

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-501944

(P2011-501944A)

(43) 公表日 平成23年1月20日 (2011.1.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
C O 7 K 14/715 (2006.01)	C O 7 K 14/715	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 H O 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 30 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-529287 (P2010-529287)	(71) 出願人	505470960
(86) (22) 出願日	平成20年10月15日 (2008.10.15)		コナリス リサーチ インスティテュート
(85) 翻訳文提出日	平成22年6月16日 (2010.6.16)		アーゲー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/008736		ドイツ連邦共和国 キール 2 4 1 1 8
(87) 国際公開番号	W02009/049881		シャウエンブルガーシュトラッセ 1 1 6
(87) 国際公開日	平成21年4月23日 (2009.4.23)	(74) 代理人	230104019
(31) 優先権主張番号	07020512.5		弁護士 大野 聖二
(32) 優先日	平成19年10月19日 (2007.10.19)	(74) 代理人	100106840
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 森田 耕司
(31) 優先権主張番号	08009648.0	(74) 代理人	100105991
(32) 優先日	平成20年5月27日 (2008.5.27)		弁理士 田中 玲子
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)	(74) 代理人	100119183
			弁理士 松任谷 優子
		(74) 代理人	100114465
			弁理士 北野 健
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 改善された結合活性をもつ可溶性 g p 1 3 0 変異蛋白質

(57) 【要約】

可溶性の g p 1 3 0 ポリペプチド単量体及び二量体が記載され、1つの好ましい態様では、g p 1 3 0 の N - 末端 I g 様ドメインの3つのアミノ酸残基 T h r₁₀₂、G l n₁₁₃、又は A s n₁₁₄ の少なくとも1つが、各々 T y r₁₀₂、P h e₁₁₃、又は L e u₁₁₄ に変異されている。これらの変異は、単独で又は組合せて、インターロイキン - 6 と可溶性のインターロイキン - 6 受容体から構成されるリガンド複合体に対する g p 1 3 0 の結合を特異的に増強し、したがって g p 1 3 0 変異蛋白質の生物学的活性を増大する。1つの特に好ましい態様においては、3つの変異全てが組み合わされて、三重変異蛋白質 T h r₁₀₂ T y r / G l n₁₁₃ P h e / A s n₁₁₄ L e u (T 1 0 2 Y / Q 1 1 3 F / N 1 1 4 L) を生ずる。さらに、前記単量体又は二量体を含有する医薬組成物、及び様々な医療用途を記載する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

糖蛋白質 g p 1 3 0 の全細胞外部分、又はその変異体若しくはフラグメントを含むポリペプチドであって、作動性の複合体 I L - 6 / s I L - 6 R の活性を阻害することができ、ここで、T h r₁₀₂は、大きい中性のアミノ酸残基により置換され、及び / 又は、G l n₁₁₃は、疎水性及び非極性のアミノ酸残基により置換され、及び / 又は A s n₁₁₄は、疎水性及び非極性アミノ酸残基により置換されている、前記ポリペプチド。

【請求項 2】

以下の置換：T h r 1 0 2 T y r (T 1 0 2 Y)、G l n 1 1 3 P h e (Q 1 1 3 F)、及び A s n 1 1 4 L e u (N 1 1 4 L)、の少なくとも 1 つによって特徴づけられる、請求項 1 に記載のポリペプチド。

10

【請求項 3】

T h r 1 0 2 T y r (T 1 0 2 Y)、G l n 1 1 3 P h e (Q 1 1 3 F)、又は A s n 1 1 4 L e u (N 1 1 4 L) の変異うちの任意の 2 つが組合されて、二重変異蛋白質 T h r 1 0 2 T y r / G l n 1 1 3 P h e (T 1 0 2 Y / Q 1 1 3 F)、T h r 1 0 2 T y r / A s n 1 1 4 L e u (T 1 0 2 Y / N 1 1 4 L)、及び G l n 1 1 3 P h e / A s n 1 1 4 L e u (Q 1 1 3 F / N 1 1 4 L) を生じる、請求項 2 に記載のポリペプチド。

【請求項 4】

3 つの変異 T h r 1 0 2 T y r (T 1 0 2 Y)、G l n 1 1 3 P h e (Q 1 1 3 F)、及び A s n 1 1 4 L e u (N 1 1 4 L) の全てが組合されて、三重変異蛋白質 T h r 1 0 2 T y r / G l n 1 1 3 P h e / A s n 1 1 4 L e u (T 1 0 2 Y / Q 1 1 3 F / N 1 1 4 L) を生じる、請求項 2 に記載のポリペプチド。

20

【請求項 5】

前記ポリペプチドが直接又はポリペプチドリinkerを介してタグに融合されている、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の変異した g p 1 3 0 ポリペプチド。

【請求項 6】

前記変異した g p 1 3 0 ポリペプチドと、その融合パートナーとを連結しているポリペプチドリinkerが、柔軟であり、グリシン、セリン、アスパラギン、トレオニン、及びアラニンからなる群より独立して選択される 2 ないし 5 0 個のアミノ酸残基を含む、請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

30

【請求項 7】

1 つ以上の N - グリコシル化部位が、変異した g p 1 3 0 ポリペプチドとタグとの間、変異した g p 1 3 0 ポリペプチドとリンカーとの間、及び / 又は、リンカーとタグとの間に挿入されている、請求項 1 ないし 6 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

前記ポリペプチドが P E G 付加されている、請求項 1 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

前記ポリペプチドが、化学的又は物理的結合により互いに結合されている 2 つの単量体をもつ二量体である、請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載のポリペプチド。

40

【請求項 10】

前記 2 つの単量体が同一である、請求項 9 に記載のポリペプチド二量体。

【請求項 11】

前記 2 つの単量体が、単純な共有結合、柔軟なポリペプチドリinker、又は 1 個以上のジスルフィド架橋によって互いに結合されている、請求項 9 又は 10 に記載のポリペプチド二量体。

【請求項 12】

前記単量体が、ジスルフィド架橋により連結されており、これらは前記単量体を 1 個以上の遊離のアクセス可能なシステイン残基を含む天然産又は人工のポリペプチドに融合させることにより生成される、請求項 11 に記載のポリペプチド二量体。

50

【請求項 13】

前記ポリペプチドが、免疫グロブリン蛋白質のFcドメインに融合されている、請求項9ないし12のいずれか1項に記載のポリペプチド二量体。

【請求項 14】

前記免疫グロブリンがIgGである、請求項13に記載のポリペプチド二量体。

【請求項 15】

前記IgG蛋白質がIgG1である、請求項14に記載のポリペプチド二量体。

【請求項 16】

請求項1ないし15のいずれか1項に記載のポリペプチドをコードしているポリヌクレオチド。

10

【請求項 17】

前記ポリヌクレオチドの配列が、原核生物若しくは真核生物宿主細胞における、又は無細胞発現系における、コードされたポリペプチドの産生についてコドン最適化されている、請求項16に記載のポリヌクレオチド。

【請求項 18】

請求項16又は17に記載のポリヌクレオチドを含有する発現ベクター。

【請求項 19】

請求項18に記載の発現ベクターを含有する、宿主細胞又は無細胞発現系。

【請求項 20】

請求項1ないし15のいずれか1項に記載のポリペプチド単量体又は二量体を製造する方法であって、宿主細胞を培養し、又は請求項19に記載の無細胞発現系を使用し、そして、前記宿主細胞、培地、又は無細胞発現系から前記ポリペプチド単量体又は二量体を回収及び精製することを含む前記方法。

20

【請求項 21】

請求項1ないし15のいずれか1項に記載のポリペプチド単量体若しくは二量体、請求項16若しくは17に記載のポリヌクレオチド、又は請求項18に記載の発現ベクターを含有する医薬組成物。

【請求項 22】

作動性の複合体IL-6/sIL-6Rのブロックが有益な効果をもつ疾患又は障害の、治療及び/又は予防用の医薬組成物の調製のための、請求項1ないし15のいずれか1項に記載のポリペプチド単量体若しくは二量体、請求項16若しくは17に記載のポリヌクレオチド、又は請求項18に記載の発現ベクターの使用であって、ここで、前記疾患が、骨再吸収、高カルシウム血症、悪液質、腫瘍若しくは他のタイプの癌、自己免疫疾患、炎症性又はアトピー性疾患、感染症、敗血症、内分泌障害、又は代謝性若しくは異化性疾患である前記使用。

30

【請求項 23】

請求項1ないし15のいずれか1項に記載のポリペプチドに結合する抗体であって、前記ポリペプチドの変異したペプチドモチーフ又は特異的リンカー領域に特異的である前記抗体。

【請求項 24】

請求項23に記載の抗体の、請求項1ないし15のいずれか1項に記載のポリペプチドに対する結合の検出に基づく診断法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、インターロイキン-6(IL-6)とその可溶性受容体(sIL-6R)から構成されるリガンド複合体に対して改善された結合活性をもつ、糖蛋白質gp130ポリペプチドの変異蛋白質(mut ein)に関する。特に、各々がIgG蛋白質のFcドメインに融合している、gp130細胞外ドメイン(可溶性gp130、sgp130)の2つの同一の変異蛋白質を含むポリペプチド二量体(sgp130Fc)は、改善され

50

た生物学的活性を示す。本発明はまた、変異した s g p 1 3 0 ポリペプチド (s g p 1 3 0 変異蛋白質) 又はその二量体を含有する医薬組成物、及び様々な医療用途に関する。

【背景技術】

【0002】

多面発現性サイトカインであるインターロイキン - 6 (I L - 6) は、広範囲の生物学的機能を示し、その中で最も顕著なものは、B細胞を刺激し、肝臓において急性期の蛋白質合成を誘導することである。I L - 6 は、4 - ヘリックスバンドル型サイトカインのファミリーに属する。このサイトカインの構造は、1本の長いループ (A B)、1本の短いループ (B C)、及び再び1本の長いループ (C D) によって連結された、4つのヘリックス (A、B、C、及び D) からなる。I L - 6 は、細胞表面で、I L - 6、I L - 6 受容体 (I L - 6 R)、及び2つの g p 1 3 0 分子から構成される複合体を介してシグナルを伝達する (非特許文献 1)。この複合体のリガンド誘導性の活性化は、会合したヤヌスキナーゼ (J A K) の活性化につながり、これは、それら自身及び g p 1 3 0 の細胞質部分をリン酸化する (非特許文献 2)。可溶性型の I L - 6 R (s I L - 6 R) は、交互スプライシング又はシェディングのいずれかにより産生され、これもまた I L - 6 と複合体形成した場合、g p 1 3 0 の二量体化及びシグナリングを誘発することができる。

10

【0003】

I L - 6 R の細胞質部分はシグナル伝達に寄与しないことから、g p 1 3 0 ホモ二量体によるシグナリングは、膜結合型又は可溶性の I L - 6 R と複合体形成した I L - 6 によって誘導することができる。しかしながら、s I L - 6 R の存在は、I L - 6 反応性細胞にリガンドに対する感受性化をもたらす。さらに、I L - 6 に厳密に依存するハイブリドーマ細胞は、培地中に存在する s I L - 6 R が連続的に除去される場合、ごく少量の I L - 6 に応答して増殖しない。

20

【0004】

I L - 6 の他にも、g p 1 3 0 は、4 - ヘリックスバンドルサイトカインファミリーの別のメンバー、例えば、I L - 1 1、白血病阻害因子 (L I F)、カルディオトロピン様サイトカイン (C L C)、オンコスタチン M (O S M)、毛様体神経栄養因子 (C N T F)、カルディオトロピン - 1 (C T - 1)、及びニューロポエチン (N P N)、又は最近記載されたサイトカイン I L - 2 7 によっても使用される。これらのサイトカインは全て、2つ又は3つの部分からなる受容体複合体を介して作用し、シグナリングは、ホモ二量体化 (I L - 6 及び I L - 1 1 について)、又は g p 1 3 0 の、例えば L I F - R とのヘテロ二量体化 (L I F については、C T - 1、O S M、C L C、及び C N T F) によって誘発される。したがって、これらのサイトカインは、様々な組織において、同様の生物学的活性を媒介する。

30

【0005】

g p 1 3 0 は、ほとんど全ての細胞タイプに見出すことができるが、I L - 6 R は、はるかに制限された発現を示す。1つの細胞タイプによる s I L - 6 R の放出は、g p 1 3 0 のみ発現する別の細胞を、I L - 6 に対して反応性にさせる。このプロセスは、トランスシグナリングと呼ばれる。実際、s I L - 6 R と I L - 6 との複合体を必要とし、I L - 6 単独では観察されない、いくつかの細胞活性が記載されている。デザイナーサイトカインである H y p e r - I L - 6 (H - I L - 6) では、s I L - 6 R の C - 末端は、柔軟なペプチドリンカーにより、成熟 I L - 6 の N - 末端に共有結合によって融合されている (非特許文献 3)。I L - 6 / s I L - 6 R の複合体に見られるように、H - I L - 6 も g p 1 3 0 のみを発現する細胞に対して作用する。別々の成分である I L - 6 及び s I L - 6 R とは対照的に、この融合分子は、同等の生物学的シグナルを誘導するのに 1 0 0 ないし 1 0 0 0 倍低い濃度で充分である。I L - 1 1 は、g p 1 3 0 ホモ二量体を介してシグナリングする別のサイトカインである。I L - 1 1 受容体は可溶性型では存在しないことから、トランスシグナリングを示さない。可溶性の g p 1 3 0 蛋白質は、ヒト血漿中に高濃度で構成的に見出され、I L - 6 トランスシグナリングの天然の緩衝剤及び阻害剤として機能する。

40

50

【 0 0 0 6 】

種々の疾患又は障害の治療には、可溶性 I L - 6 R に依存する I L - 6 応答の特異的ブロックが望ましいであろう。このような疾患としては、骨再吸収、高カルシウム血症、悪液質、腫瘍又は他のタイプの癌（例えば、結腸癌、多発性骨髄腫、リンパ腫、白血病、ホジキン病、又はキャッスルマン病）、自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症（M S）、1 型糖尿病、又は紅斑性狼瘡）、炎症性又はアトピー性疾患（例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、リウマチ様関節炎、若年性リウマチ様関節炎、喘息、乾癬、サルコイドーシス、ぶどう膜炎、又はアレルギー性結膜炎）、感染症（例えば、細菌、ウイルス、真菌、又は他の病原体による）、敗血症、並びに内分泌障害、及び代謝性若しくは異化性疾患（例えば、2 型糖尿病、肥満症、高血糖症、又は高コレステロール血症）が挙げられる。例えば、s g p 1 3 0 二量体又は s g p 1 3 0 F c 二量体は、作動性の（a g o n i s t i c）I L - 6 / s I L - 6 R 複合体の作用を阻害するべくデザインされた治療用途に有用であることが見出された。

10

【 0 0 0 7 】

I L - 6 の、（可溶性又は膜結合型の）I L - 6 R 及び g p 1 3 0 と接触している領域は、部位 I、I I、及び I I I と呼ばれる。I L - 6 R は、I L - 6 の部位 I に結合する。コレセプターである g p 1 3 0 は、背の高いサイトカイン受容体のクラスに属し、この受容体のリガンド結合ドメインと膜貫通領域との間に、3 つのフィブロネクチンドメイン（D 4 - D 6）を示す（非特許文献 4）。g p 1 3 0 のリガンド結合ドメインもまた、3 つのドメイン（D 1 - D 3）、すなわち、N - 末端免疫グロブリン（I g）様ドメイン（D 1）、及び 2 つのフィブロネクチン・タイプ I I I 様ドメイン（D 2 及び D 3）から構成され、このうちの後者は、サイトカイン結合モジュールと呼ばれる（非特許文献 5）。g p 1 3 0 の N 末端 I g 様ドメインは I L - 6 の部位 I I I と接触するのに対し、g p 1 3 0 のサイトカイン結合モジュールは部位 I I に結合する。六量体複合体（I L - 6 / I L - 6 R / g p 1 3 0）₂ の三次元構造が解明された（非特許文献 6）。しかしながら興味深いことに、I L - 6 の部位 I I I はまだ完全には解明されていない。ヘリックス A の C - 末端部分及び A B ループの N - 末端部分は解明されていないが、この領域は、I L - 6 と g p 1 3 0 との間の相互作用部位の部分である。改善された結合活性をもつ s g p 1 3 0 変異体は、これまでに記載されていない。

20

【 先行技術文献 】

30

【 非特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 非特許文献 1 】 K i s h i m o t o ら、B l o o d、1 9 9 5 年、第 8 6 巻、p . 1 2 4 3 - 5 4。

【 非特許文献 2 】 D a r n e l l、S c i e n c e、1 9 9 7 年、第 2 7 7 巻、p . 1 6 3 0 - 5。

【 非特許文献 3 】 F i s c h e r ら、N a t . B i o t e c h n o l . 1 9 9 7 年、第 1 5 巻、p . 1 4 2 - 5。

【 非特許文献 4 】 S p r a n g 及び B a z a n、C u r r . O p i n . S t r u c t . B i o l . 1 9 9 3 年、第 3 巻、p . 8 1 5 - 2 7。

40

【 非特許文献 5 】 G r o t z i n g e r ら、B i o l . C h e m . 1 9 9 9 年、第 3 8 0 巻、p . 8 0 3 - 1 3）。

【 非特許文献 6 】 B o u l a n g e r ら、S c i e n c e、2 0 0 3 年、第 3 0 0 巻、p . 2 1 0 1 - 4）。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

したがって、本発明の根底にある技術的問題は、改善された結合活性をもつ s g p 1 3 0 変異蛋白質を提供することであり、これを用いて、高い生物学的活性をもち、したがって、高い治療効果と低い有効治療用量及び医薬製造における低い製品コストをもつ、治療

50

用の s p g 1 3 0 ポリペプチド又は二量体、例えば、s g p 1 3 0 F c を構築することができる。

【課題を解決するための手段】

【0010】

前記の技術的問題は、クレームにおいて特徴づけた態様を提供することにより解決される。g p 1 3 0 の N - 末端 I g 様ドメインの 3 つのアミノ酸残基 (T h r ₁₀₂、G l n ₁₁₃、及び A s n ₁₁₄) は、上記記載の未知の相互作用領域の方に向いており、これらを、より強い相互作用の可能性を検出する目的で、変異誘発用にした (図 1 に示した変異を参照)。驚いたことに、3 つの明らかに非保存的なアミノ酸の交換 (T h r ₁₀₂ を T y r ₁₀₂ に変異、略して T h r 1 0 2 T y r、若しくは T 1 0 2 Y ; G l n ₁₁₃ を P h e ₁₁₃ に変異、略して G l n 1 1 3 P h e、若しくは Q 1 1 3 F ; 又は、A s n ₁₁₄ を L e u ₁₁₄ に変異、略して A s n 1 1 4 L e u、若しくは N 1 1 4 L) により、結合活性及び親和性における顕著な相対的増加が発見された。このことは、野生型の相互作用部位は、I L - 6 / (s) I L - 6 R 複合体に対して、最適よりもずっと下の親和性レベルまでしか進化していなかったことを示している。g p 1 3 0 は、多くの多様なリガンドに結合することから、このことは、全てのリガンドに適応するべく進化した構造上の妥協の結果であるのかもしれない。さらに、本発明に記載される変異の効果は、ヒト I L - 6 / (s) I L - 6 R / g p 1 3 0 構造に特異的であることが示される。

10

【図面の簡単な説明】

【0011】

20

【図 1】図 1 は、g p 1 3 0 の N - 末端ドメインの変異蛋白質を示す。g p 1 3 0 の N - 末端免疫グロブリン (I g) 様ドメインの、アミノ酸残基 T h r ₁₀₂、G l n ₁₁₃、及び A s n ₁₁₄ を変異させた。T h r ₁₀₂ の T y r ₁₀₂ への (変異 T 1 0 2 Y)、G l n ₁₁₃ の P h e ₁₁₃ への (変異 Q 1 1 3 F) ; 及び A s n ₁₁₄ の L e u ₁₁₄ への (変異 N 1 1 4 L) 非保存的变化は、単独及び組合せのいずれとも、s g p 1 3 0 F c 二量体の結合活性を改善した (図 3 参照)。

【図 2】図 2 は、野生型及び変異蛋白質 s g p 1 3 0 F c 二量体の蛋白質標品の未変性ポリアクリルアミドゲルの銀染色を示す。野生型 s g p 1 3 0 F c と比較して、改善された結合活性を示す変異体は、凝集体 (副産物) の形成を増大しなかった。3 つのシングル変異蛋白質 (T h r 1 0 2 T y r 又は T 1 0 2 Y ; G l n 1 1 3 P h e 又は Q 1 1 3 F ; A s n 1 1 4 L e u 又は N 1 1 4 L)、1 つの二重変異蛋白質 (T h r 1 0 2 T y r / G l n 1 1 3 P h e、又は T 1 0 2 Y / Q 1 1 3 F)、及び三重変異蛋白質 (T h r 1 0 2 T y r / G l n 1 1 3 P h e / A s n 1 1 4 L e u、又は T 1 0 2 Y / Q 1 1 3 F / N 1 1 4 L) についての代表的なデータを示す。

30

【図 3】図 3 は、野生型及び変異蛋白質 s g p 1 3 0 F c 二量体による、B A F 3 / g p 1 3 0 細胞の I L - 6 / s I L - 6 R 誘導性増殖の阻害を示す。s g p 1 3 0 F c 変異蛋白質は、1 0 0 n g / m L の I L - 6 および 5 0 n g / m L の s I L - 6 R (A) 又は 1 n g / m L の H y p e r - I L - 6 (B) によって誘発される B A F 3 / g p 1 3 0 細胞増殖のブロックについて、野生型 s g p 1 3 0 F c よりも有意に高い生物学的活性をもつ。三重変異蛋白質 T h r 1 0 2 T y r / G l n 1 1 3 P h e / A s n 1 1 4 L e u (T 1 0 2 Y / Q 1 1 3 F / N 1 1 4 L) の I C ₅₀ は、全てのアッセイにおいて、野生型の I C ₅₀ の少なくとも 3 倍低い。(A) 比色 M T S アッセイ。(B) s g p 1 3 0 F c 変異蛋白質間の、ほぼ 3 オーダーを超える活性差異の一貫性を例示するための、より高感度の蛍光測定セルタイター - ブルー (C e l l T i t e r - B l u e) アッセイ。略語及び記号：セルタイター - ブルー、蛍光性レゾルフィン (励起 5 3 0 n m、発光 5 9 0 n m)、セルタイター - ブルーの基質であるレザズリンの細胞代謝による変換産物として；I C ₅₀、5 0 % の阻害効力をもつ濃度；I L - 6、インターロイキン - 6；I / R、I L - 6 プラス s I L - 6 R；M T S、代謝活性のある細胞により 4 9 0 n m に吸収をもつ可溶性のフォルマザン産物へ変換される基質；O D、4 9 0 n m における光学密度；s I L - 6 R、可溶性のインターロイキン - 6 受容体。

40

50

【図4】図4は、野生型 $sgp130Fc$ 及び変異蛋白質 $T102Y/Q113F/N114L$ による、細胞アッセイにおける急性期応答の阻害を示す。 $IL-6/sIL-6$ に対する急性期応答を、ハプトグロビン $ELISA$ により、 $5ng/mL$ の $Hyper-IL-6$ で刺激したヒト $HepG2$ 肝癌細胞の上清を用いて測定した。ハプトグロビン分泌は、野生型 $sgp130Fc$ (斜線) 又は三重変異蛋白質 $T102Y/Q113F/N114L$ (塗り潰し) の量を増やしていくことにより用量依存的に阻害され、後者は有意に強い阻害活性を示した (***、 $p < 0.001$; **、 $p < 0.01$; *、 $p < 0.05$)。 $Abs. [A.U.]$ 、 $450nm$ における吸収。

【図5】図5は、 $Hyper-IL-6$ の、野生型 $sgp130Fc$ 及び三重変異蛋白質 $T102Y/Q113F/N114L$ に対する反応速度定数及び親和性を示す。反応速度定数は、表面プラズモン共鳴を用いて、 $Protein XPR36$ 蛋白質相互作用アレイシステム (バイオラド (Bio-Rad)) にて測定した。

【図6】図6は、全ヒト、又はマウス/ヒト複合体における、 $gp130$ 、 $IL-6$ 、及び $sIL-6R$ の相互作用部位の分子モデリングを示す。左のパネル (「ヒト」) では、ヒト野生型 (wt) $gp130$ 及び変異体 $Q113F$ と、ヒト $IL-6$ 及びヒト $sIL-6R$ との間の相互作用が示されている。右パネル (「マウス」) は、マウス $IL-6$ 及び $sIL-6$ との、各相互作用を示す。全ヒト複合体では、芳香族クラスターが形成され、これが、 $Q113F$ を含有する変異蛋白質の親和性増大の原因であると仮定される。

【図7】図7は、 $BAF3/gp130$ 細胞の $IL-6/sIL-6R$ 誘導性増殖の阻害：野生型 $sgp130Fc$ 及び三重変異蛋白質 $T102Y/Q113F/N114L$ 、並びにヒト及びマウス $IL-6/sIL-6R$ の比較を示す。 $BAF3/gp130$ 細胞の増殖と、野生型 $sgp130Fc$ 又は変異蛋白質 $T102Y/Q113F/N114L$ によるその阻害を、ヒト又はマウス $IL-6/sIL-6R$ 複合体に対する応答において測定した (MTSアッセイ)。 OD 、 $490nm$ における光学密度。

【図8】図8は、急性炎症のマウス空気嚢モデルにおける、野生型 $sgp130Fc$ 及び三重変異蛋白質 $T102Y/Q113F/N114L$ の比較を示す。 $C57BL/6$ マウスに、 $10\mu g$ の野生型 $sgp130Fc$ 、 $10\mu g$ の三重変異蛋白質 $T102Y/Q113F/N114L$ 、又は担体コントロールとしての PBS を腹腔内注射し、6時間後にカラギーナンを注射した。カラギーナン注射の72時間後、全細胞数 (A)、及び好中球及び単核食細胞数 (B) を、フローサイトメトリーにより測定した。炎症性空気嚢中の、組換え $sgp130Fc$ 蛋白質レベル (C)、及びケモカイン $MCP-1$ レベル (D) を、 $ELISA$ によって測定した。全ての値は、5ないし9匹の動物の平均値 $\pm SD$ を表わす。 $MCP-1$ 、単球化学的誘引蛋白質 - 1。

【発明を実施するための形態】

【0012】

したがって本発明は、作動性の $IL-6/sIL-6R$ 複合体の活性を阻害することができ、糖蛋白質 $gp130$ の全細胞外部分、又はその変異体若しくはフラグメントを含むポリペプチドであって、ここで、 $gp130$ の N -末端 Ig 様ドメインの3つのアミノ酸残基、 Thr_{102} 、 Gln_{113} 、又は Asn_{114} の少なくとも1つが別のアミノ酸残基によって置換されている該ポリペプチドに関する。 $gp130$ の完全な細胞外ドメインの変異蛋白質又はその変異体若しくはフラグメントは、可溶性の単量体又は二量体として存在し、作動性の複合体 $IL-6/sIL-6R$ を、野生型の可溶性 $gp130$ と比較して高い結合活性をもって阻害することができ、かつ、直接又はポリペプチドリナーを介して免疫グロブリン重鎖の Fc ドメイン又は他のタグに融合させることができる。

【0013】

本発明のポリペプチドの1つの好ましい態様においては、

(a) Thr_{102} は、大きい中性のアミノ酸残基、例えば、 Tyr 、 Trp 、 Leu 、 Ile 、 Phe 、又は Met によって置換されており；

(b) Gln_{113} は、疎水性及び非極性のアミノ酸残基、例えば、 Phe 、 Trp 、 Ile 、 Leu 、 Met 、 Val 、又は Ala によって置換されており；及び/又は

10

20

30

40

50

(c) Asn_{114} は、疎水性及び非極性アミノ酸残基、例えば、 Phe 、 Trp 、 Ile 、 Leu 、 Met 、 Val 、又は Ala によって置換されている。

【0014】

さらに好ましい態様においては、本発明の可溶性 $gp130$ 変異蛋白質は、 $gp130$ の N - 末端 Ig 様ドメインに以下の変異の少なくとも1つを含む： Thr_{102} を Tyr_{102} に変異（略して $Thr102Tyr$ 、又は $T102Y$ ）、 Gln_{113} を Phe_{113} に変異（略して $Gln113Phe$ 、又は $Q113F$ ）、又は、 Asn_{114} を Leu_{114} に変異（略して $Asn114Leu$ 、又は $N114L$ ）。

【0015】

用語「可溶性」は、本明細書で用いるとき、細胞内ドメインを欠失している、好ましくは膜貫通ドメインを欠失している、 $gp130$ ポリペプチドを指す。

【0016】

本発明の可溶性 $gp130$ ($sgp130$) 単量体又は二量体は、既知の方法を用いて加工することができる。利用されるドメインは、 $gp130$ の全細胞外ドメインから構成されていてもよく、又は、作動性の複合体 $IL-6/sIL-6R$ の活性を阻害する能力を維持している、そのさらなる変異体若しくはフラグメントから構成されていてもよい。好ましいフラグメントは、少なくとも細胞外ドメイン D1 ないし D3 からなるフラグメントである。

【0017】

本発明の $sgp130$ 変異蛋白質のさらに好ましい態様は、2つの変異、 $Gln113Phe$ ($Q113F$) 又は $Asn114Leu$ ($N114L$)、の一方を含む。

【0018】

本発明の変異蛋白質の特に好ましい態様においては、3つの変異 $Thr102Tyr$ ($T102Y$)、 $Gln113Phe$ ($Q113F$)、又は $Asn114Leu$ ($N114L$) のうち、2つが組合されて、二重変異蛋白質 $Thr102Tyr/Gln113Phe$ ($T102Y/Q113F$)、 $Thr102Tyr/Asn114Leu$ ($T102Y/N114L$)、又は $Gln113Phe/Asn114Leu$ ($Q113F/N114L$) を生じる。

【0019】

本発明の変異蛋白質の最も好ましい態様においては、3つの変異 $Thr102Tyr$ ($T102Y$)、 $Gln113Phe$ ($Q113F$)、及び $Asn114Leu$ ($N114L$) の全てが組合されて、三重変異蛋白質 $Thr102Tyr/Gln113Phe/Asn114Leu$ ($T102Y/Q113F/N114L$) を生じる。

【0020】

さらに、ポリペプチドが直接又はポリペプチドリinkerを介してタグに融合されている、変異した $sgp130$ ポリペプチドが好ましい。用語「タグ」は、任意の天然産又は人工のポリペプチド、又は他の分子構造を意味する。これは、変異した $sgp130$ ポリペプチドの精製及び/又は検出を可能とし、及び/又は、変異した $sgp130$ ポリペプチドの薬力学的及び/又は薬物動態学的特性がさらに改善される。ポリペプチドリinkerは、完全に人工的（例えば、グリシン、セリン、アスパラギン、トレオニン、及びアラニンからなる群より選択される2 - 50アミノ酸残基を含む）であってもよく、又は天然産蛋白質から取り入れてもよい。

【0021】

本発明の $sgp130$ 変異蛋白質のさらに好ましい態様においては、 $sgp130$ 変異蛋白質、その変異体、又はフラグメントと、タグ（例えば、免疫グロブリンFcドメイン）との間、及び/又は $sgp130$ 変異蛋白質とリンカーとの間、及び/又はリンカーとタグとの間に、1つ以上のN - グリコシル化部位が挿入されている。コア配列 $Asn-X-Ser$ 又は $Asn-X-Thr$ をもつN - グリコシル化部位のアミノ酸モチーフは、蛋白質中のモチーフの状況に依存し、当業者により、例えば、 $NetNGlyc$ （デンマーク工科大学（Technical University of Denmark）生物

10

20

30

40

50

学的配列解析センター (Center for Biological Sequence Analysis) のようなフリーソフトウェアを使用することにより、予測及び設計が可能である。本発明の変異蛋白質用の好ましい N - グリコシル化リンカーエレメントは、His - Asn - Leu - Ser - Val - Ile である。

【0022】

本発明の別の目的は、PEG 付加されているか、又は他の化学的に修飾された形態の、s g p 1 3 0 変異蛋白質、その変異体、フラグメント、又は融合構築物である。s g p 1 3 0 分子の PEG 付加は、例えば、ヒト IFN - α 、IFN - β 、IL - 15、又は IL - 2 について記載された方法 (Youngster ら、Curr. Pharm. Des. 2002 年、第 8 巻、p. 2139 - 57; Grace ら、J. Interferon Cytokine Res. 2001 年、第 21 巻、p. 1103 - 15; Pepinsky ら、J. Pharmacol. Exp. Ther. 2001 年、第 297 巻、p. 1059 - 66; Pettit ら、J. Biol. Chem. 1997 年、第 272 巻、p. 2312 - 8; Goodson ら、Biotechnology、1990 年、第 8 巻、p. 343 - 6; Katre、J. Immunol. 1990 年、第 144 巻、p. 209 - 13) に従って行なうことができる。

10

【0023】

PEG - ポリペプチド又は PEG - ポリペプチド二量体が s IL - 6 R に依存性の IL - 6 応答のブロックが可能であるかぎり、いかなる種類のポリエチレングリコールも本発明に適しており、これは、当該技術分野において技術上既知の方法に従ってアッセイすることができる。好ましくは、本発明のポリペプチド又はポリペプチド二量体のポリエチレングリコールは、PEG 1000、2000、3000、5000、10000、15000、20000、又は 40000 であり、PEG 20000 又は 40000 が特に好ましい。

20

【0024】

二量体を形成するためには、2 つの s g p 1 3 0 変異蛋白質、その変異体、フラグメント、又は融合構築物は、単純な共有結合、柔軟なペプチドリinker、又は、好ましくは、1 つ以上のジスルフィド架橋により、互いに連結させる。ペプチドリinkerは、完全に人工的 (例えば、グリシン、セリン、アスパラギン、トレオニン、及びアラニンからなる群より選択される 2 - 50 アミノ酸残基を含む) であってもよく、又は天然産蛋白質から取り入れてもよい。ジスルフィド架橋形成は、例えば、免疫グロブリン Fc 融合蛋白質としての組換え発現により達成することができ、ここで、s g p 1 3 0 Fc 単量体をコードしている核酸配列は、システインをコードしている 1 つ以上のコドン、を、好ましくは Fc ドメインのヒンジ領域中に含有する。

30

【0025】

本発明はまた、ポリペプチドが免疫グロブリン重鎖の Fc ドメインに融合されている、上記記載のポリペプチド二量体に関する。「免疫グロブリン重鎖の Fc ドメインに融合された (. . .) 」という表現は、全ての免疫グロブリンクラス及びサブクラスを含む。好ましくは、s g p 1 3 0 変異蛋白質の融合パートナーは、IgG 蛋白質の、さらに好ましくは、IgG1 蛋白質の Fc ドメインからなる。しかしながら、任意の Fc 部分はまた、2 つ以上の免疫グロブリンクラス又はサブクラスからの配列を含んでいてもよく、所望のエフェクター機能を最適化するために特定の配列モチーフを選択することは、当該技術分野における通常の技術の範囲内である。

40

【0026】

免疫グロブリン Fc 部分との融合に加えて、又はその代わりに、本発明の、g p 1 3 0 細胞外ドメイン (可溶性 g p 1 3 0) 変異蛋白質は、それに対する抗体若しくは他の結合性分子が入手可能であり、迅速な精製、ウエスタンブロット若しくは ELISA 等における検出、免疫沈降、又は他のバイオアッセイにおける活性喪失 / ブロックが可能な他の天然産又は人工のポリペプチド及び / 又はタグ、例えば、ポリ (His)、Myc、Strept、ポリアルギニン、Flag、緑色蛍光蛋白質 (GFP) 又はその加工された誘導体

50

、TAP、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、HA、カルモジュリン結合ペプチド(CBP)、マルトース結合蛋白質(MBP)、V5、HSV、S、水泡性口内炎ウイルス(VSV)、プロテインC、ルシフェラーゼ、Glu-Glu、E、ベータ-GAL、T7、又は、他のエピトープと融合させてもよい。

【0027】

s g p 1 3 0 変異蛋白質又はその変異体若しくはフラグメントの、好ましくはC-末端における、免疫グロブリンFc部分のヒンジ領域又は他のタグへの融合は、直接的であってもよく、或いは、種々の長さ及びアミノ酸の組合せの柔軟なポリペプチドリソマーを使用してもよい。これらのリンカーは、完全に人工的(例えば、グリシン、セリン、アスパラギン、トレオニン、及びアラニンからなる群より選択される2-50アミノ酸残基を含んでなる)であってもよく、又は天然産蛋白質から取り入れてもよい。このようなリンカーは、変異蛋白質の単量体又は二量体のフレキシビリティ及び結合特性を増強することができる。

10

【0028】

本発明のs g p 1 3 0 変異蛋白質の単量体及び二量体は、好ましくは、前記変異蛋白質、その変異体、フラグメント、若しくは融合構築物をコードするポリヌクレオチドを用いることにより、組換え的に製造される。

【0029】

したがって、本発明はまた、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、並びにベクター、好ましくは、前記ポリヌクレオチドを含有する発現ベクター、及び宿主細胞、又はかかるベクターを含有する無細胞発現系に関する。

20

【0030】

本発明の変異蛋白質単量体及び二量体を製造するためには、既存のクローン、すなわち、好ましくは天然産ポリペプチド若しくはその一部をコードしているクローンからポリヌクレオチドを得る(ヒトg p 1 3 0 / I L 6 S T : G e n B a n k 配列NM__002184及びサポーティングクローン; ヒト免疫グロブリンの定常領域、例えば、I g G 1 / I G H G 1、G e n B a n k 配列A K 0 5 7 7 5 4)。高度にストリンジェントな、又は中程度にストリンジェントな条件(定義については、S a m b r o o k、"M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n u a l (分子クローニング、実験室マニュアル)"、1989年、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y M a n u a l N . Y . 参照)の下で、天然のDNA又はRNAの相補鎖に対しハイブリダイズする任意のポリヌクレオチドによってコードされるポリペプチドもまた、当該ポリペプチドがその天然の配列の生物学的活性を維持する限り、本発明の変異蛋白質単量体及び二量体を製造するのに有用である。

30

【0031】

組換えベクターは、当業者に周知の方法に従って構築することができる; 例えば、S a m b r o o k、"M o l e c u l a r C l o n i n g , A L a b o r a t o r y M a n u a l"、1989年、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y M a n u a l N . Y . 参照。多様な発現ベクター/宿主系を利用して、本発明のs g p 1 3 0 変異蛋白質、その変異体、フラグメント、又は融合構築物をコードする配列を、含有させ発現させることができる。例としては、無細胞発現系、例えば、インビトロの小麦胚芽発現系; 微生物、例えば、組換えバクテリオファージ、プラスミド、又はコスミドDNA発現ベクターで形質転換した細菌; 真菌(例えば、酵母)の発現ベクターで形質転換した真菌(例えば、酵母); ウイルス発現ベクター(例えば、バキュロウイルス)に感染した昆虫細胞系; ウイルス発現ベクター(例えば、カリフラワーモザイクウイルス、C a M V ; タバコモザイクウイルス、T M V)で、若しくは細菌発現ベクター(例えば、T i 又はp B R 3 2 2 プラスミド)で形質転換した植物細胞系; 又は、動物細胞系が挙げられるが、これらに制限されない。

40

【0032】

細菌系では、本発明の変異蛋白質単量体及び二量体について意図した使用に依存して、

50

多くの発現ベクターを選択することができる。本発明における使用に適したベクターとしては、細菌での発現のための p S K K 発現ベクターが挙げられるが、これに制限されない。

【0033】

野生型又は修飾された（例えば、糖が改変された）酵母種、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ（*Saccharomyces cerevisia*）、シゾサッカロマイセス・ボンベ（*Schizosaccharomyces pombe*）、又はピキア・パストリス（*Pichia pastoris*）において、例えば、アルファ因子、アルコールオキシダーゼ、PGH、テトラサイクリングルコースなどの、構成的若しくは誘導可能なプロモーター若しくはプロモーター系を含有する多数のベクターを使用することができる；総説については、Grantら、*Methods Enzymol.* 1987年、第153巻、p. 516 - 44；Siamら、*Methods*、2004年、第33巻、p. 189 - 98；Macaulay - Patricら、*Yeast*、2005年、第22巻、p. 249 - 70、Gellissenら、*FEMS Yeast Res.* 2005年、第5巻、p. 1079 - 96；Wildt及びGerngross、*Nat. Rev. Microbiol.* 2005年、第3巻、p. 119 - 28を参照。

10

【0034】

植物発現系が使用される場合（総説については、Stogerら、*Curr. Opin. Biotechnol.* 2005年、第16巻、p. 167 - 73；Gomordら、*Trends Biotechnol.* 2005年、第23巻、p. 559 - 65を参照）、本発明の変異蛋白質、又はその変異体若しくはフラグメント若しくは融合構築物をコードしている配列の発現は、多数のプロモーターのいずれかによって駆動することができる。例えば、CaMVの35S及び19Sプロモーターのようなウイルスプロモーターを、単独で、又はTMVからのオメガ・リーダー配列と組合せて使用してもよい（Takamatsu、*EMBO J.* 1987年、第6巻、p. 307 - 11）。別法として、植物プロモーター、例えばRUBISCOの小サブユニット又は熱ショックプロモーターを使用してもよい（Coruzziら、*EMBO J.* 1984年、第3巻、p. 1671 - 80；Broglieら、*Science*、1984年、第224巻、p. 838 - 43；Winterら、*Results Probl. Cell Differ.* 1991年、第17巻、p. 85 - 105）。これらの構築物は、直接的なDNA形質転換、又は病原体介在性のトランスフェクションにより、植物細胞中に導入することができる。かかる技術は、数多くの一般に入手可能な総説に記載されている（例えば、Hobbs及びMurry、「*McGraw Hill Yearbook of Science and Technology*」、McGraw Hill、New York、N.Y. 1992年、p. 191 - 6を参照）。

20

30

【0035】

昆虫細胞系もまた、本発明の変異蛋白質単量体及び二量体を発現するために使用することができる。例えば、かかる系の1つでは、オートグラフィア・カリフォルニカ（*Autographa californica*）核多角体ウイルス（AcNPV）を、スポドペトラ・フルギベルダ（*Spodoptera frugiperda*）細胞において、又はキクキンウワバ（*Trichoplusia*）幼虫において、外来遺伝子を発現するためのベクターとして使用する。配列は、ウイルスの非必須領域、例えば、ポリヘドリン遺伝子中にクローニングして、ポリヘドリンプロモーターの支配下に配置することができる。sgp130変異蛋白質、又はそのフラグメント若しくは変異体若しくは融合構築物、例えばsgp130Fc融合蛋白質をコードしているDNA配列を首尾よく挿入すると、ポリヘドリン遺伝子が不活性化され、コート蛋白質を欠く組換えウイルスが産生される。次に組換えウイルスを用いて、例えば*S. frugiperda*細胞又は*Trichoplusia*幼虫に感染させ、ここで、本発明のsgp130変異蛋白質単量体及び二量体を発現させることができる（Engelhardら、*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 1994年、第91巻、p. 3224 - 7）。

40

50

【0036】

哺乳類の宿主細胞では、例えば、脂質系の細胞のトランスフェクション又はウイルス性形質導入等の、数多くの発現系を利用することができる。発現ベクターとしてアデノウイルスを使用する場合、本発明のsgp130変異蛋白質、又はそのフラグメント若しくは変異体若しくは融合構築物をコードしている配列を、後期プロモーター及びトリパータイトリダー配列からなるアデノウイルス転写／翻訳複合体中に連結する。ウイルスゲノムの非必須E1又はE3領域内への挿入を使用して、感染した宿主細胞内で本発明の変異蛋白質単量体及び二量体を発現することができる生きたウイルスを得てもよい(Logan及びShenk、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1984年、第81巻、p. 3655-9)。加えて、転写エンハンサー、例えば、ラウス肉腫ウイルス(RSV)エンハンサーを使用して、哺乳類宿主細胞における発現を増大してもよい。

10

【0037】

組換えベクターの導入後、宿主細胞を、ベクター含有細胞の増殖を選択することができる選択培地中で増殖させる。多くの選択系の任意のものを用いて、形質転換した細胞系を回収することができる。例えば、限定されないが、単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wiglerら、Cell、1977年、第11巻、p. 223-32)及びアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowyら、Cell、1980年、第22巻、p. 817-23)遺伝子が挙げられ、これらは各々、tk.sup.-、又はaprt.sup.-細胞において使用することができる。また、代謝拮抗物質、抗生物質、又は除草剤抵抗性を、選択の基盤として使用することができる；例えば、メトトレキサートに対する抵抗性を付与するdhfr(Wiglerら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1980年、第77巻、p. 3567-70)；アミノグリコシド類である、ネオマイシン及びG-418に対し抵抗性を付与するnpt(Colbere-Garapinら、J. Mol. Biol. 1981年、第150巻、p. 1-14)；及び、クロルスルフロン及びホスフィノトリシンアセチルトランスフェラーゼに対する抵抗性を各々付与する、als又はpat。さらに別の選択可能な遺伝子が記載されている。例えば、trpBは細胞がトリプトファンの代わりにインドールを利用できるようにし、或いはhisDは細胞がヒスチジンの代わりにヒスチノールを利用できるようにする(Hartman及びMulligan、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 1988年、第85巻、p. 8047-51)。アントシアニド、ベータ-グルクロニダーゼ及びその基質GUS、ルシフェラーゼ及びその基質ルシフェリン等の可視マーカーの使用が一般的になってきており、形質転換体を同定するためのみならず、特定のベクター系に帰せられる、一過性の又は安定した蛋白質発現を定量するために広く使用されている(Rhodesら、Methods Mol. Biol. 1995年、第55巻、p. 121-31)。

20

30

【0038】

組換えポリペプチドの精製は、この目的のための既知の方法、例えば、抽出、沈降、クロマトグラフィー、電気泳動などの任意の通常の方法によって行なわれる。使用することができるさらに別の精製法は、例えば、プロテインA、プロテインG、又はモノクローナル抗体(これらは標的ポリペプチドに結合し、カラム内に含有されるゲルマトリックス上に固定される)を使用した、アフィニティクロマトグラフィーである。組換えポリペプチドを含有する不純物を含む標品をカラムに通す。ポリペプチドは、アフィニティゲルマトリックスとの特異的相互作用により、カラムに結合するが、不純物は通過する。洗浄後、pH又はイオン強度の変化により、ポリペプチドをゲルから溶出し、次に、単量体として生成される場合には、二量体化し、所望であればPEG付加する。

40

【0039】

したがって、本発明はまた、本発明のsgp130変異蛋白質単量体及び二量体を製造する方法に関し、この方法は、無細胞発現系を使用するか、又はsgp130変異蛋白質、又はそのフラグメント若しくは変異体若しくは融合構築物をコードしているDNA配列で形質転換された宿主細胞を培養し、そして、変異蛋白質単量体又は二量体を、前記系、

50

宿主細胞、又は培養物から回収することを含む。

【0040】

本発明の s g p 1 3 0 変異蛋白質単量体及び二量体は、作動性の I L - 6 / s I L - 6 R 複合体の活性を阻害すべきである全ての病状の治療及び / 又は予防において有用である。したがって、本発明はまた、本発明の s g p 1 3 0 変異蛋白質単量体又は二量体の治療上有効量を、好ましくは薬学的に許容される担体と組合せて含有する医薬組成物にも関する。「薬学的に許容される」とは、活性成分の生物学的活性の有効性を妨害せず、かつ投与される宿主に対し有毒ではない、任意の担体を包含することを意味する。適当な薬学的担体の例は当該技術分野において知られており、例えば、リン酸緩衝生理食塩水溶液、水、エマルジョン、例えば油 / 水型エマルジョン、種々のタイプの湿潤剤、無菌液などが挙げられる。このような担体は、通常の方法により製剤可能であり、有効用量で患者に投与することができる。

10

【0041】

「有効量」とは、疾患の経過及び重篤性に影響を及ぼし、かかる病状の予防、軽減、又は寛解をもたらすのに十分な活性成分の量を指す。

【0042】

これらの疾患又は障害を治療及び / 又は予防するために有用な有効用量は、当業者に既知の方法を用いて測定することができる（例えば、Fingler、*The Pharmacological Basis of Therapeutics*（治療の薬理学的基礎）、Goodman及びGilman編、Macmillan Publishing Co. New York、1975年、p. 1 - 46参照）。

20

【0043】

組成物の投与は、様々な方法、例えば、静脈内、動脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、関節内、経口、経肺、吸入、経鼻、直腸内、経膈、局所、又は皮内投与により実施することができる。用量用法は、主治医及び他の臨床因子によって決定されるであろう。医学の分野では周知のように、任意の1人の患者のための投薬量は、患者のサイズ、体表面積、年齢、性別、投与される特定の化合物、投与の時間及び経路、療法の種類、全身の健康、及び同時投与される他の薬剤等の多くの因子に依存する。

【0044】

本発明はまた、作動性の複合体である I L - 6 / s I L - 6 R のブロックが有益な効果をもつ疾患又は障害の治療及び / 又は予防用の医薬組成物の調製のための、上記に定義した s g p 1 3 0 変異蛋白質単量体及び二量体の使用にも関する。

30

【0045】

本発明の変異蛋白質単量体及び二量体の好ましい医療用途は、骨再吸収、高カルシウム血症、悪液質、腫瘍若しくは他のタイプの癌（例えば、結腸癌、多発性骨髄腫、リンパ腫、白血病、ホジキン病、又はキャスルマン病）、自己免疫疾患（例えば、多発性硬化症、1型糖尿病、又は紅斑性狼瘡）、炎症性又はアトピー性疾患（例えば、クローン病、潰瘍性大腸炎、リウマチ様関節炎、若年性リウマチ様関節炎、喘息、乾癬、サルコイドーシス、紅斑性狼瘡、ぶどう膜炎、又はアレルギー性結膜炎）、感染症（例えば、細菌、ウイルス、真菌、又は他の病原体による）、敗血症、並びに内分泌障害、及び代謝性若しくは異化性疾患（例えば、2型糖尿病、肥満症、高血糖症、又は高コレステロール血症）の治療及び / 又は予防である。

40

【0046】

最後に、本発明は、本発明のポリペプチドに結合することができる抗体であって、前記ポリペプチドの変異したペプチドモチーフ又は特異的リンカー領域に特異的である該抗体を提供する。用語「抗体」は、この文脈において用いる場合、好ましくは、個別のモノクローナル抗体標品に関する。前記ポリペプチドの変異したペプチドモチーフ又は特異的リンカー領域に対するモノクローナル抗体は、当業者に周知の方法により、これらのペプチド / ポリペプチドの適当なフラグメントを抗原として使用することによって作成される（例えば、Kohlerら、*Nature*、1975年、第256巻、p. 495 - 7参照

50

）。本明細書で用いる場合、用語「抗体」(A b)又は「モノクローナル抗体」(M a b)は、特異的に蛋白質に結合することができる無傷の分子並びに抗体フラグメント(例えば、F a b及びF (a b')²フラグメントのような)を含むことを意味する。無傷の抗体からF cフラグメントが欠失したF a b及びF (a b')²フラグメントは、より迅速に循環から排出され、かつ、無傷の抗体よりも非特異的な組織結合が少ない(W a h l r a , J . N u c l . M e d . 1983年、第24巻、p . 316 - 25)。したがって、これらのフラグメント、並びにF a b又は他の免疫グロブリン発現ライブラリーの生成物が好ましい。さらに、本発明の抗体には、キメラ抗体、単鎖抗体、及びヒト化抗体が含まれる。このような抗体は、種々の目的のために有用であり、例えば、迅速な精製、例えばウエスタンブロット若しくはE L I S Aにおける検出、免疫沈降、又は、バイオアッセイにおける活性喪失/ブロックを可能にするであろう。

10

【0047】

したがって、本発明はまた、本発明のポリペプチドに対する、本発明の抗体の特異的結合の検出に基づく診断法にも関する。

【0048】

以下の実施例は、本発明をさらに詳細に説明する。

【実施例1】

【0049】

s g p 130 F c 変異蛋白質の構築及び製造

【0050】

20

(A)材料

ゲートウェイ(G e t e w a y)クローニングシステム(A c c u P r i m e P f x D N Aポリメラーゼ、ドナーベクターp D O N R 2 2 1、C M Vプロモータ制御下の発現ベクターp c D N A - D E S T 4 0、B P、及び、インサート移入のためのL Rリコンビナーゼ、及びコンピテント大腸菌細胞)は、インビトロジェン(I n v i t r o g e n)(カールスルーエ(K a r l s r u h e)、ドイツ)から購入した。Q u i k C h a n g e I I及びQ u i k C h a n g e M u l t i部位特異的変異誘発キットは、ストラタジーン(S t r a t a g e n e)(アムステルダム、オランダ)から購入した。P A G E精製変異誘発プライマーは、マイクロシンズ(M i c r o s y n t h)(バルガッハ(B a l g a c h)、スイス)から入手した。C H O - K 1細胞は、ドイツ微生物及び細胞培養コレクション(G e r m a n C o l l e c t i o n o f M i c r o o r g a n i s m s a n d C e l l C u l t u r e s)(ブラウンシュバイク(B r a u n s c h w e i g)、ドイツ)から入手した。培地成分は、以下の通り購入した：ハムF 1 2培地、低I g G F B S及びダルベッコ(D u l b e c c o ' s)P B S(P A Aラボラトリーズ；コルベ(C o l b e)、ドイツ)、F B S(バイオクロム(B i o c h r o m)；ベルリン、ドイツ)、トリプシン/ED T A溶液(インビトロジェン)、及びG 4 1 8溶液(シグマ-アルドリッチ(S i g m a - A l d r i c h)、タウフキルヒェン(T a u f k i r c h e n)、ドイツ)。トランスフェクション試薬、リポフェクタミン(L i p o f e c t a m i n e)2000は、インビトロジェンから入手した。免疫沈降用のプロテインA/Gプラスアガロース(P r o t e i n A / G P l u s A g a r o s e)は、サンタ・クルズ(S a n t a C r u z)、ハイデルベルグ、ドイツ)から供給された。ウエスタンブロットの1次検出用には、マウス抗ヒトI g G (F c)モノクローナル抗体を使用した(C B L 102；ケミコン(C h e m i c o n)；ホフハイム(H o f h e i m)、ドイツ)。ウエスタンブロット2次検出は、抗マウスI g G H R P結合抗体、E C L - プラス(P l u s)ウエスタンブロットティング基質、及びハイパーフィルム(H y p e r f i l m)E C L(全て、GEヘルスケア(H e a l t h c a r e)から；ムーニッヒ(M u n i c h)、ドイツ)を用いて行なった。ローラーボトル(2 . 1 L、2 . 5 X表面)は、グライナー・バイオワン(G r e i n e r B i o - O n e)(フリッケンハウゼン(F r i c k e n h a u s e n)、ドイツ)から購入した。真空フィルターユニット用のセルロースアセテートフィルター(0 . 4 5 μ m)は、ザルトリウス(S

30

40

50

artorius) (ゲッティンゲン (G o t t i n g e n)、ドイツ) から購入した。X K 1 6 / 2 0 カラム及び P D - 1 0 脱塩カラム中の、M a b S e l e c t プロテイン A アフィニティマトリックス (製品コード 1 7 - 5 1 9 9 - 0 1) は、G E ヘルスケア (ムーニッヒ (M u n i c h)、ドイツ) から入手した。アミコン (A m i c o n) ウルトラ (U l t r a) - 1 5 5 0 k D a ウルトラセル (U l t r a c e l) - P L 膜濃縮ユニットは、ミリポア (M i l l i p o r e) (エシュボーン (E s c h b o r n)、ドイツ) から購入した。P A G E 用の既製アクリルアミド - ビス溶液 (1 9 : 1、3 0 %) は、パイオラド (B i o - R a d) (ムーニッヒ、ドイツ) から供給された。

【0051】

(B) s g p 1 3 0 F c 変異蛋白質の構築

g p 1 3 0 の完全な細胞外ドメインと、野生型ヒト I g G 1 F c とを含む、完全長 s g p 1 3 0 F c 用の c D N A を合成し (供給源: ヒト g p 1 3 0 / I L 6 S T 用には: G e n B a n k 配列 N M _ 0 0 2 1 8 4、及びサポータイングクローン; ヒト I g G 1 / I G H G 1 の定常領域用には: 例えば、G e n B a n k 配列 A K 0 5 7 7 5 4)、C H O - K 1 細胞における発現用にコドン最適化し、そして標準的なゲートウェイ (G a t e w a y) クローニング法において、G a t e w a y プライマー、A c c u P r i m e P f x D N A ポリメラーゼ、及び B P リコンビナーゼを使用して、p D O N R 2 2 1 にサブクローニングした。サブクローニングされた挿入物は、2 5 0 ないし 3 0 0 b p ほどのスタックされた前向き及び逆向きシーケンシングプライマーを使用して、完全に配列を検証した。クイックチェンジ・マルチ (Q u i k C h a n g e M u l t i) 及びクイックチェンジ I I キットを使用した多部位特異的変異誘発では、g p 1 3 0 の 3 つのアミノ酸残基、T h r₁₀₂、G l n₁₁₃、及び A s n₁₁₄ を、図 1 に描かれた変異スキームに従って変異させた。変異したクローンは、上記記載のような完全シーケンシングにより検証した。続いて、挿入物を発現ベクター p c D N A - D E S T 4 0 に、G e t e w a y L R 組換えによって移入した。挿入物は、F c 部位の後に 2 つの停止コドンをコードしていることから、p c D N A - D E S T 4 0 中にコードされたタグ (V 5 及び 6 x H i s エピトープ) は、変異蛋白質中には存在しない。ポジティブクローンを A l w N I 制限消化により同定し、そして配列を再度検証した。

【0052】

(C) 細胞培養及びトランスフェクション

C H O - K 1 細胞は、1 0 % F B S を補足したハム F 1 2 培地中で、水飽和雰囲気下に、3 7 °C 及び 5 % C O₂ で増殖させた。維持培養は、3 ないし 4 日毎に継代し、そして 2 0 代までのみ使用した。細胞は、リポフェクタミン 2 0 0 0 と、インビトロジェンにより供給された C H O - K 1 用の標準的な条件とを使用して、発現構築物でトランスフェクトした。1 回目の一過性発現の試験には、C H O - K 1 細胞を 6 ウェルプレート中でトランスフェクトし、そして細胞及び上清の双方を、トランスフェクションの 2 4 時間後に回収した。s g p 1 3 0 F c 又は s g p 1 3 0 F c 変異蛋白質は、プロテイン A / G プラスアガロースを製造業者の指示に従って使用して、上清から免疫沈降させた。全細胞蛋白質を抽出し、そして細胞溶解物及び免疫沈降物について、抗ヒト I g G (F c) 抗体を用いたウェスタンブロットを、W a e t z i g ら、J . I m m u n o l . 2 0 0 2 年、第 1 6 8 巻、p . 5 3 4 2 - 5 1 に記載のように行なった。

【0053】

(D) C H O - K 1 細胞における s g p 1 3 0 F c 及び s g p 1 3 0 F c 変異蛋白質の産生

一過性発現が成功した後、C H O - K 1 細胞をトランスフェクトし、1 0 c m の細胞培養プレート中で 4 0 0 µ g / m L の G 4 1 8 を使用してポジティブクローンを選択した。生成物の質及び特性を測定するため、予め選択されたポリクローマル C H O - K 1 プールをローラーボトルに移し、そして低 I g G F B S で培養した。コンフルエントな細胞の上清を 1 週間に 3 回回収し、5 0 0 x g 及び 4 °C で 2 0 分間遠心分離して細胞を除去し、3 0 0 0 x g 及び 4 °C で 4 0 分間遠心分離して細胞片を除去し、そして次に、直ちに加工

10

20

30

40

50

するか、又は - 80 で凍結した。並行して、予め選択されたプールから、限界希釈法を使用して安定な細胞クローンを選択し、そして上記記載のように、ウエスタンブロット発現分析により特性決定した。発現が最も高く、かつ最も安定しているクローンを、ローラーボトルに移し、そして永続的な製造に使用した。

【0054】

(E) アフィニティークロマトグラフィー精製及び品質管理

ローラーボトル培養物からの、s g p 1 3 0 F c - 又は s g p 1 3 0 F c 変異蛋白質含有上清を、P - 1 ペリスタポンプ及びアクタ・ピュリファイア (AKTA Purifier) 100 システム (双方とも、GEヘルスケア; ムーニッヒ、ドイツ、より) を使用して、4 で精製した。プロトコールは、モノクローナル抗体の精製のための製造業者の推奨に基づくものであった。遠心分離後、新たな又は融解した (氷上で) 上清の pH を、6.7 ないし 7.0 に調整した。2 ラウンドの真空濾過 (0.45 μ m) の後、上清を脱気し、そして、必要であれば pH を再度 6.7 ないし 7.0 の値に調整した。続いて、P B S で平衡化したアフィニティークロマトグラフィーカラム (X K 1 6 / 2 0 カラム中、10 mL Mab Select) に、P - 1 ポンプを使用して、3 - 10 mL / 分の流速で、2 - 4 L の上清を負荷した。P B S で洗浄後、カラムをアクタ・ピュリファイアに移し、そして再度 P B S で、未結合蛋白質の定量的な除去の後に A_{280} が安定するまで洗浄した。溶出用には、アクタシステムに、各々 pH 3.25 及び 5.5 の、2 つの 50 mM クエン酸ナトリウム緩衝液をセットし、これらを混合して所望の pH 条件 (s g p 1 3 0 F c 及び s g p 1 3 0 F c 変異蛋白質の溶出には pH 3.7) を作り出した。10 mL の分画を、2 mL の 1 M トリス - HCl (pH 11) を含有する 15 mL チューブに収集した。ピーク分画をプールし、pH を測定し、そして必要であれば 7.5 に調整した。プール蛋白質濃度を A_{280} によって測定し、そしてプールを、アミコン ウルトラ - 15 50 kDa ウルトラセル - PL 膜濃縮ユニットを使用して 2 - 5 mg / mL に濃縮した。P B S で平衡化した PD - 10 脱塩カラムを使用して、クエン酸緩衝液を P B S で置き換え、続いて蛋白質濃度を 280 nm でもう一度測定した。品質管理用に試料を調達し、未変性及び変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (7.5%) 及びそれに続く銀染色により分析した (図 2)。最終的なプール蛋白質濃度を測定し、P B S 中で 2 - 3 mg / mL に設定し、そして 1 回使用 (シングルユース) アリコートをし、長期間の貯蔵用に - 80 で凍結した。

【0055】

(F) 結果

s g p 1 3 0 F c 変異蛋白質二量体の精製性は、野生型 s g p 1 3 0 F c と異なっていなかった。図 2 に示したように、凝集体の質及び量は、点変異によって有意に影響されなかった (本発明の代表的な変異蛋白質のみを示す、図 1 参照)。

【実施例 2】

【0056】

標準化された細胞増殖アッセイにおける s g p 1 3 0 変異蛋白質の生物学的活性

(A) 材料

安定にトランスフェクトされた B 細胞前駆体細胞系 B A F 3 / g p 1 3 0 を、Hyper - IL - 6 (共有結合した IL - 6 と s IL - 6 R から構成されるデザイナーサイトカイン; Fischer ら、Nat. Biotechnol. 1997 年、第 15 巻、p. 142 - 5) を使用して維持した。D MEM 細胞培地及びダルベッコ P B S は、P A A ラボラトリーズ (コルベ、ドイツ) から購入し、F B S はバイオクロム (ベルリン、ドイツ) から入手した。インターロイキン - 6 (IL - 6) 及び可溶性のインターロイキン - 6 受容体 (s IL - 6 R) は、バイオソース (BioSource) (ゾーリングゲン (Solingen)、ドイツ) 及び R & D システム (ヴィースバーデン (Weissbaden)、ドイツ) から各々入手した。比色による、Cell Titer 96 (セルタイター 96) Aqueous Non - Radioactive Cell Proliferation Assay (水性非放射性細胞増殖アッセイ) (MTS)、及び蛍光測定に

よる、Cell Titer - Blue (セルタイター - ブルー) Cell Viability Assay (細胞生存アッセイ) は、共にプロメガ (Promega) (マンハイム (Mannheim)、ドイツ) から入手し、製造業者の指示に従って実施した。

【0057】

(B) sgp130Fc 又は sgp130Fc 変異蛋白質による、IL - 6 / sIL - 6 R - 誘導性の BAF3 / gp130 細胞増殖のブロック

BAF3 / gp130 細胞は、培地中の IL - 6 / sIL - 6 R 複合体又は Hyper - IL - 6 の存在に依存して増殖及び生存する。維持用には、BAF3 / gp130 細胞を、10% FBS 及び 10 ng / mL の Hyper - IL - 6 を加えた DMEM 中で、 5×10^5 細胞 / mL 未満の密度で培養した。10 ng / mL の Hyper - IL - 6 の代わりに、100 ng / mL の IL - 6 プラス 50 ng / mL の sIL - 6 R を使用してもよい。細胞は、週 2 回継代した。アッセイには、細胞を、Hyper - IL - 6 (又は IL - 6 / sIL - 6 R) のない培地で 2 回洗浄し、そして次に、5,000 細胞 / ウェルで 96 ウェルプレートに播種した。野生型 sgp130Fc 又は sgp130Fc 変異蛋白質を、900 ないし 10 ng / mL の範囲の種々の濃度で添加した (1 : 3 又は 1 : 10 希釈シリーズ; 図 3)。続いて細胞を、100 ng / mL の IL - 6 及び 50 ng / mL の sIL - 6 R、又は 1 ng / mL の Hyper - IL - 6 の存在下で、3 日間インキュベートした。コントロールとしては、最大濃度の sgp130Fc 又は sgp130Fc 変異蛋白質を含むかまたは含まない未刺激の細胞、並びに IL - 6 及び sIL - 6 R のみとインキュベートした細胞を用いた (図 3)。

10

20

【0058】

(C) 結果

細胞培養における野生型 sgp130Fc 又は sgp130Fc 変異蛋白質の生物学的活性を、3 日後の生存可能な BAF3 / gp130 細胞の数の減少によって測定した (製造業者の情報に従い、代謝活性のある細胞による、MTS 基質若しくはセルタイター - ブルー試薬の変換により測定)。MTS 基質 (図 3A) 及びセルタイター - ブルー試薬 (図 3B) は、別個の、しかし範囲の重複する感受性をカバーしており、セルタイター - ブルーの蛍光 (励起波長 530 nm、発光波長 590 nm) は、1 オーダー感度が良い。双方のアッセイシステムからの結果は、(1) 単一の変異 Thr102Tyr (T102Y) を含有する変異蛋白質の結合活性は、野生型よりも優れていたが、Gln113Phe (Q113F) 又は Asn114Leu (N114L) のいずれかの単一変異を含有する変異蛋白質よりも劣っていたこと、(2) Thr102Tyr (T102Y)、Gln113Phe (Q113F)、又は Asn114Leu (N114L) の群からの、2 つの変異の組合せは、いずれの単一の変異よりも優れていたこと (例として、二重変異蛋白質 Thr102Tyr / Gln113Phe (T102Y / Q113F) を、図 3 に示す)、及び (3) 3 つの変異全てを組合せて、三重変異蛋白質 Thr102Tyr / Gln113Phe / Asn114Leu (T102Y / Q113F / N114L) とすることにより、最適な結合活性が得られること (図 3) を示した。三重変異蛋白質の IC₅₀ は、全てのアッセイにおいて、野生型 IC₅₀ の少なくとも 3 倍低い。このことは、変異蛋白質 T102Y / Q113F / N114L は、野生型化合物の治療濃度の三分の一未満で使用し得ることを示している。

30

40

【実施例 3】

【0059】

急性期応答細胞アッセイにおける、野生型 sgp130Fc 及び三重変異蛋白質 T102Y / Q113F / N114L の比較

(A) 材料

HepG2 細胞は、DSMZ (ブラウンシュヴァイク、ドイツ) から入手した。Hyper - IL - 6 (共有結合した IL - 6 と sIL - 6 R から構成されるデザイナーサイトカイン; Fischer ら、Nat. Biotechnol. 1997 年、第 15 巻、p. 142 - 5) は、既に記載された通りに生成した。DMEM 高グルコース培地及びダル

50

ベッコPBSは、PAAラボラトリーズ(コルベ、ドイツ)から購入し、FBSはバイオクロム(ベルリン、ドイツ)から入手した。マキシソープ(Maxisorp)ELISAプレートは、ヌンク(Nunc)(ヴィースバーデン、ドイツ)から入手した。抗ハプトグロビン抗体は、リー・バイオソリューションズ(Lee Biosolutions)(セントルイス、ミズーリ州、米国)から入手し、ヤギ抗ウサギPOD抗体は、ピアース(Pierce)(ロックフォード、イリノイ州、米国)から入手し、BMブルーPOD基質は、ロシュ(Roche)(マンハイム、ドイツ)から入手した。他の全ての化学物質は、VWR/メルク(Merck)(ダームシュタット、ドイツ)から購入した。

【0060】

(B) 細胞培養及びハプトグロビンELISA

ヒト肝癌細胞系HepG2を、10%FBSを補足したDMEM高グルコース培地中で培養した。ヒト急性期蛋白質ハプトグロビンについてのELISAは、既に記載された通り行なった(Oppmannら、J. Immunol. Methods、1996年、第195巻、p. 153-9)。簡単には、ウェルあたり 10^5 個のHepG2細胞を、96ウェルプレートに播種し、そして一晩接着させた。細胞をPBS(37)で2回洗浄し、そしてFBSを含まないDMEM中で2時間飢餓とした。その間に、野生型sgp130Fc又は変異蛋白質T102Y/Q113F/N114Lを希釈し、FBSを含まないDMEM中の5ng/mLのHyper-IL-6と混合し、そして少なくとも30分間インキュベーター内に置いた。続いて、HepG2細胞を、この混合物200μLと共に20時間インキュベートし、細胞上清中のハプトグロビンの相対量を、ELISAによって測定した。ELISAプレートは、1:1,000の炭酸塩緩衝液pH9.0中のヤギ抗ハプトグロビン抗体で一晩コーティングし、そしてPBS中の5%FBSで、室温で2時間ブロックした。試料を、ブロッキング溶液中で1:10に希釈し、そして100μL/ウェルを、室温で1時間インキュベートした。0.05%ツイーン(Tween)20を加えたPBS(PBST)で4回洗浄した後、ブロッキング溶液中で1:1,000に希釈した100μLのウサギ抗ハプトグロビン抗体を添加し、そして37で30分間インキュベートした。PBSTで4回洗浄した後、ブロッキング溶液中で1:30,000に希釈した100μLのヤギ抗ウサギPOD抗体を添加し、そして37で30分間インキュベートした。TBSTで4回洗浄した後、100μLのBMブルーPOD基質を添加し、そしてこの発色は、最終的に1M H₂SO₄で停止した。プレートを450nmにおいて読み取り、各々の値を四重に測定した。

【0061】

(C) 結果

BAF3/gp130細胞増殖アッセイ(実施例2)で得た結果を確認するため、HepG2細胞肝癌細胞を、第2のモデル系として使用した。IL-6刺激(Rose-Johnら、Eur. J. Biochem. 1990年、第190巻、p. 79-83)、又は、IL-6/sIL-6R複合体若しくはHyper-IL-6(Petersら、J. Immunol. 1998年、第161巻、p. 3575-81)を用いた刺激により、HepG2細胞は、急性期蛋白質の誘導を示し、肝臓の炎症性プロセスに対する応答のモデル系として使用することができる。Hyper-IL-6に対する応答においてこれらの細胞により分泌される急性期蛋白質、ハプトグロビンを、ELISAによって定量化した(Oppmannら、J. Immunol. Methods、1996年、第195巻、p. 153-9)。図4は、三重変異蛋白質であるT102Y/Q113F/N114Lが、用量依存性の様式で、野生型sgp130Fcよりも有意に強く、Hyper-IL-6応答を阻害することを示している。

【実施例4】

【0062】

野生型sgp130Fc及び三重変異蛋白質T102Y/Q113F/N114Lの反応速度定数及び親和性

(A) 材料

Hyper-IL-6 (共有結合したIL-6とsIL-6Rから構成されるデザイナーサイトカイン; Fischerら、Nat. Biotechnol. 1997年、第15巻、p. 142-5) を既に記載された通り生成した。ダルベッコPBSは、PAAラボラトリーズ(コルベ、ドイツ)から購入した。他の全ての化学物質は、VWR/メルク(Merck)(ダームスタット、ドイツ)から購入した。

【0063】

(B) 表面プラズモン共鳴測定

表面プラズモン共鳴実験は、Protein XPR36蛋白質相互作用アレイシステム(パイオラド、ハーキュリーズ(Hercules)、カリフォルニア州、米国)を用いて、製造業者の指示に従って行なった。ランニング緩衝液は、0.005% ツイーン20を含有するPBS、pH7.4(PBST)であり、実験は25℃で行なった。表面を活性化し(4mM EDC / 1mM スルホ-NHS)、そして蛋白質は、10mM 酢酸緩衝液(pH4.5)中10µg/mLで共有結合させた。それぞれの固定化のレベルは、野生型sgp130Fcで1.330RU(レゾナンスユニット)、及び変異蛋白質T102Y/Q113F/N114Lで1.120RUであった。Hyper-IL-6の濃度は、PBST中で80ないし2.5nMの範囲であった(流速: 100µL/分)。結合及び解離は、各々60秒間又は600秒間モニターした。各センサーグラム・セットは、参照チャンネルを用いて標準化し、ベースラインに揃えた。センサーグラムは、Protein マネージャー(Manager) 2.0ソフトウェアを使用して分析した。

10

20

【0064】

(C) 結果

三重変異蛋白質T102Y/Q113F/N114Lに代表される変異蛋白質の、改善された生物学的活性(実施例2及び3参照)が、結合動態に反映されているかどうかを調べる目的で、表面プラズモン共鳴を行ない、 K_{on} 及び K_{off} 比を定量化した。野生型sgp130Fc又はT102Y/Q113F/N114L変異蛋白質を、アフィニティセンサーチップ上に固定し、そしてHyper-IL-6(IL-6/sIL-6R複合体を表わす)の結合を測定した。センサーグラムから、 K_{on} 及び K_{off} 定数と、親和定数 K_D とを計算した。変異蛋白質T102Y/Q113F/N114Lの、より高い阻害能は、同様の K_{on} 及び低い K_{off} に、かつその結果として4倍増大された親和定数 K_D に反映されている。 K_{off} の変化は、エネルギー的により安定な複合体からの結果であるのに対し、複合体形成は、野生型sgp130Fcと比較してごくわずかに影響を受けるにすぎない。

30

【実施例5】

【0065】

マウスIL-6/sIL-6R及びヒトgp130の複合体の分子モデリング及び細胞アッセイにおける仮説検定

(A) モデリング

マウスIL-6/マウスIL-6R/ヒトgp130複合体のモデルを、ヒトIL-6/IL-6R/gp130複合体の構造を鋳型として用いて構築した(Boulangierら、Science、2003年、第300巻、p. 2101-4)。公開された配列に従い、IL-6及びIL-6Rのアミノ酸残基を、鋳型中で交換した(Grotzingerら、Protein Struct. Funct. Genet. 1997年、第27巻、p. 96-109)。分子における挿入及び欠失は、データベース検索法(Vriend, J. Mol. Graph. 1990年、第8巻、p. 52-6)を使用してモデル化した。

40

【0066】

(B) 細胞アッセイの材料及び方法

標準化されたBAF/gp130細胞増殖アッセイは、実施例2に記載されている。マウスIL-6及びsIL-6Rは、R&Dシステム(ヴィースバーデン、ドイツ)から入

50

手し、300 ng/mL (IL-6) 及び150 ng/mL (sIL-6R) にて、細胞に添加した。

【0067】

(C) 結果

実施例2-4に記載される全ての実施例において、ヒトIL-6プラスヒトIL-6受容体、又は、ヒトIL-6及びsIL-6R配列をベースとするHyper-IL-6を使用した。ヒトgp130におけるQ113/N114の相互作用部位の詳細なモデリングは、変異Q113F及びN114Lについて観察された有益な効果の妥当な説明として、疎水性及び非極性のアミノ酸のクラスターを示唆した(図6)。マウスにおけるインビボ研究の前提条件として、ヒトIL-6/IL-6R/gp130複合体の三次元構造を使用して、マウスIL-6/マウスIL-6R/ヒトgp130からなるモデル複合体を、比較のために生成した。このマウス/ヒト複合体の検査により、マウスIL-6Rが芳香族残基の1つ(F155)を欠くことが示され(図6)、全ヒトについて見られたQ113F変異蛋白質の結合親和性の増強が、マウス/ヒト系では観察されるはずがないことを示唆している。この仮説を試験するため、本発明者らは、BAF3/gp130標準化細胞増殖アッセイを使用して(ヒトgp130をBAF3細胞表面で用いて)、野生型sgp130Fc及び三重変異蛋白質T102Y/Q113F/N114Lの阻害活性を、マウスIL-6/sIL-6R複合体を刺激用に使用して検査した。予想通り、変異蛋白質T102Y/Q113F/N114Lは、マウスIL-6/sIL-6Rに関して、野生型sgp130Fcよりも効果が低かった(図7)。同じことが、変異蛋白質N114Lにも当てはまる(データは示さず)。ヒトの系におけるN114L変異の疎水性の増大は、ヒトIL-6と比較したマウスIL-6におけるアミノ酸の交換(R117/M116)によって相殺される(データは示さず)。したがって、sgp130Fc変異蛋白質T102Y/Q113F/N114Lの増強された活性は、ヒトのIL6/sIL6複合体に限定される。興味深いことに、BAF3/gp130細胞においてヒトIL-6/sIL-6Rによるものと同じ増殖シグナルを誘発するのに、約3倍多いマウスIL-6/sIL-6Rが必要であり、このことは、BAF細胞表面上の、マウスIL-6/sIL-6R及びヒトgp130からなるマウス/ヒト複合体(並びに、sgp130Fc野生型及び変異蛋白質中に含有されるヒトgp130)は、全ヒトの対応物より効果が低いことを示している。

【実施例6】

【0068】

急性炎症のマウス空気嚢モデルを用いた種特異仮説のインビボ検定

(A) 動物の処置

動物及びそのケアに関する全ての手順は、国内及び国際法、並びにキール大学の動物ケアに関するガイドライン(受理番号: V 742-72241, 121-3(20-2/04) 及び(76-7/00))に従って行なった。マウスは、標準的な条件下で、12時間の明/暗サイクル中に維持され、餌及び水は自由に取らせた。血液は、尾放血によるか、又は全身麻酔下での心臓穿刺により得た。

【0069】

(B) 材料

カラギーナンは、シグマ-アルドリッチ(Sigma-Aldrich)(タウフキルヒェン(Taufkirchen)、ドイツ)から入手した。ダルベッコPBSは、PAAラボラトリーズ(コルベ、ドイツ)から購入した。単球化学的誘引蛋白質-1(MCP-1)用のデュオセット(DuoSet)ELISAキット及びsgp130は、R&Dシステム(ヴィースバーデン、ドイツ)から入手した。モノクローナル抗体Ly-6G及びF4/80は、各々、BD バイオサイエンセズ(Biosciences)(ハイデルベルグ、ドイツ)及びインビインビトロジェン(カールスルーエ、ドイツ)から入手した。

【0070】

(C) 空気嚢モデル

局部炎症の空気嚢モデルを、C57BL/6マウスで実施した(Edwardsら、J. Pathol. 1981年、第134巻、147-56)。簡単には、マウスを麻酔し、そして無菌空気6mlを注入することにより、皮下背部嚢を作成した。3日後、4mlの空気を再度嚢に注入した。6日目、無菌のPBS中の1%カラギーナン1mlを、嚢内に注入した。野生型sgp130Fc蛋白質、又は三重変異蛋白質T102Y/Q113F/N114L(50μg/マウス)、又はコントロールとしてのPBSを、カラギーナン注入の6時間前に腹腔内投与した。処置の72時間後、動物を犠牲死させ、そして嚢をPBS 3mlで洗浄した。洗浄液を直ちに氷上で冷却し、5,000rpmで4で10分間遠心分離した。上清を、MCP-1及びsgp130Fcについて、ELISAにより分析した。2×10⁵細胞を含有する空気嚢洗浄液のアリコートを用いて、FACS分析に使用した(FACS-Canto、ベクトン・ディッキンソン(Becton-Dickinson)、ハイデルベルグ、ドイツ)。モノクローナル抗体Ly-6G及びF4/80を使用して、各々、好中球及び単球をカウントした。データは、10,000ゲートイベントから得た。

10

【0071】

(D) 結果

空気嚢モデルを用いて、(1)三重変異蛋白質T102Y/Q113F/N114Lのインビボ活性を調べ、そして(2)野生型sgp130Fcを、変異蛋白質と比較して、種特異性仮説を試験し、実施例5に記載されるインビトロデータをインビボで確認した。本発明者らは、最近、マウス空気嚢モデルにおいて、IL-6/sIL-6複合体が、急性の好中球性状態から、単核細胞に支配されるさらに慢性の状態(Chalarisら、Blood、2007年、第110巻、p.1748-55;Rabeら、Blood、2008年、第111巻、p.1021-8)へ、炎症プロセスを動かすのに重要であることを示した。このモデルでは、単核細胞の浸潤は、ケモカインMCP-1によって媒介され、これは、ライニング細胞においてIL-6/sIL-6R複合体により誘導されるが、IL-6単独では誘導されない。したがって、このモデルを使用して、マウスにおいて、細胞の浸潤及びMCP-1の分泌が、野生型sgp130Fc及び変異蛋白質T102Y/Q113F/N114Lによって調整され得るのかを調べた。双方のsgp130Fc蛋白質の注射により、浸潤性細胞の数は、同程度まで明らかに減少した(図8A)。さらに、浸潤性の好中球及び単球の割合は、同じであった(図8B)。炎症領域内の変異蛋白質T102Y/Q113F/N114Lの濃度は、野生型sgp130Fcに比べてやや高かった(図8C)が、変異蛋白質T102Y/Q113F/N114Lは、MCP-1の濃度に対し、同じ阻害効果を示す(図8D)。したがって、本発明者らの構造モデル(図6)及びインビトロデータ(図7)から導かれる結論は、インビボの状況と充分に一致し、sgp130Fc変異蛋白質T102Y/Q113F/N114Lの活性増強が、ヒトのIL-6/sIL-6R複合体に限られることを示している。

20

30

【図 1】

g p 1 3 0 の N-末端ドメイン

MLTLQTWLVQALFIFLTTESTGELLDPCGYISPESPVVQLHSNFTA
VCVLKEKCMDYFHVNANYIVWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFT
DIASLNIQLTCNILTFGQLEQNVYG...

イタリック＝シグナルペプチド

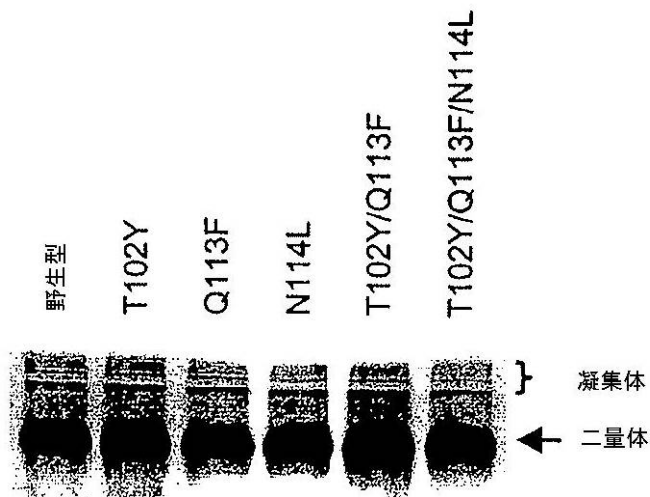
下線付き＝免疫グロブリン様 (Ig) ドメイン

T、Q、N＝ Thr_{102} (T)、 Gln_{113} (Q)、及び Asn_{114} (N)

野生型及び変異蛋白質の配列アライメント

...IQLTCNILTFGQLEQNVYG... 野生型
 ...IQL1CNILTFGQLE23VYG... 変異スキーム
 ...IQLYCNILTFGQLEQNVYG... T102Y ($\text{Thr}_{102} \rightarrow \text{Tyr}_{102}$)
 ...IQLTCNILTFGQLEFNVYG... Q113F ($\text{Gln}_{113} \rightarrow \text{Phe}_{113}$)
 ...IQLTCNILTFGQLEQLVYG... N114L ($\text{Asn}_{114} \rightarrow \text{Leu}_{114}$)
 ...IQLYCNILTFGQLEFNVYG... T102Y/Q113F
 ...IQLYCNILTFGQLEQLVYG... T102Y/N114L
 ...IQLTCNILTFGQLEFLVYG... Q113F/N114L
 ...IQLYCNILTFGQLEFLVYG... T102Y/Q113F/N114L

【図 2】



【図 3】

図 3 A

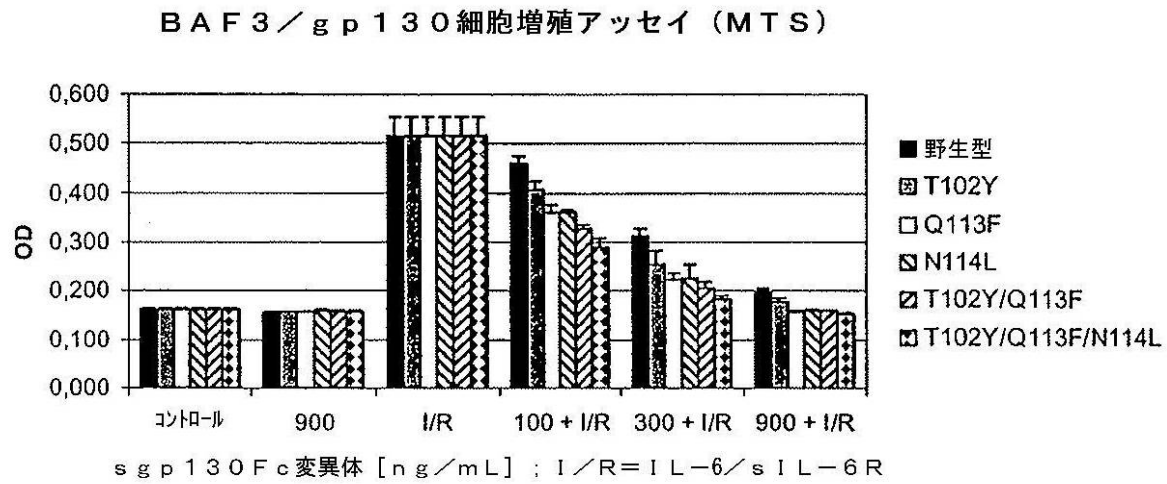
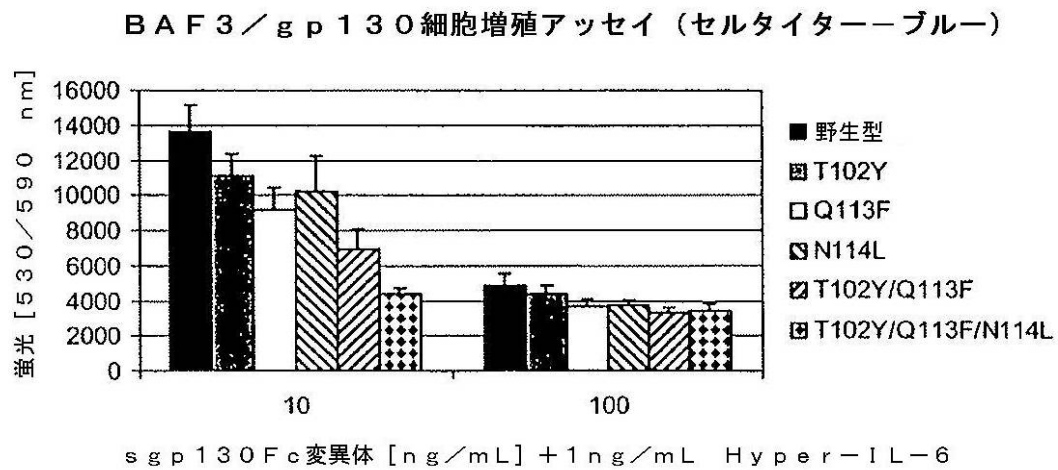
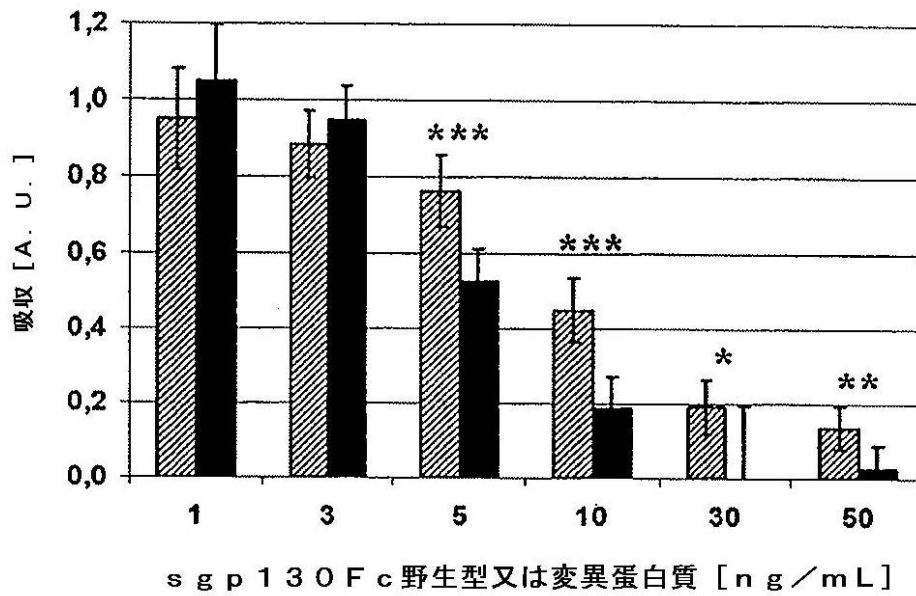


図 3 B



【図4】

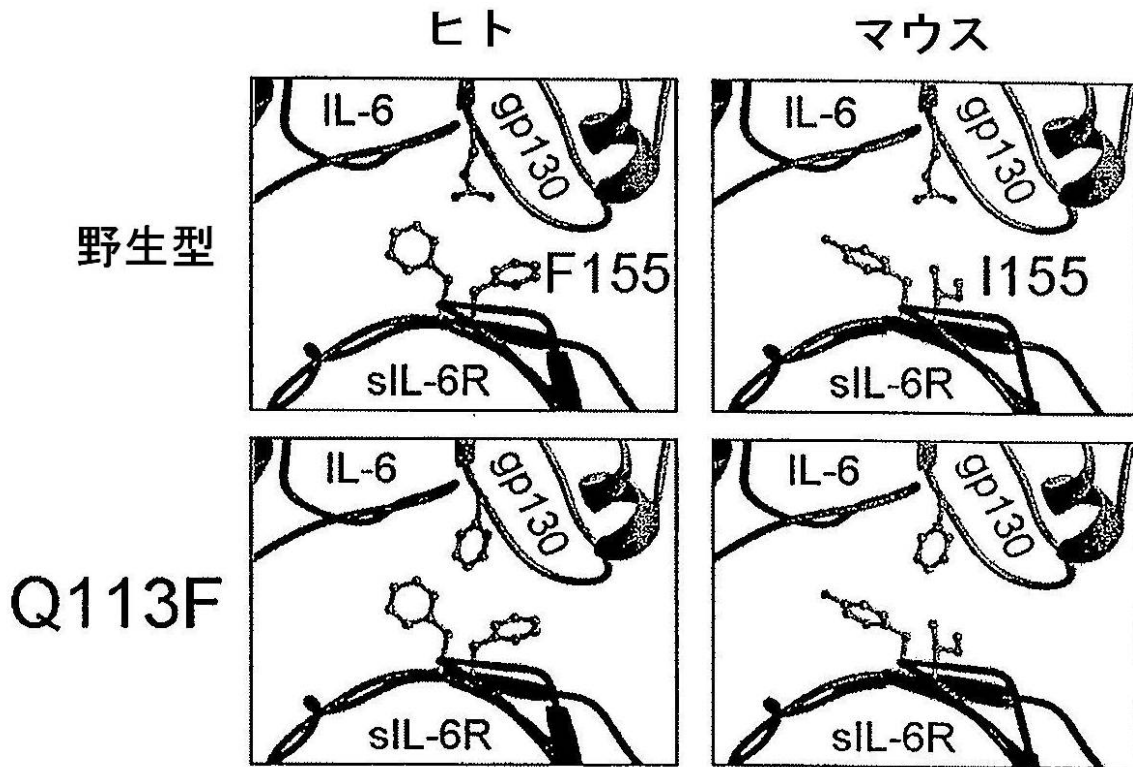
ELISAにより測定されたHepG2細胞からのハプトグロビン分泌



【図5】

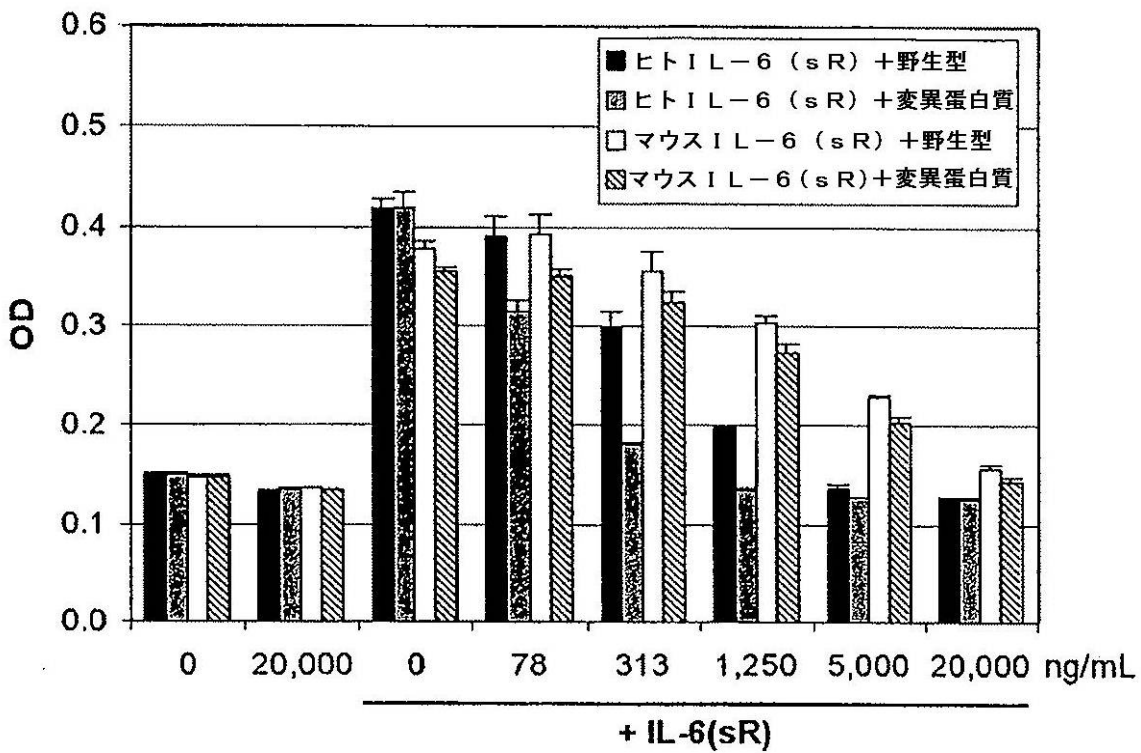
	k_{on} [1/Ms]	k_{off} [1/s]	K_D [M]
野生型 s g p 1 3 0 F c	$5.00 \times 10^5 \pm 893.9$	$2.50 \times 10^{-4} \pm 2.00 \times 10^{-6}$	4.99×10^{-10}
T102Y/Q113F/N114L	$5.42 \times 10^5 \pm 620.8$	$6.63 \times 10^{-5} \pm 1.33 \times 10^{-6}$	1.22×10^{-10}

【図6】

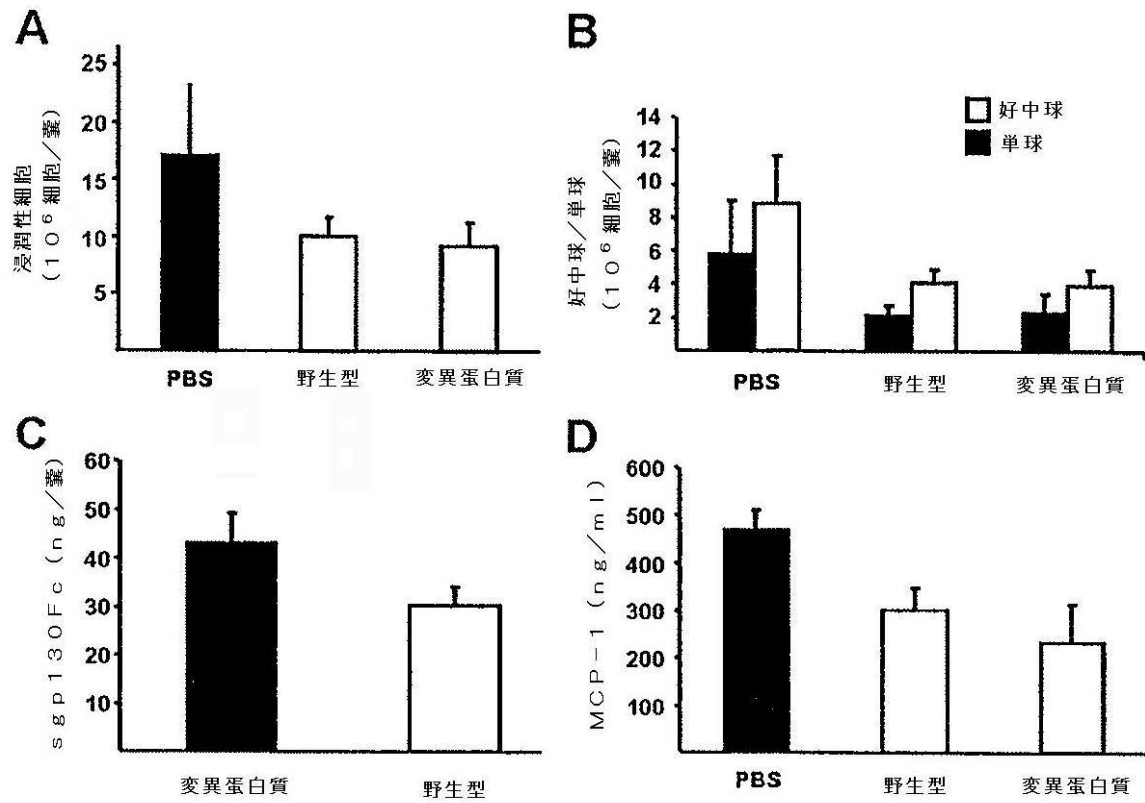


【図7】

BAF3/gp130細胞増殖アッセイ (MTS)



【図 8】



【配列表】

[2011501944000001.xml](#)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/008736

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/435		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 1 491 554 A (CONARIS RES INST AG [DE]) 29 December 2004 (2004-12-29) Paragraph 11, 13, 15 the whole document	
A	TENHUMBERG ET AL: "152 Characterization of Mutants of the Soluble GP130 Protein in Terms of their Binding Affinity Against the IL6/SIL6R Complex" CYTOKINE, ACADEMIC PRESS LTD, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 39, no. 1, July 2007 (2007-07), page 42, XP022328565 ISSN: 1043-4666 abstract	1,22
-/-		
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance 'E' earlier document but published on or after the International filing date 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means 'P' document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed 'T' later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art 'Z' document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
9 December 2008		05/01/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Simm, Mariola

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2008/008736

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DE 199 41 897 A1 (GSF FORSCHUNGSZENTRUM UMWELT [DE]) 15 March 2001 (2001-03-15) Fig. 8, Page 3, claims.	
A	EP 1 801 121 A (CONARIS RES INST AG [DE]) 27 June 2007 (2007-06-27) Paragraph 13. the whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2008/008736

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1491554	A	29-12-2004	AT 370162 T DE 602004008273 T2 DK 1636263 T3 EP 1636263 A2 WO 2004113383 A2 ES 2293278 T3 JP 2007526745 T US 2008227155 A1 US 2007270334 A1	15-09-2007 08-05-2008 17-12-2007 22-03-2006 29-12-2004 16-03-2008 20-09-2007 18-09-2008 22-11-2007
DE 19941897	A1	15-03-2001	JP 2001078781 A US 6605703 B1	27-03-2001 12-08-2003
EP 1801121	A	27-06-2007	AU 2006328909 A1 CA 2633213 A1 EP 1994053 A1 WO 2007071449 A1	28-06-2007 28-06-2007 26-11-2008 28-06-2007

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
A 6 1 K	38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P	19/08 (2006.01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P	7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P	29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P	31/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/04	
A 6 1 P	5/00 (2006.01)	A 6 1 P 5/00	
A 6 1 P	3/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N	33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/531	A
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, T R), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, K G, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100156915

弁理士 伊藤 奈月

(72)発明者 グローツィンガー, ヨアヒム

ドイツ連邦共和国 2 4 2 1 4 アルトヴィッテンベク, シュテンロット 2 0

(72)発明者 シェラー, ユルゲン

ドイツ連邦共和国 2 4 1 4 5 キール, ビュッヘンベク 2

(72)発明者 テンフンベルク, ステファニー

ドイツ連邦共和国 5 5 1 1 8 マイんツ, アム ツォルハーフェン 1 0

(72)発明者 ロゼ - ジョン, ステファン

ドイツ連邦共和国 2 4 2 1 1 シェルホルン, セオドア - ヘス - ベク 6

(72)発明者 ヴェーツィッヒ, ゲオルク, ハー .

ドイツ連邦共和国 2 4 1 0 6 キール, ハイデル シュトラーセ 1 9

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA15 BA53 BA63 CA02 CA07 EA04 HA01 HA15

4B064 AG20 AG26 CA19 CC24 DA01 DA13

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA25 CA44 CA46

4C084 AA01 AA02 AA07 AA13 BA01 BA08 BA22 BA23 DA59 DC50

NA14 ZA512 ZA962 ZB072 ZB112 ZB132 ZB262 ZB352 ZC022 ZC032

ZC212 ZC542

4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA50 DA75 EA22 EA54

FA74

专利名称(译)	可溶性gp130突变蛋白具有改善的结合活性		
公开(公告)号	JP2011501944A	公开(公告)日	2011-01-20
申请号	JP2010529287	申请日	2008-10-15
申请(专利权)人(译)	Konarisu研究所AG		
[标]发明人	グローツィンガーヨアヒム シェラーユルゲン テンフンベルクステファニー ロゼジョンステファン ヴェーツィッヒゲオルクハー		
发明人	グローツィンガー,ヨアヒム シェラー,ユルゲン テンフンベルク,ステファニー ロゼ-ジョン,ステファン ヴェーツィッヒ,ゲオルク,ハー.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K14/715 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/02 C07K16/28 A61K38/00 A61K48/00 A61P43/00 A61P19/08 A61P7/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P29/00 A61P31/04 A61P5/00 A61P3/00 G01N33/53 G01N33/531 C07K19/00		
CPC分类号	A61P3/00 A61P3/14 A61P19/08 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 C07K14/70503 C07K14/7155 G01N33/6893		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K14/715 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 C12P21/02.C C07K16/28 A61K37/02 A61K48/00 A61P43/00.111 A61P19/08 A61P7/00 A61P35/00 A61P37/02 A61P37/08 A61P29/00 A61P31/04 A61P5/00 A61P3/00 G01N33/53.D G01N33/531.A C07K19/00		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA15 4B024/BA53 4B024/BA63 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/EA04 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG20 4B064/AG26 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA01 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA08 4C084/BA22 4C084/BA23 4C084/DA59 4C084/DC50 4C084/NA14 4C084/ZA512 4C084/ZA962 4C084/ZB072 4C084/ZB112 4C084/ZB132 4C084/ZB262 4C084/ZB352 4C084/ZC022 4C084/ZC032 4C084/ZC212 4C084/ZC542 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA75 4H045/EA22 4H045/EA54 4H045/FA74		
代理人(译)	森田浩二 田中玲子 松任谷裕子 北野 健		
优先权	2007020512 2007-10-19 EP 2008009648 2008-05-27 EP		
其他公开文献	JP5581214B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

描述了可溶性gp130多肽单体和二聚体，其中，在优选的实施方案中，gp130的N-末端Ig样结构域的三个氨基酸残基Thr102，Gln113或Asn114中的至少一个突变为Tyr102，分别是Phe 113或Leu 114。这些突变，单独或组合，特异性地增强gp130与白细胞

介素-6和可溶性白细胞介素-6受体的配体复合物的结合，从而增加gp130突变蛋白的生物活性。在特别优选的实施方案中，所有三种突变组合在三重突变蛋白Thr102Tyr / Gln113Phe / Asn114Leu (T102Y / Q113F / N114L) 中。此外，描述了含有所述单体或二聚体和各种医学用途的药物组合物。