽，显示了在本发明一较佳实施例中提纯后的优化多肽在 SDS-PAGE（十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺）凝胶电泳后、考马斯亮蓝染色的照片。其中第一条带是标准分子量的蛋白质、第二条带是提纯前的 IL6BP-1（17.7 kD）、第三条带是提纯的 IL6BP-1、第四条带是提纯的 IL6BP-2（13.8 kD）、第五条带是提纯的 IL6BP-3（双聚体，82.2 kD）、第六条带是提纯的 C326（18.2 kD）。

图 3 优化多肽和 IL-6 的结合实验，显示了在本发明一较佳实施例中多种优化多肽与 IL-6 在体外结合的试验结果。

图 4 优化多肽阻断 IL-6 和其受体结合的实验，显示了在本发明一较佳实施例中多种优化多肽阻断 IL-6 与其受体相结合的试验结果。

具体实施方式

以下实施例对本发明所涉及的优化多肽构建、试验、和应用作了详细说明，但是本发明的内容及用途并不限制于实例的范围。

实施例 1：克隆编码优化多肽的 DNA 序列及构建重组载体

本发明中多种优化多肽的编码 DNA 是通过聚合酶链反应（PCR）以不同的引物扩增而得。本优选实施例所构建的三种优化多肽的结构见附图 1。

例 1 构建 M123 基因

编码 M123 的 DNA 片段是由一系列 60 bp 或更短的 DNA 寡链核苷酸和 PCR 引物扩增合成而得。首先第一步由以下 DNA 寡链经变性、退火、和 DNA 聚合酶延伸得到 DNA 片段 1（100 bp）：

DNA 寡链 1：5'-TGTCTGCCGGACCAGTTCCGCTGTGGCAATGGCCAGTGT
ATTCCGCTGGATTGGGTGTGT-3'

DNA 寡链 2：5'-CCTCTTCATCCGAATCGTCCGGACAATCATTACGCCA
TCACACACCCAATCCAGCGGAA-3'

第二步用类似方法由以下 DNA 寡链合成 DNA 片段 2（100 bp）：

DNA 寡链 3：5'-GGACGATTCGGATGAAGAGGGCTGTCCACCGCGTA
CCTGTGCGCCGAGCCAGTTCCAGTG-3'

DNA 寡链 4：5'-ATCGCACACCCAGCGCTGCGAAATGCAATAGCCGCT
GCCACACTGGAACTGGCTCGGCGC-3'

第三步以上述 DNA 片段 1 和 2 为模板，和以下引物进行拼接 PCR（Bridge PCR）扩增得到 DNA 片段 3（200 bp）：

引物 1：5'-TGTCTGCCGGACCAGTTCCG-3'

引物 2：5'-TCCTCACAATCATTCTCGCCATCGCACACCCAGCGCTGCG-3'

第四步用类似方法由以下 DNA 寡链合成 DNA 片段 4（100 bp）：

DNA 寡链 5：5'-GGCGAGAATGATTGTGAGGATGGCTCGGATGAGGCC
AACTGTGCAGGCTCCGTACCGACC-3'

DNA 寡链 6：5'-TGCAGCGGCCATTGCGGCACCGGAACTCATCCGACGG
ACAGGTCGGTACGGAGCCTGCAC-3'

第五步用类似方法由以下 DNA 寡链合成 DNA 片段 5（97 bp）：

DNA 寡链 7: 5'- GTGCCGCAATGGCCGCTGCATTCCACGGGCATGGCG
TTGCGATGGCGTGAATGATTGTGC-3'

DNA 寡链 8: 5'- CGTATGCTCTGTACAGTCTTCTTCATCCGAATTATCGG
CACAATCATTACGCCATC-3'

第六步以上述 DNA 片段 4 和 5 为模板, 和以下引物进行拼接 PCR 扩增得到 DNA 片段 6 (177 bp):

引物 3: 5'- GGCGAGAATGATTGTGAGGA-3'

引物 4: 5'- CGTATGCTCTGTACAGTCTT-3'

最后第七步以上述 DNA 片段 3 和 6 为模板, 以引物 1 和 4 进行拼接 PCR 扩增得到编码 M123 的基因 (357 bp), 其编码的蛋白序列如 SEQ ID NO.1 所述。

例 2 构建 IG 基因

编码 IG 的 DNA 片段是由以下二个 DNA 寡链核苷酸寡链经变性、退火、和 DNA 聚合酶延伸合成而得:

DNA 寡链 9: 5'- TGTCACCCTACCGGCCAATTCGTTGTCGGAGCAGCG
GCCGTTGCGTGTACCGACCTGG-3'

DNA 寡链 10: 5'- ACAGTTTTCTTCATCCGAGTTGTCGCCACAGTCATTAT
CGCCATCGCACACCCAGGTCGGTGACACGCAAC-3'

所得的编码 IG 的基因 (111 bp), 其编码的蛋白序列如 SEQ ID NO.2 所述。

例 3 构建 IL6BP-1 基因及重组载体

IL6BP-1 由 IG 和 M123 融合而成, 二者之间为肽连接段 G9。

包含 IG 的 PCR 片段 (168 bp) 是以上述 IG 基因为模板和如下引物扩增而得:

引物 5: 5'- GAGATATACATATGTGTCACCCTACCGGCCAATTCG -3'

引物 6: 5'- TCCACCTCCGCCACCTCCGCCTCCACCACAGTTTTT
TTCATCCGAG-3'

包含 M123 的 PCR 片段 (394 bp) 是以上述 M123 基因为模板和如下引物扩增而得:

引物 7: 5'- GGCGGAGGTGGCGGAGGTGGATGTCTGCCGGACCAGTTC

CGG -3'

引物 8: 5'-GGTGGTGCTCGAGCTACGTATGCTCTGTACAGTCTTC-3'

然后 IG-G9-M123 的融合片段 (541 bp) 是以上述 IG 和 M123 的 PCR 片段为模板, 由引物 5 和 8 拼接 PCR 扩增所得。编码 IL6BP-1 的 DNA 克隆由该 PCR 片段的 NdeI 和 XhoI 酶切产物 (519 bp) 插入到载体质粒 pET24b (Novagen 公司) 的 NdeI 和 XhoI 酶切点所得。该重组质粒利用 T7 启动子来表达 IL6BP-1, 并包含酰那霉素 (Kinamycin) 抗性基因以利于在细菌中的繁殖。将编码 IL6BP-1 的重组质粒转染 E.coli (DH5 α) 后加入 LB 培养基培养过夜, 由 Qiagen 质粒提取试剂盒提取质粒后进行酶切及测序鉴定, 所获得的编码 IL6BP-1 的 DNA 序列如 SEQ ID NO.6 所述。

例 4 构建 IL6BP-2 基因及重组载体

编码 IL6BP-2 的 DNA 是以上述 M123 基因为模板和如下引物扩增而得:

引物 9: 5'-GAGATATACATATGTGTCTGCCGGACCAGTTCCG-3'

引物 10: 5'-GGTGGTGCTCGAGCTAGCATGTGTGAGTTTTGTCCG
TATGCTCTGTACAGTCTTC-3'

将所得 PCR 片段 (405 bp) 的 NdeI 和 XhoI 酶切产物 (383 bp) 插入到载体质粒 pET24b 的 NdeI 和 XhoI 酶切点, 转染 E.coli (DH5 α) 后即可获得编码 IL6BP-2 的重组质粒, 所获得的编码 IL6BP-2 的 DNA 序列如 SEQ ID NO.7 所述。

例 5 构建 IL6BP-3 基因及重组载体

IL6BP-3 由 M123 和人免疫球蛋白 IgG1 Fc 区域融合而成, 二者之间为肽连接段 G9, 其 N 端包含了人 α -乳球蛋白 (α -lactalbumin) 的信号肽以保证其细胞外的分泌。IL6BP-3 的建造是通过拼接 PCR 的方法构造而得。

其中包含 M123 的 PCR 片段 (462 bp) 是首先以上述 M123 基因为模板, 和引物 11 和 12 扩增得到 424 bp 的 DNA 片段, 然后以该 DNA 片段为模板, 以引物 13 和 12 扩增而到:

引物 11: 5'-TCTGCTCCTGGTTGGCATCCTATTCCATGCCACCCAGGCCT
GTCTGCCGGACCAGTTCCG-3'

引物 12: 5'-TCCACCTCCGCCACCTCCGCCTCCACCCGTATGCTC

TGTACAGTCTTC-3'

引物 13: 5'- CCTCGAGAATTCGCAACCACCATGATGTCCTTTGTCTCTCT
GCTCCTGGTTGGCATCC-3'

其中包含 Fc 的 PCR 片段 (722 bp) 是从人淋巴结 cDNA (BD Clontech 公司) 为模板和如下引物扩增而得:

引物 14: 5'- GAGGTGGCGGAGGTGGAGACAAAACCTCACACATGCCC
ACC -3'

引物 15: 5'-AAGGGAATCTAGAGCGGCCGCTCATTTACCCGGAGACA
GGGAG-3'

编码 IL6BP-3 的 DNA 是以上述 462 bp 和 722 bp 的 PCR 片段为模板, 以引物 13 和 15 扩增而得 (1167 bp)。将其 EcoRI 和 NotI 酶切产物 (1141 bp) 插入到载体质粒 pCI-neo (Promega 公司) 的 EcoRI 和 NotI 酶切点后, 转染 E.coli (DH5 α) 即可获得编码 IL6BP-3 的重组质粒, 所获得的编码 IL6BP-3 的 DNA 序列如 SEQ ID NO.8 所述。该重组质粒利用 CMV 启动子来表达 IL6BP-3, 并包含 SV40 的多聚腺苷酸 (PolyA) 序列以保证其最佳的表达量。该重组质粒还包含氨苄青霉素 (Ampicillin) 抗性基因以利于在细菌中的繁殖, 和新霉素 (Neomycin) 抗性基因以用于稳定转染哺乳细胞的选择。

例 6 构建 C326 基因及重组载体

编码 C326 的 cDNA 是以包含 IG 和 M123 的 PCR 片段为模板拼接 PCR 扩增所得。其中包含 IG 的 PCR 片段 (151 bp) 是以上述 IG 基因为模板、以引物 5 和 16 扩增而得:

引物 16: 5'- CCCGGCGGCTCCGATGCCGGTGCGCTACAGTTTTTC
TTCATCCGAG-3'

包含 M123 的 PCR 片段 (400 bp) 是以上述 M123 基因为模板、以引物 8 和 17 扩增而得:

引物 17: 5'- CCGGCATCGGAGCCGCCGGGCTCGCTGTGTCTGCC
GGACCAGTTCCG-3'

最后包含 C326 的 PCR 片段 (531 bp) 是以上述包含 IG 和 M123 的 PCR 片段

为模板，由引物 5 和 8 拼接 PCR 扩增所得。编码 C326 的 DNA 克隆由该 PCR 片段的 NdeI 和 XhoI 酶切产物（509 bp）插入到载体质粒 pET24b（Novagen 公司）的 NdeI 和 XhoI 酶切点所得。转染 E.coli（DH5 α ）后即可获得编码 C326 的重组质粒，其 DNA 序列如 SEQ ID NO.9 所述。

实施例 2：优化多肽在细胞中的表达和提纯

优化多肽 IL6BP-1 和 IL6BP-2 可在原核细胞内大量表达，提纯后具有优异的稳定性和生物活性，而 IL6BP-3 是和人免疫球蛋白 Fc 区域的融合蛋白，其肽链需要得到糖基化修饰，因此，哺乳动物细胞是其最佳的表达系统。

IL6BP-1、IL6BP-2、和 C326 的表达和提纯

分别将编码 IL6BP-1、IL6BP-2、和 C326 的重组质粒转染至大肠杆菌 BL21(DE3)GOLD（Stratagene 公司）后，在培养基 2xYT 中、37°C 条件下、摇晃培养至 OD₆₀₀ 为 0.6，加入 IPTG 至 500 μ M 后继续培养三个小时以表达该优化多肽。细胞离心沉淀分离后，均匀打散于 5 倍的 TBS-Ca（10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM CaCl₂）缓冲液中后，在 80°C 的水浴中裂解细胞 15 分钟，离心沉淀后，上清液中优化多肽的比例可高达 60%，然后通过二步离子交换层析柱的方法可提纯至 99%以上。第一步是 DEAE-Sepharose 层析柱（Amersham 公司），第二步是 Q-Sepharose 层析柱（Amersham 公司），二步层析均是利用 100mM-1M 的 NaCl 梯度洗脱，洗脱液中还包含 10 mM Tris, pH 7.5, 和 1mM CaCl₂。纯化后的蛋白可用 A280 吸收法确定浓度，并可置-20° C 长期储存，其 SDS-PAGE 凝胶电泳显示于图 3。

IL6BP-3 的表达和提纯

将编码 IL6BP-3 的重组高纯度质粒利用 Lipofectamine 2000 质粒转染药盒（Invitrogen 公司）导入 CHOS 细胞（Invitrogen 公司）中，在无血清培养液 CHOS SFMII（Invitrogen 公司）中培养二天后加入新酶素，用有限密度稀释法进行克隆培养，大约 14 天后挑取新酶素抗性克隆进行细胞的扩大培养并在液氮中冷冻收藏。稳定转染后的 CHOS 细胞可在转鼓培养瓶中培养生产 IL6BP-3，其浓度可用 ELISA 法定量确定。

包含 IL6BP-3 的细胞培养液可采取葡萄球菌 A 蛋白亲和层析的方法进行纯

化。将蛋白 A-Sepharose 层析柱以 PBS 缓冲液洗以平衡后,以 2 毫升/分钟的速度将超滤器浓缩过的培养液上样,用 PBS 缓冲液洗直至未结合的蛋白全被洗脱(以 A280 进行监测),然后用 100mM 的柠檬酸(PH 3)洗脱结合蛋白,立刻以足够的 2M Tris 进行中和。纯化后的融合蛋白可用 ELISA 法或 A280 吸收法确定浓度,并可置-20° C 长期储存,其 SDS-PAGE 凝胶电泳显示于图 3。

实施例 3: 优化多肽与 IL-6 的体外结合实验

本发明利用生物素(Biotin)标记的 IL-6(R&D Systems 公司)来检测优化多肽和 IL-6 的直接结合,以及其阻断 IL-6 和 IL-6 受体的结合,从而达到抑制 IL-6 的生物活性的目的。所有的实验中均以 C326 为参照,以比较优化多肽和 C326 的生物活性。

IL6BP-1、IL6BP-2、和 IL6BP-3 与 IL-6 的 ELISA 结合实验

在本实验中,以每孔 100 μ l 的 30 nM 的优化多肽 IL6BP-1、IL6BP-2、IL6BP-3、或 C326 为底物直接加样至 ELISA 板孔底部,然后加入不同浓度的 Biotin-IL-6 温育后,再加酶结合物 Streptavidin-HRP 以检测结合的 IL-6,最后加 TMB 显色,比色仪测量的结果原始实验结果在图 3 中显示,其中优化多肽与 IL-6 的结合度和信号强度成正比,经 Prism4 软件(GraphPad 公司)Sigmoidal 非线性拟合后所得到的 EC50 及其标准偏差在表 1 中显示。C326 可以有效地和 IL-6 直接结合,其 EC50 在本实验中为 13.3 nM,而 IL6BP-1 和 IL6BP-2 的 EC50 分别为 6.4 nM 和 6.9 nM,表示这二种优化多肽对 IL-6 的亲合力比 C326 提高了一倍。同时 IL6BP-3 是二聚体,其 EC50 为 3.9 nM,更加显著地增高了对 IL-6 的亲合力。

IL6BP-1、IL6BP-2、和 IL6BP-3 阻断 IL-6 和 IL-6 受体的结合实验

IL-6 的受体是由 IL-6R 和 GP130 组成的,为了检验本发明的优化多肽是否能有效地阻断 IL-6 和其受体的结合,从而抑制 IL-6 的信号传递,本实验首先以每孔 100 μ l 的 30 nM IL-6R(R&D Systems 公司)为底物加样至 ELISA 板孔底部,然后加入 2 nM 的 GP130(R&D Systems 公司)、1 nM 的 Biotin-IL-6、和不同浓度的优化多肽共同温育,最后加酶结合物 Streptavidin-HRP 以检测结合的 IL-6, TMB 显色后的原始实验结果显示于图 4,经 Prism4 软件 Sigmoidal 非线性拟合后所得到的 EC50 及其标准偏差在表 2 中显示。由于本实验测量的是优化多肽和 IL-6 受体对

IL-6 的相互竞争, 因此优化多肽与 IL-6 的结合度和信号强度成反比。C326 阻断 IL-6 与其受体相结合的 EC50 为 106.8 pM, 而 IL6BP-1、IL6BP-2、和 IL6BP-3 的 EC50 分别为 51.2 pM、44.0 pM、和 22.2 pM。此结果和上述优化多肽和 IL-6 直接结合的实验结果保持一致, IL6BP-1 和 IL6BP-2 这二种优化多肽对 IL-6 的亲合力比 C326 提高了大约一倍, IL6BP-3 则比 C326 提高了大约 5 倍。

综上所述, 本发明所提供的优化多肽IL6BP-1、IL6BP-2、和IL6BP-3具有优良的结构稳定性和生物活性、显著地提高了对IL-6的亲合性、并能有效地阻断IL-6和其受体的结合, 大大提高了它们在医疗应用和诊断试剂的可用性。

实施例 4: IL6BP-1 注射剂

按制剂学常规技术将 IL6BP-1 和药物可接受的载体混合, 冷冻干燥。

实施例 5: IL6BP-2 注射剂

按制剂学常规技术将 IL6BP-1 和药物可接受的载体混合, 冷冻干燥。

实施例 6: IL6BP-3 注射剂

按制剂学常规技术将 IL6BP-1 和药物可接受的载体混合，冷冻干燥。

序列表

<110>余波

<120>一系列可阻断 IL-6 的创新多肽及其医疗应用

<160>9

 $\langle 210 \rangle 1$

<211>119

<212>PRT

〈213〉人工序列

 $\langle 400 \rangle 1$

Cys Leu Pro Asp Gln Phe Arg Cys Gly Asn Gly Gln Cys Ile Pro Leu

1

5

10

15

Asp Trp Val Cys Asp Gly Val Asn Asp Cys Pro Asp Asp Ser Asp Glu

20

25

30

Glu Gly Cys Pro Pro Arg Thr Cys Ala Pro Ser Gln Phe Gln Cys Gly

35

40

45

Ser Gly Tyr Cys Ile Ser Gln Arg Trp Val Cys Asp Gly Glu Asn Asp

50

55

60

Cys Glu Asp Gly Ser Asp Glu Ala Asn Cys Ala Gly Ser Val Pro Thr

65

70

75

80

Cys Pro Ser Asp Glu Phe Arg Cys Arg Asn Gly Arg Cys Ile Pro Arg

85

90

95

Ala Trp Arg Cys Asp Gly Val Asn Asp Cys Ala Asp Asn Ser Asp Glu

100

105

110

Glu Asp Cys Thr Glu His Thr

115

119

<210>2

<211>37

<212>PRT

<213>人工序列

<400>2

Cys His Pro Thr Gly Gln Phe Arg Cys Arg Ser Ser Gly Arg Cys Val Ser Pro

1

5

10

15

Thr Trp Val Cys Asp Gly Asp Asn Asp Cys Gly Asp Asn Ser Asp Glu Glu Asn

20

25

30

35

Cys

37

<210>3

<211>9

<212>PRT

<213>人工序列

<400>3

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

1 5 9

<210>4

<211>6

<212>PRT

<213>人工序列

<400>4

Asp Lys Thr His Thr Cys

1 5 6

<210>5

<211>226

<212>PRT

<213>人工序列

<400>5

Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro

1 5 10 15

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr

20 25 30 35

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys

40 45 50

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg

55 60 65 70

Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His

75 80 85

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu

90 95 100 105

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 110 115 120 125
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 130 135 140
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 145 150 155 160
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 165 170 175
 Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
 180 185 190 195
 Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 200 205 210 215
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 220 225 226

<210>6

<211>501

<212>DNA

<213>人工序列

<400>6

1 atgtgtcacc ctaccggcca atttagatgc cgcagtagcg gcagatgcgt ttcaccgacc
 61 tgggttttgcg acggcgataa tgattgtggg gacaactcgg atgaagaaaa ctgtggtgga
 121 ggcgagggtg gcgagggtgg atgtctgccg gaccagttcc ggtgcggcaa cggccaatgc
 181 attccactgg actgggtttg cgacggcggtt aatgattgtc cggacgactc ggatgaagaa
 241 ggctgtccac cgcgtacgtg tgcgccgagc cagttccagt gcggcagcgg ctactgcatt
 301 icacagcget gggttttgcga cggcgaaaat gattgtgagg acggctcgga tgaagcaaac
 361 tgtgcagget ccgtacctac gtgtccgtcg gacgagttcc ggtgcagaaa cggccgctgc
 421 attccacggg cctggcgttg cgacggcgta aatgattgtg cggacaactc ggatgaagaa
 481 gactgtacag agcatacgta g

<210>7

<211>381

<212>DNA

<213>人工序列

<400>7

```
1  atgtgtctgc cggaccagtt ccggtgcggc aacggccaat gcattccact ggactggggtt
61  tgcgacggcg ttaatgattg tccggacgac tcggatgaag aaggctgtcc accgcgtacg
121  tgtgcgccga gccagttcca gtgcggcagc ggctactgca ttccacagcg ctgggtttgc
181  gacggcgaaa atgattgtga ggacggctcg gatgaagcaa actgtgcagg ctccgtacct
241  acgtgtccgt cggacgagtt ccggtgcaga aacggccgct gcattccacg ggcctggcgt
301  tgcgacggcg taaatgattg tgcggacaac tcggatgaag aagactgtac agagcatacg
361  gacaaaactc acacatgcta g
```

<210>8

<211>1125

<212>PRT

<213>人工序列

<400>8

```
1  atgatgtcct ttgtctctct gctcctgggt ggcatcctat tccatgccac ccaggcctgt
61  ctgccggacc agttccgggt cggcaacggc caatgcattc cactggactg ggttttgcgac
121  ggcgttaatg attgtccgga cgactcggat gaagaaggct gtccaccgcg tacgtgtgcg
181  ccgagccagt tccagtgcgg cagcggctac tgcatttcac agcgtgggt ttgcgacggc
241  gaaaatgatt gtgaggacgg ctcggatgaa gcaaactgtg caggctccgt acctacgtgt
301  ccgtcggacg agttccgggt cagaaacggc cgctgcattc cacgggcctg gcgttgcgac
361  ggcgtaaatg attgtgcgga caactcggat gaagaagact gtacagagca tacgggtgga
421  ggcggaggtg gcggaggtgg agacaaaact cacacatgcc caccgtgccc agcacctgaa
481  ctcttggggg gaccgtcagt ctctctcttc ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc
541  tcccggacce ctgaggtcac atgcgtgggt gtggacgtga gccacgaaga cctgaggtic
601  aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag
```

661 gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg
721 ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag ccttcccagc ccccatcgag
781 aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca
841 tcccgggagg agatgaccaa gaaccaggtc agcctgacct gcctgggtcaa aggtttctat
901 cccagcgcaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc
961 acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct atagcaagct caccgtggac
1021 aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgtccg tgatgcatga ggctctgcac
1081 aaccactata cgcagaagag cctctccctg tctccgggta aatga

<210>9

<211>507

<212>DNA

<213>人工序列

<400>9

1 atgtgtcacc ctaccggcca atttcgttgt cggagcagcg gccgttgcgt gtcaccgacc
61 tgggtgtgcg atggcgataa tgactgtggc gacaactcgg atgaagaaaa ctgtagcgca
121 ccggcatcgg agccgccggg ctgctgtgt ctgccggacc agttccgctg tggcaatggc
181 cagtgtattc cgctggattg ggtgtgtgat ggcgtgaatg attgtccgga cgattcggat
241 gaagagggct gtccaccgcg tacctgtgcg ccgagccagt tccagtgtgg cagcggctat
301 tgcatttcgc agcgtcgggt gtgcgatggc gagaatgatt gtgaggatgg ctcgatgag
361 gccaaactgtg caggetccgt accgacctgt ccgtcggatg agttccggtg ccgcaatggc
421 cgctgcattc cacgggcatg gcgttgcat ggcgtgaatg attgtgccga taattcggat
481 gaagaagact gtacagagca tacgtag

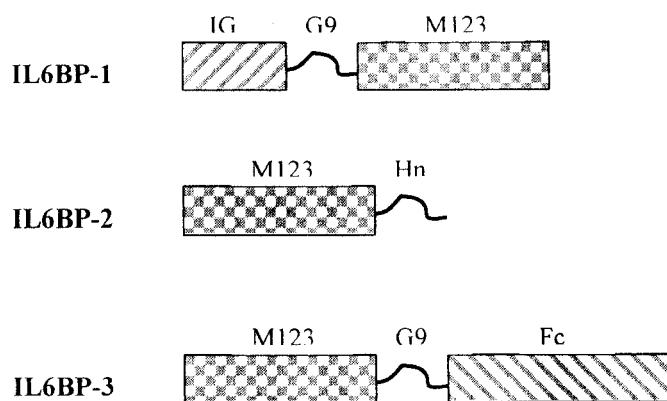


图 1

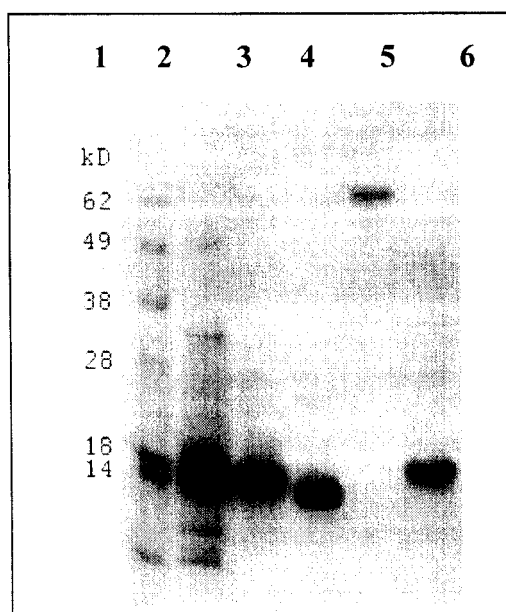


图 2

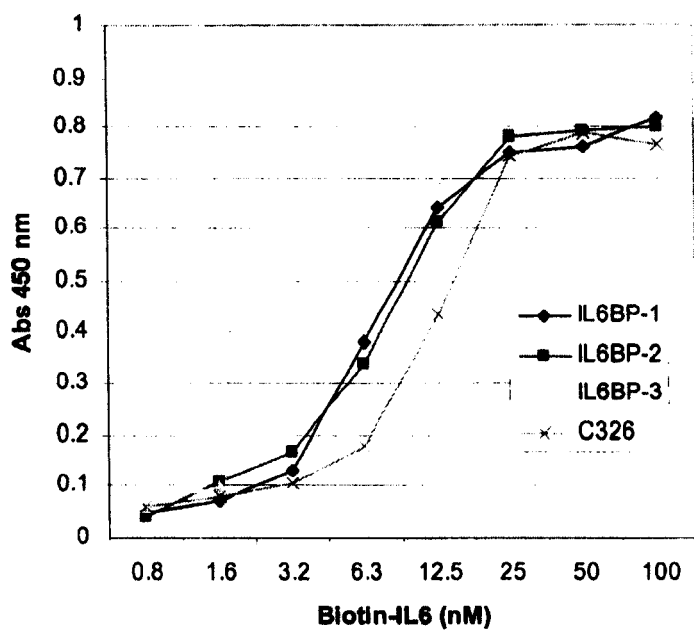


图 3

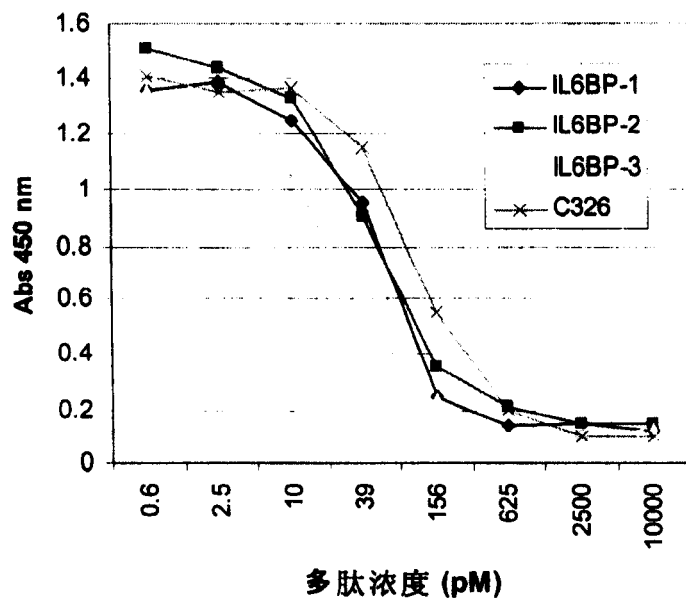


图 4

专利名称(译)	一系列可阻断IL - 6的多肽		
公开(公告)号	CN100471873C	公开(公告)日	2009-03-25
申请号	CN200610090787.0	申请日	2006-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	于波		
申请(专利权)人(译)	余波		
当前申请(专利权)人(译)	余波		
[标]发明人	余波 郑佳		
发明人	余波 郑佳		
IPC分类号	C07K19/00 A61K38/16 A61P35/00 A61P37/02 A61P29/00 G01N33/53 G01N33/574		
代理人(译)	王为		
审查员(译)	王璟		
其他公开文献	CN1876684A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明描述了一系列创新的可抑制IL-6的优化多肽蛋白，它们具有高度的生物活性、优异的稳定性、和良好的体内半衰期，可以在体内外高效结合IL-6，从而阻断IL-6的生物作用，可用于治疗多种癌症和自身免疫性疾病，也可用于针对IL-6的诊断试剂；本发明包括这些能抑制IL-6的优化多肽蛋白、及其编码重组DNA序列和表达载体、该重组蛋白的药物用途、含有该重组蛋白的药物及其制剂。

74] 专利代理机构 北京华科联合专利事务所
代理人 王 为

权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 2 页

