

(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2009-520480

(P2009-520480A)

(43) 公表日 平成21年5月28日(2009.5.28)

(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 0 2 4
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 B 0 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 H 0 4 5
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 23 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2008-546287 (P2008-546287)	(71) 出願人	505470960 コナリス リサーチ インスティテュート アーゲー
(86) (22) 出願日	平成18年12月22日 (2006.12.22)		ドイツ連邦共和国 キール 2 4 1 1 8 シャウエンブルガーシュトラッセ 1 1 6
(85) 翻訳文提出日	平成20年8月18日 (2008.8.18)	(74) 代理人	110000202 新樹グローバル・アイピー特許業務法人
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/012515	(72) 発明者	セーゲルト, ディルク ドイツ連邦共和国 アルテンホルツ 2 4 1 6 1 フリーゼンベルク 1 4 8
(87) 国際公開番号	W02007/071449	(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 キール 2 4 1 0 6 ハイデルシュトラッセ 1 9
(87) 国際公開日	平成19年6月28日 (2007.6.28)	Fターム(参考)	4B024 AA01 AA11 BA63 CA05 DA02 EA04 GA13 HA01
(31) 優先権主張番号	05028420.7		最終頁に続く
(32) 優先日	平成17年12月23日 (2005.12.23)		
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		

(54) 【発明の名称】 医薬として有用な可溶性 g p 1 3 0 分子変異体

(57) 【要約】

2つのモノマー断片のポリペプチド二量体であって、モノマー断片は、グリコプロテイン (g p) 1 3 0 の細胞外部位と、5から30のアミノ酸長を有するC末端でのポリペプチドスペーサとから構成され、2つのモノマー断片は、互いに共有結合し、スペーサ長は、得られる二量体プロテインの I L - 6 / 可溶 I L - 6 レセプター複合体への最適結合を決定し、ポリペプチド二量体は、相同凝集体及び分子断片への著しく低減した結合能を示し、宿主細胞における著しく高い生成率が得られる2つのモノマー断片のポリペプチド二量体。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

2つのモノマー断片のポリペプチド二量体であって、
モノマー断片は、グリコプロテイン (gp) 130の細胞外部位のドメイン1から3 (D1からD3)と、それらのC末端での5から30のアミノ酸長を有するポリペプチドスペーサを含み、

2つのモノマー断片は、互いに共有結合し、
スペーサ長は、得られる二量体プロテインのIL-6/可溶IL-6レセプター複合体への最適結合を決定し、

ポリペプチド二量体は、相同凝集体及び分子断片への著しく低減した結合能を示し、
宿主細胞において著しく高い生成率が得られる2つのモノマー断片のポリペプチド二量体。

10

【請求項 2】

2つのモノマー断片が同一である請求項1のポリペプチド二量体。

【請求項 3】

さらにsgp130のドメイン(D4からD6)を含まない請求項1のポリペプチド二量体。

【請求項 4】

2つのモノマーの共有結合二量体が、1以上のジスルフィド架橋によって得られる請求項1から3のいずれか1つによるポリペプチド二量体。

20

【請求項 5】

ジスルフィド架橋が、IgG-Fc分子へのモノマー断片の融合によって生成される請求項4のポリペプチド二量体。

【請求項 6】

ジスルフィド架橋が、1以上の遊離の付随可能なシステイン残基を含む天然又は人工のポリペプチドへのモノマー断片の融合によって生成される請求項4のポリペプチド二量体。

【請求項 7】

2つのモノマーの共有結合二量体が、化学又は物理的結合のいずれかによって得られる請求項1から3のいずれか1つによるポリペプチド二量体。

30

【請求項 8】

ポリペプチドスペーサが、たんぱく質分解的切断から分子を保護するために選択的にグリコシル化されてなる請求項1から7のいずれか1つによるポリペプチド二量体。

【請求項 9】

ポリペプチドスペーサが、10から25のアミノ酸長を有する請求項1から8のいずれか1つによるポリペプチド二量体。

【請求項 10】

ポリペプチドスペーサが、15から25のアミノ酸長を有する請求項9によるポリペプチド二量体。

【請求項 11】

スペーサは、1、2、3、4、5又は6のnで、アミノ酸配列(GGGGS)_nを有する請求項1から10のいずれか1つによるポリペプチド二量体。

40

【請求項 12】

50%未満の相同凝集体及び分子断片を形成する請求項1から12のいずれか1つによるポリペプチド二量体。

【請求項 13】

25%未満の相同凝集体及び分子断片を形成する請求項12によるポリペプチド二量体。

【請求項 14】

10%未満の相同凝集体及び分子断片を形成する請求項13によるポリペプチド二量体

50

。

【請求項 15】

5%未満の相同凝集体及び分子断片を形成する請求項 14 によるポリペプチド二量体。

【請求項 16】

モノマーは、図 8 に表されたアミノ酸配列を有する請求項 1 から 15 のいずれか 1 つによるポリペプチド二量体。

【請求項 17】

請求項 1 から 16 のいずれか 1 つのポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 18】

ポリヌクレオチド配列が、真核生物宿主細胞、バクテリア、イースト又は昆虫細胞でコードされたタンパク質の生成のために最適化されたコドンである請求項 17 のポリヌクレオチド。

10

【請求項 19】

図 7 に表された核酸配列を含む請求項 17 又は 18 のポリヌクレオチド。

【請求項 20】

請求項 17 から 19 のいずれか 1 つのポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

【請求項 21】

請求項 20 の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 22】

請求項 21 の宿主細胞を培養し、ポリペプチドモノマー又は二量体を前記宿主細胞又は培養媒体から回収し、それを生成することを含む請求項 1 から 16 のいずれか 1 つのポリペプチド二量体を生成する方法。

20

【請求項 23】

請求項 1 から 16 のいずれか 1 つのポリペプチド二量体又は請求項 17 から 19 のいずれか 1 つのポリヌクレオチドを含む医薬組成物。

【請求項 24】

骨吸収、高カルシウム血症、悪液質、腫瘍、ガン、自己免疫病気、炎症性疾患、細菌性又はウイルス性感染症の治療又は予防のための医薬組成物の製造のための、請求項 1 から 17 のいずれか 1 つのポリペプチド二量体又は請求項 17 から 19 のいずれか 1 つのポリヌクレオチドの使用。

30

【請求項 25】

スペーサ領域、リンカー領域及び / 又はポリペプチド二量体の D3 / スペーサ結合領域に対して特異的である請求項 1 から 16 のいずれか 1 つのポリペプチド二量体と結合した抗体。

【請求項 26】

請求項 1 から 16 のいずれか 1 つのポリペプチド二量体と結合した請求項 25 の抗体の検出に基づく診断方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

グリコプロテイン (gp) 130 の細胞外 (可溶性) 部分のドメイン 1 ~ 3 と、特定のポリペプチドスペーサを含む 2 つの同一のモノマー断片から構成されるポリペプチド二量体が記載され、それは、互いに共有結合されており、宿主細胞中のそれらの生成率、それらの改善された精製及びそれらの IL-6 / 可溶性 IL-6 レセプター複合体に結合する能力に関して、顕著な利点を有する。また、その二量体分子を含む医薬組成物及び種々の医療用途が記載されている。

40

【背景技術】

【0002】

多形質発現サイトカインインターロイキン - 6 (IL-6) は、主として、B 及び T 細胞の刺激、後天性及び先天性の免疫プロセスの制御及び肝臓の急性期タンパク質合成の誘

50

導が顕著である、広範な生物学的機能を示す。IL-6は、結合によって細胞反応を誘発するgp130の二量体化を誘導する膜結合又は可溶性IL-6レセプター(「IL-6R」または「gp80」)によってその活性を示す。

【0003】

IL-6Rの細胞質ドメインはキナーゼ活性を欠いているため、gp130ホモ二量体によるシグナリングは、膜結合又は可溶性IL-6Rとの複合体におけるIL-6によって誘導することができる。gp130は、ほとんどすべての細胞タイプで見出すことができるが、IL-6R発現は、肝細胞及び白血球に制限される。しかし、これらの細胞は、タンパク質分解的切断又は選択的スプライシングのいずれかによるIL-6R発現細胞から放出されるsIL-6R經由IL-6によって活性化することができる。このメカニズムは、トランスシグナリングと呼ばれている。実際、いくつかの細胞の活性が、IL-6単独で誘導されず、sIL-6RとIL-6との複合体に依存することが示されている。

トランスシグナリングは、先天性免疫反応から後天性免疫反応へのスイッチで重要な役割を果たし、好中球浸潤のクリアランスならびに継続した免疫学的応答に対するT細胞とB細胞との漸増及び活性化のために重要である。このメカニズムの調節不全は、クローン病、慢性関節リウマチ、喘息等の慢性及び/又はアレルギー性炎症性疾患の発現及び持続をもたらす。

【0004】

これらの疾患の治療に関して、IL-6によって媒介されるプロセスの特定の遮断が治療的に有効であることが示された。残念なことに、この目的のために現在利用できるすべての化合物は、これまでのところ、いくぶん重篤な副作用(例えば、二次感染、結核、敗血症)、毒性又は免疫原性の問題を有する。また、未解決の問題は、有用で経済的な精製方法の開発中に認められている。

【発明の開示】

【0005】

技術的問題の解決は、クレームにおいて特徴付けられた実施形態の提供によって達成される。本発明を導く実験の間に、gp130の全細胞外部分の2つの分子からなる親化合物sgp130Fcの精製が十分でないことが見出された。この融合タンパク質は、真核性CHO細胞で発現された場合、望まない副生成物(例えば、より小さな断片、オリゴマー及び多様な組合せにおける凝集)を構築する傾向がある。その不純物及び核となる生成物は非常に類似した化学的及び物理的特性を有するため、適当な量で、これらの不純物から目的化合物を分離する適当な精製方法を見出すことは不可能であった。特に、試験方法は、異なる親和性、サイズ除外及びイオン交換クロマトグラフィ(イオン添加又はpHシフト等によるタンパク質の可溶性を変えるためにアプローチした)であった。これらの方法のいずれも、満足な結果を与えなかったが、GMPに対応した精製プロセスを開発するためのグレードアップに適していなかった。それに対して、親分子sgp130Fcのより短い変異体(sgp130(D1-3)Fcと呼ぶ、細胞外ドメイン4~6を欠損)が精製副生成物から良好に分離されたことが見出された。これは、親sgp130Fc分子のフィブロネクチンIII領域(ドメイン4~6)内のエレメントを形成する凝集が良好に消失したことを示した。さらに、この分子は、著しく高率で、真核細胞によって発現された。

【0006】

次の工程で、新しい分子sgp130(D1-3)FcのIL-6/sIL-6Rへの結合効率を、sgp130(D1-3)及びIgG-Fc部位間での種々の長さのポリペプチドスペーサを融合させることによって最適化した。結果として生じた分子の結合技術を、特異的酵素結合抗体免疫測定法(ELISA)で測定し、親分子sgp130Fcと比較した(図5)。

【0007】

IL-6/sIL-6R複合体の結合は、クローン病患者の単球におけるIL-6のリアポトーシス作用を阻害することが示されており、そのような化合物がクローン病及び大

10

20

30

40

50

腸炎、慢性関節リウマチ、乾癬、腹膜炎等のような関連疾患の治療に有用であることを示す。

【0008】

クローン病は、急性炎症の頻繁に起こる再発によって特徴づけられる全ての消化管の慢性炎症性障害である。感染、けが及び他の要因と関連した炎症は、急性期タンパク質（A P P s）の発現を伴う急性期反応（A P R）を迅速に誘発する。A P Rは、主に脈管透過性の増加及び発熱をもたらす。I L - 6 族類は、S T A T 3 によって媒介されるタイプII A P P 遺伝子の発現を亢進する。S T A T 3（つまり、チロシンリン酸化）の強力な活性は、炎症性腸疾患（I B D）患者からの結腸組織で示されている。さらに、S T A T 3 活性化の減少が、実験的なネズミ大腸炎の減少した発現を関連する I L - 6⁻¹ マウスで観察された(Suzukiら、J. Exp. Med., 2001, 193:471)。

これらの実験は、I L - 6 / s I L - 6 R によって媒介される S T A T 3 の活性が、大腸炎の発現及び永続化で重要な役割を果たすことを示した。もう一つの炎症性モデルでは、リウマチ様関節炎（R A）において、S T A T 3 が R A 滑液線維芽細胞の残存にとって重要であることが示された(Krauseら、J. Immunol, 2002, 169:6610)。従って、S T A T 3 は、遺伝子治療の良好なターゲットとなるかもしれないことが示唆された。本質的な S T A T 3 活性は、「発癌性」要因であり、反アポトーシスタンパク質（例えば、B c l - 2 及び B c l - X L）のアップグレード化を伴うことが知られている(Turksonら、Oncogene, 2000, 19:6613)。

【0009】

I L - 6 / s I L - 6 R によって媒介される S T A T 3 活性化が親 s g p 1 3 0 F c 化合物に匹敵する有効性レベルで s g p 1 3 0 (D 1 - 3) F c によって著しく減少させられることが見出された。さらに、s g p 1 3 0 (D 1 - 3) F c (s g p 1 3 0 V a r) は、真核細胞中で s g p 1 3 0 F c より高い量で発現され、望まれていない副生成物を生成せず、標準的なカラムクロマトグラフィーによって残留する不純物から分離することができた。これらの利点は、適当な G M P 生成方法の開発を顕著に強化し、製品コストを低減させる。

【0010】

従って、本発明は、2つのモノマー断片のポリペプチド二量体に関し、モノマー断片は、グリコプロテイン（g p）130の細胞外部分のドメイン1～3（D1からD3）及びそれらのC末端で、5～30の長さのアミノ酸を有するポリペプチドスペーサを含み、両モノマー断片は、互いに共有結合しており、スペーサ長は、I L - 6 / 可溶性 I L - 6 レセプター複合体への、結果として生じる二量体タンパク質の最適結合を決定し、ポリペプチド二量体は、相同凝集体及び分子断片を構成する能力の顕著な減少を示し、宿主細胞において顕著に高い生産性が得られる。

【0011】

本発明のポリペプチド二量体は、既知の方法を使用して設計することができる。ここで用いられる用語「可溶性」（省略形「s」）は、少なくとも細胞内ドメイン及び膜内外ドメインが欠損した g p 1 3 0 分子を指す。利用されるドメインは、g p 1 3 0 の細胞外ドメイン D 1 から D 3 からなるか、あるいは、それらは、作動性複合体 I L - 6 / s I L - 6 R の活性の阻害能を維持するそれらの変異体又は断片からなってもよい。好ましくは、g p 1 3 0 の可溶性部分に対応するポリペプチドは、本発明のポリペプチド二量体の唯一の生物学的に活性なポリペプチドである。

【0012】

好ましい実施形態において、本発明のポリペプチド二量体の2つのモノマー断片は、同一である。

本発明のポリペプチド二量体のさらに好ましい実施形態において、二量体は s g p 1 3 0 のさらなるドメイン（D4からD6）を含まない。

【0013】

二量体を構成する2つのモノマーの結合は、公知の方法を用いて、当業者によって実行

10

20

30

40

50

することができる。二量体を形成するために、2つの可溶性 g p 1 3 0 分子は、1以上のジスルフィド架橋によって互いに結合させることができる。これは、例えば、組換え発現によって行うことができ、s g p 1 3 0 をコードする核酸配列が、そのC末端で、s g p 1 3 0 のC末端と停止コドンとの間のシステイン残基をコードする1以上のコドンを含むポリペプチドリンカーに融合する。あるいは、二量体を生成するために、2つの s g p 1 3 0 分子の間の分子間結合（例えば、共有結合、イオン結合）のいずれかを与える各 s g p 1 3 0 分子の末端へのリンカーを用いることができる。

【0014】

このリンカーは、完全に人工的であってよい（例えば、特定の間隔でセリン、アラニン及び/又はトレオニンによって中断されるかもしれないポリグリシンの反復）。あるいは、二量体を生成するために、2つの可溶性 g p 1 3 0 分子が、ヒンジ領域（直接又はリンカーを介して）を含む I g G - F c 断片に、C末端で融合されていてもよい。さらに、F c 分子のヒンジ領域内の遊離システイン残基は、望まない分子間ジスルフィド架橋を構成する危険を減らすために、変異体によって欠損されていてもよい。また、二量体の分子は、例えば、His-His-His-His-His-His (His₆)、M y c、連鎖球菌 (Strep)、ポリアルギニン、フラグ (Flag)、緑蛍光タンパク質 (GFP)、TAP、グルタチオン S - 転移酵素 (GST)、HA、カルモジュリン結合ペプチド (CBP)、マルトース結合タンパク質 (MBP)、V5、HSV、S、水疱性口内炎ウイルス (VSV)、プロテインC、ルシフェラーゼ、Glu-Glu、E、 - GAL、T7 あるいは、抗体又は他の結合分子が、適切なクロマトグラフィーシステム及び/又は検出、例えば、ウェスタンブロット、ELISA、生物検定等によって精製を可能にして利用することができるような他のエピトープによって標識されていてもよい。

10

20

【0015】

I L - 6 / s I L - 6 R 複合体への最適な結合を得るために必要である二量体分子内で、2つの s g p 1 3 0 サブユニット間の最適距離を与えるために、s g p 1 3 0 サブユニットは、5 ~ 30 のアミノ酸長、好ましくは (i) 10 ~ 25、(ii) 15 ~ 25、特に好ましくは 10 ~ 15 のアミノ酸長を有する (ポリ) ペプチドスペーサに、それらのC末端で融合されている。スペーサを構成するアミノ酸の種類は特に重要でないが、(a) モノマーの最適なアライメントが可能な理想的な立体柔軟性を確実にし、(b) プロテアーゼ及び抗体によって容易に影響を受けず、(c) 他の分子と二量体とのいかなる望まれない凝集又は三量体等の形成を減少させるために帯電されていない、アミノ酸 (G 又は S のように) が好ましい。スペーサ分子を構成するための好ましいアミノ酸は、アミノ酸配列「GGGGS」の1以上の反復であるが、スペーサは、s g p 1 3 0 分子の結合するリガンドを強化する他のいかなる配列をも有することができる。

30

【0016】

本発明のポリペプチド二量体の特に好ましい実施形態では、スペーサは、タンパク質分解的切断から分子を保護するために、選択的にグリコシル化される。

【0017】

特に好ましい実施形態では、本発明のポリペプチド二量体は、50%未満の相同凝集体及び分子断片を、好ましくは25%未満の相同凝集体及び分子断片を、より好ましくは10%未満の相同凝集体及び分子断片を、最も好ましくは5%未満の相同凝集体及び分子断片を形成する。

40

【0018】

また、本発明は、本発明のポリペプチド二量体 (又はそれぞれのモノマー) をコードするポリヌクレオチドを提供し、それは真核宿主細胞、バクテリア、酵母又は昆虫細胞においてコードされたタンパク質の効率的な生成のために最適化されたコドンであってよい。好ましくは、そのポリヌクレオチドは、図7に示される核酸配列を含む。

【0019】

さらに、本発明は、本発明のポリヌクレオチドを含む発現ベクター及び対応宿主細胞に関する。

50

【 0 0 2 0 】

種々の手段を、望む特性を有する s g p 1 3 0 の変異体又は修飾を発現させる及び確認するために用いることができる。s g p 1 3 0 をコードする D N A の標準技術による部位特異的突然変異誘発法又は制限消化及びリゲーション等の最高水準の方法を用いることができ、続いて、望む特性を有する変異分子を同定するために生成物のコレクションを分析する。

【 0 0 2 1 】

本発明のポリペプチド二量体は、本発明のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド及びベクター、好ましくはポリヌクレオチドを含む発現ベクターの使用によって、好ましくはリコンビナント的に生成される。本発明のポリペプチドの生成のために、ポリヌクレオチドは、既存のクローン、つまり、好ましくは天然に存在するポリペプチド又はその一部をコードする既存のクローンから得られる。ポリペプチドは、ポリペプチドが本来の配列の生物学的活性を維持し、本発明のポリペプチドを生成するために有用である限り、非常にストリンジェント又は中等度にストリンジェントな状況下で、天然の D N A 又は R N A の相補体にハイブリダイズするいかなるポリヌクレオチドによってもコードされる（定義に関して、Sambrook、Molecular Cloning A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y 参照）。

10

【 0 0 2 2 】

組換えベクターは、当業者によく知られた方法（例えば、Sambrook、Molecular Cloning A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N. Y）に従って構築することができる。種々の発現ベクター/宿主システムが、本発明の s g p 1 3 0 ポリペプチドをコードする配列を含み及び発現させるために利用することができる。限定されないが、これらは、微生物（例えば、組換えバクテリオファージで形質変換したバクテリア、プラスミド又はコスミド D N A 発現ベクター）；イースト発現ベクターで形質変換したイースト；ウイルス発現ベクターで感染した昆虫細胞システム（例えば、バキュロウイルス）；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）又はバクテリア発現ベクター（例えば、I i 又は p B R 3 2 2）で形質変換された植物細胞システム；又は動物細胞システムを含む。

20

【 0 0 2 3 】

「制御要素」又は「調節塩基配列」は、ベクター - エンハンサーの未翻訳領域、プロモーター、転写及び翻訳を行うために宿主細胞タンパク質と相互作用する 5' 及び 3' - 未翻訳領域である。そのような要素は、それらの強度及び特異性において異なるかもしれない。利用されるベクターシステム及びホストによって、多くの適当な転写及び翻訳要素（構造的性及び誘導可能なプロモーターを含む）を、用いることができる。例えば、バクテリアシステムにおいてクローニングする場合、Bluescript. RTM. Phagemid (Stratagene, La Jolla, CA) 又は p S P O R T 1 . T M プラスミド（ギブコ、B R L）等のハイブリッド l a c Z プロモーターのような誘導可能プロモーターが挙げられる。バキュロウイルスポリヘドリン (polyhedrin) プロモーターを、昆虫細胞において用いることができる。植物細胞のゲノムに由来する（例えば、熱ショック、R U B I S C O 及び貯蔵タンパク質遺伝子）又は植物ウイルスに由来する（例えば、ウイルスプロモーター又はリーダー配列）プロモーター又はエンハンサーは、ベクターにクローン化することができる。哺乳類の細胞システムで、哺乳類の遺伝子又は哺乳類のウイルスからのプロモーターが好ましい。s g p 1 3 0 ポリペプチドをコードする配列の複数のコピーを含む細胞系を生成するために必要であれば、S V 4 0 又は E B V に基づくベクターを適当な選択可能マーカーとともに用いることができる。

30

40

【 0 0 2 4 】

バクテリアのシステムでは、いくつかの発現ベクターを、本発明のポリペプチド二量体を目的とする使用によって、選択することができる。本発明における使用のために適するベクターとしては、特に限定されないが、バクテリアの発現のための p S K K 発現ベクターが挙げられる。

50

【 0 0 2 5 】

イースト、サッカロマイセス・セレヴィシエでは、アルファ因子のような構造的な又は誘導可能なプロモーターを含むいくつかのベクター、アルコールオキシダーゼ及び P G H を用いることができる。検討のために、Grantら、(1987) *Methods Enzymol.* 153 :516-544 参照。

【 0 0 2 6 】

植物発現ベクターが用いられる場合、本発明の抗体をコードする配列の発現が、いくつかのプロモーターのいずれにおいても促進されるかもしれない。例えば、C a M V の 3 5 S 及び 1 9 S プロモーターのようなウィルスプロモーターを、単独又は T M V からのオメガリーダー配列との組み合わせにおいて用いることができる (Takamatsu, N (1987) *EMBO J.* [pound]: 307-311)。あるいは、R U B I S C O の小さなサブユニットのような植物プロモーター又は熱ショックプロモーターを用いることができる (Coruzzi, G.ら、(1984) *EMBO J.* 3:1671-1680、Broglie, R.ら、(1984) *Science* 224 :838-843及びWinter, J.ら、(1991) *Results Probl. Cell Differ.* 17:85-105)。構造体は、直接の D N A 形質変換又は病原によって媒介されるトランスフェクションによって植物細胞に導入することができる。そのような技術は、多くの一般に利用できる文献に記載されている (例えば、Hobbs, S.及びMurry, L. E. in McGraw Hill Yearbook of Science and Technology (1992) McGraw Hill, New York, NY; pp. 191-196参照)。

10

【 0 0 2 7 】

昆虫システムを本発明の s p g 1 3 0 分子を発現させるために用いてもよい。例えば、そのようなシステムの1つとして、オートグラフカリフォルニア核多角体病 (A c N P V) が、*Spodoptera Frugiperda*細胞において又は*Trichoplusia larvae*において、外来遺伝子を発現させるためにベクターとして用いられる。配列はポリヘドリン遺伝子のようなウィルスの非必須領域にクローニングすることができ、ポリヘドリンプロモーターの制御下で配置することができる。s p g 1 3 0 をコードする遺伝子の良好な導入は、ポリヘドリン遺伝子を不活性化させ、コートタンパク質を欠いた組換えウィルスを生成するであろう。よって、組換えウィルス、例えば、A P O P を発現させることができる*S. frugiperda*細胞又は*Trichoplusia larvae*を、感染させるために用いることができる (Engelhard, E. K.ら、(1994) *Proc. Nat. Acad. Sci.* SKL:3224-3227)。

20

【 0 0 2 8 】

哺乳類の宿主細胞において、多くのウィルス系発現システムを利用することができる。アデノウイルスが発現ベクターとして用いられる場合、本発明のポリペプチドをコードする配列を、後期プロモーター及び三深裂したリーダー配列からなるアデノウイルス転写/翻訳複合体にリゲートすることができる。ウィルスゲノムの必須でない E 1 又は E 3 領域における挿入を、感染細胞におけるタンパク質を発現することができる生存可能なウィルスを得るために用いることができる (Logan, J.及びShenk, T. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 3655-3659)。また、転写エンハンサー (例えば、ラウス肉腫ウイルス (R S V) エンハンサー) を、哺乳類の宿主細胞の発現を増加させるために用いることができる。

30

【 0 0 2 9 】

また、ヒト人工染色体 (H A C s) を、プラスミドにおいて含まれ、発現することができるよりも、より大きな D N A 断片を与えるために使用することができる。6 から 1 0 M の H A C s が、治療目的のための従来の送付方法 (リポソーム、ポリカチオンアミノポリマー又は小囊) によって構築され、与えられる。

40

【 0 0 3 0 】

特定の開始シグナルを、より効果的な翻訳を成し遂げるのに用いることができる。そのようなシグナルは、A T G 開始コドン及び隣接配列を含む。s g p 1 3 0 をコードする配列、その開始コドン及び上流配列が適当な発現ベクターに挿入される場合、さらなる転写又は翻訳制御シグナルは必要でないかもしれない。しかし、コード配列のみが挿入される場合、A T G 開始コドンを含む外因性の翻訳制御シグナルが提供されなければならない。さらに、開始コドンが、全ての挿入物の翻訳を確実にするために、正しい読み枠中になけ

50

ればならない。外因性の翻訳要素及び開始コドンは、種々の起源（天然及び合成の双方）のものかもしれない。発現効率は、例えば、文献記載のそれらのような、用いられる特定の細胞システムのために適切なエンハンサーの包含物によって強化されるかもしれない(Scharf, D.ら、(1994) Results Probl. Cell Differ. 20:125-162)。

【0031】

さらに、宿主細胞株を、挿入された配列の発現を調整するか、望ましい方法で発現されたポリペプチド鎖を処理するその能力のために選択することができる。また、ポリペプチドの「プリプロ(prepro)」の形態を開裂するポスト翻訳処理を、正しい挿入、折りたたみ及び/又は機能を促進するために用いることができる。ポスト翻訳活性のための特定の細胞機構及び特徴的なメカニズムを有する異なる宿主細胞（例えば、CHO、HeLa、MDC K、HEK 293又はW138）が、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション(ATCC:ベセズダ、MD)から入手可能であり、外来のポリペプチド鎖の正しい修飾及び処理を確実にするために選択することができる。

【0032】

組換ポリペプチドの持続性、高収率のために、安定した発現が好ましい。例えば、安定にsgp130鎖を発現する細胞系は、複製及び/又は内因性発現要素のウイルス起源及び同じ又は別々のベクターにおける選択可能なマーカー遺伝子を含むかもしれない発現ベクターを用いて形質変換することができる。ベクターの導入後、それらが選択的なメディアにスイッチされる前に、細胞は、富化媒体で1~2日間成長することができるかもしれない。選択可能なマーカーの目的は、選択に対する抵抗を与えることであり、その存在は導入された配列を首尾よく発現する細胞の成長及び回収を可能にする。安定な形質変換細胞の耐性クローンは、細胞タイプに適する技術を用いて増殖させることができる。

【0033】

組換ベクターの導入後、宿主細胞は選択的媒体（それはベクター含有細胞の成長のために選択する）中で成長する。多くの選択システムを、形質変換細胞系を回収するために用いることができる。これらは、限定されないが、単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ(Wigler, M.ら、(1977) Cell 11:223-232)及びそれぞれtk.sup.又はaprt. sup. -cellsで使用することができるアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowy, I.ら、(1980) Cell 22:817-823)遺伝子を含む。また、代謝拮抗物質、抗生物質又は除草剤抵抗性が、選択のベースとして用いることができる。例えば、メトトレキサートに対する耐性を与えるdhfr(Wigler, M.ら、(1980) Proc. Natl. Acad. Sci. 77:3567-3570);アミノグリコシドネオマイシン及びG-418に対する耐性を与えるnpt(Colbere-Garapin, F.ら、(1981) J. Mol. Biol. 150:1-14)及び、それぞれ、クロロスルフロン(chlorsulfuron)及びホスフィノトリシン(phosphinotricin)アセチルトランスフェラーゼに耐性を与えるals又はpat(Murry, supra)である。さらなる選択可能な遺伝子、例えば、trpB（それは細胞にトリプトファンの代わりにインドールの利用を可能にする）又はhisD（それは細胞にヒスチジンの代わりにヒスチノールの利用を可能にする）が記載されている(Hartman, S. C.及びMulligan, R. C. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:8047-8051)。最近、可視マーカーの使用が、形質変換体の同定のみならず、特定のベクターシステムに起因することができる過渡的又は安定的なタンパク質発現を定量化するために広く用いられている、アントシアニン、 α -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マーカーで、支持率を獲得している(Rhodes, CA.ら、(1995) Methods Mol. Biol. 55:121-131)。

【0034】

組換ポリペプチドの精製は、この目的のために知られているいずれかの方法、つまり、抽出、析出、クロマトグラフィ、電気泳動等を含む従来のいずれかの方法によって行われる。使用することができるさらなる精製方法は、モノクローナル抗体又はターゲットポリペプチドに結合し、カラム内に含まれるゲルマトリックスに導入され、固定化される他の分子を用いた親和性クロマトグラフィである。組換ポリペプチドを含有する不純な試料がカラムを通されるか、マトリックスが、目標ポリペプチドを結合するためにバッチ技術で使

10

20

30

40

50

用される。ポリペプチドはマトリックスに結合し、不純物は結合しないであろう。洗浄後、ポリペプチドは、pH又はイオン強度の変化によって、マトリックスから抽出される。

【0035】

従って、本発明は、本発明のポリペプチド二量体を生産する方法に関し、それは、ポリペプチドをコードするDNA配列で形質変換された宿主細胞を培養し、宿主細胞又は培養媒体からポリペプチドを回収することを含む。

【0036】

本発明のポリペプチド二量体は、すべての病変の治療及び/又は予防に有用であり、作動性IL-6/sIL-6R複合体の活性が疾患の病変に関与し、阻害するに違いない。例えば、本発明のポリペプチド二量体の治療用途は、以下を含む。

a) IL-6は、腫瘍形成を促進するためにオートクライン又はパラクリン方式のいずれかで作用することによって、多発性骨髄腫に直接関係しているようである。また、高いIL-6レベルが、好ましくない二次作用(例えば、骨吸収、高カルシウム血症及び悪液質)を招く。これらの場合、sIL-6RがIL-6に対して標的細胞を敏感にすることが知られている。従って、ここで記載されている本発明のポリペプチド二量体は、二次作用及び腫瘍成長の阻害の双方に対して有益であろう。

b) 自己免疫疾患：自己免疫不全におけるIL-6の病態重要性が、文献において多くの著者によって検討されており(例えば、Yoshizakiら、(1992) *Semin. Immunol.* 4(3):155-166参照)、よって、IL-6シグナル形質導入に対する干渉が、自己免疫疾患の治療に役立つかもしれない(Nishimotoら、(1999) *Intern. Med.* 38(2):178-182)。そのような病態の例は、全身エリテマトーデス、橋本病、硬皮症、慢性関節リウマチ、多発性硬化症、自己免疫上皮炎、真性糖尿病、シェーグレン症候群、多発性筋炎、糸球体腎炎及び他の炎症性疾患(例えば、乾癬、クローン病、潰瘍性大腸炎及びブドウ膜炎)である。さらに、大腸がんのような特定の炎症関連のガン疾患が挙げられる。

c) 骨粗鬆症において、それは閉経後の女性のエストロゲン濃度の低下によって又は卵巣切除術によって悪化するかもしれない、IL-6は、破骨細胞形成の重要なメディエータであるようであり、骨吸収をもたらす。重要なことに、IL-6は、エストロゲン減少状態で主な役割を果たすようであり、明らかに通常の骨メンテナンスに最小限に関与しているだけである。これと一致して、実験的な証拠は、IL-6に対する機能阻害抗体が破骨細胞の数を減少させることができることを示す。エストロゲン補充療法が行われる一方、子宮内膜及び胸ガンのリスクを増加させるかもしれない副作用をもたらすようである。このように、本発明のポリペプチド二量体は、より特異的に、破骨細胞形成を正常レベルに低減させるであろう。

d) おそらく、脂肪組織でリポ蛋白リパーゼ活性を減少させることによって、IL-6は、エイズ及びガンに伴う悪液質に至る腫瘍壊死因子(TNF)のメディエータとなるかもしれない。従って、ここに記載される本発明のポリペプチド二量体は、そのような患者で悪液質を軽減又は減少させることに役立つ。

e) 細菌性及びウイルス性感染症：ヒトヘルペスウイルス(HHV8)の存在は、91%以上のカポジ肉腫(KS)障害で証明されている。さらに、そのウイルスは、一次性流出リンパ腫(PEL)及び多中心性カースルマン疾患(MCD)患者で同定された。おもしろいことに、多発性骨髄腫(MM)患者からの骨髄樹枝細胞は、HHV8によって侵されることが示された。それ以来、HHV8のMMとの関連が、激しい議論の対象となっており、それは最近復活した。HHV8のゲノムは、ヒト抗アポトーシスタンパク質、ケモキネシス及び人IL-6に25%相同性を有するウイルスIL-6(vIL-6)の生存形態を含むサイトカインに顕著に相同するいくつかのタンパク質をコードする。vIL-6は、ヒトIL-6を暗示する生物学活性、つまり、ネズミハイブリドーマ及びヒト骨髄腫細胞の激増の刺激を有することが証明されている。最近、vIL-6誘発血管形成及び血液生成であるvIL-6-トランスフェクトNIH3T3細胞を注射されたマウスで示された。これらの機能によって、vIL-6がHHV8関連障害の病態で重要な役割を果たすと結論された。vIL-6シグナリングへのIL-6Rの寄与は、論争的に議論され

10

20

30

40

50

ている。v I L - 6 トランスフェクト C O S - 7 細胞の生成されていない上澄を用いた 1 つのグループが、S T A T 活性が I L - 6 R でなく、g p 1 3 0 を発現する細胞で誘導されたことが示された。対照的に、もう一つのグループは、v I L - 6 活性が、I L - 6 R アンタゴニストによって減少されたことを見出し、v I L - 6 シグナリングにおける I L - 6 R の関係が議論されている。

【 0 0 3 7 】

このように、本発明は、本発明のポリペプチド二量体またはポリヌクレオチドの有効な量を含む医薬組成物に関し、好ましくは、薬学的に許容できるキャリアと組み合わせられる。「薬学的に許容できる」とは、活性成分の生物学的活性の効果に干渉せず、それが投与されるホストに毒性を示さないいずれかのキャリアを含むことを意味する。適当な薬学的キャリアの例は、当該分野でよく知られており、リン酸緩衝サリン溶液、水、例えば、油 / 水エマルジョン等のエマルジョン類、種々の湿潤剤、滅菌溶液等を含む。そのようなキャリアは、従来の方法によって製剤化され、有効量で患者に投与することができる。

10

【 0 0 3 8 】

「有効量」とは、病気の過程及び重篤性に影響を及ぼすのに十分である活性成分の量を指し、そのような病態の低減又は緩和をもたらす。

【 0 0 3 9 】

これらの病気又は障害の治療及び / 又は予防に有用な「有効量」は、当業者に公知の方法を用いて決定することができる（例えば、Finlら、(1975) The Pharmacological Basis of Therapeutics, Goodman and Gilman, eds. Macmillan Publishing Co., New York, p p. 1-46参照）。

20

【 0 0 4 0 】

適当な組成物の投与は、例えば、静脈、腹腔内、皮下、筋肉内、局所（例えば、浣腸、吸入、膏薬、液滴）又は経皮投与等の種々の方法によって作用させることができる。投与ルートは、もちろん、治療の種類、医薬組成物に含まれる化合物の種類に依存する。投与計画は、主治医及び他の臨床要因で決定される。医術において知られているように、いずれかの患者の用量は、患者の大きさ、体表面積、体重、年齢、性別、投与される特定の化合物、時間及び投与経路、治療の種類、健康状態、同時に投与される他の薬物に依存する。

【 0 0 4 1 】

上述した本発明のポリペプチド二量体及びポリヌクレオチドの好ましい医療用途は、骨吸収、高カルシウム血症、悪液質、腫瘍、ガン、自己免疫病気、炎症性病気（例えば、クローン病）、潰瘍性大腸炎、慢性関節リウマチ、若年性慢性関節リウマチ、喘息、乾癬、紅斑性狼瘡、多発性硬化症、ブドウ膜炎等、細菌性又はウイルス性感染症の治療である。

30

【 0 0 4 2 】

最後に、本発明はまた、本発明のポリペプチド二量体に結合する抗体に関する。好ましくは、そのような抗体はスペーサ領域、リンカー領域及び / 又は D 3 / スペーサ接合領域に結合する。そのような抗体は、本発明のポリペプチドに結合する抗体の検出に基づく診断方法において有用である。

【 0 0 4 3 】

以下の実施例は、本発明をより詳細に説明する。

40

実施例 1 : s g p 1 3 0 変異体 s p g 1 3 0 (D 1 - D 3) S n - F c の製造

(A) 材料

s g p 1 3 0 F c (全長) の配列が最適化されたコドンを作成し、G e n e A R T (R e g e n s b u r g , G e r m a n y) によって構築された p C R - S c r i p t - A M P として提供した。ゲータウエイクロニングシステムコンポーネント (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-pDONR221、C M V プロモータ制御発現ベクター-pcDNA-DEST40、挿入転写用 B P 及び L R リコンビナーゼ及びコンピテント E . c o l i 細胞) を I n v i t r o g e n (K a r l s r u h e , G e r m a n y) から購入した。QuikChange II 部位特異的突然変異誘発キットを Stratagene (A m s t e r d a m , T h e N e t h e r l a n d s) から得た。HYPUR 精製突然変異誘発プライマーを MWGBiotech (E b

50

ersberg, Germany) から得た。CHO - K1 細胞を German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (Braunschweig, Germany) から得た。培養媒体成分を以下から購入した。ハムの F12 媒体及び PBS (PAA Laboratories; Colbe, Germany)、FBS (Biochrom; Berlin, Germany)、トリプシン / EDTA 溶液 (Invitrogen) 及び G418 溶液 (Sigma-Aldrich; Taufkirchen, Germany)。トランスフェクション試薬リポフェクタミン 2000 を Invitrogen から得た。Santa Cruz (Heidelberg, Germany) 供給タンパク質 A / G プラスアガロース (免疫沈降用)。免疫沈降及びウェスタンブロットの一次検出の双方のために、マウス抗ヒト IgG (Fc) モノクローナル抗体を用いた (CBL102; Chemicon; Hofheim, Germany)。ウェスタンブロット二次検出を抗マウス IgG HRP 結合抗体で行い、ECL - プラスウェスタンブロット基質及びハイパーフィルム ECL を、全て GE Healthcare (Freiburg, Germany) から入手した。ローラーボトル (2.1 L、2, 5X 表面) を Greiner Bio-One (Frickenhausen, Germany) から購入した。

10

【0044】

(B) sgp130 (D1 - D3) S_n - Fc の構築

全長 sgp130Fc を、標準ゲータウェイ法で、ゲータウェイプライマー、AccuPrime Pfx DNA ポリメラーゼ及び BP リコンビナーゼを用いて、pDONR221 にサブクローン化した。サブクローン化されたインサートを、250 ~ 300 bp おきに積層正逆シーケンシングプライマーを用いて完全に配列検証した。QuikChange II キットによる部位特異的突然変異誘発において、sgp130Fc のドメイン D4 - D6 を、ドメイン D3 (YED) の末端及び sgp130Fc の Fc 部位 (SCD) の最初に架橋したプライマー対を用いて、理想的なスペーサ要素 (S1、S2、S3 及び S5) によって置換し、アミノ酸スペーサ配列「グリシン - グリシン - グリシン - グリシン - セリン」(GGGS) の種々の反復をコードした。変異体 sgp130 (D1 - D3) Fc を、スペーサなしとした (説明目的のために: 変異体「sgp130 (D1 - D3) S₀ - Fc」と示される場合、これは、スペーサペプチドを含まない分子を意味し、従って sgp130 (D1 - D3) Fc と同一である)。陽性クローンを、AlwNI で制限消化によって同定し、上述した完全なシーケンシングによって検証した。その後、インサートを、ゲートウェイ LR 組換によって発現ベクター pcDNA - DEST40 へ転写した。インサートが、Fc 部位の後、2つの停止コドンにコードしたため、pcDNA - DEST40 (V5 及び 6xHis エピトープ) のタグは、タンパク質 sgp130 (D1 - D3) S_n - Fc に存在しない。また、陽性クローンを、AlwNI 制限消化によって同定した。ゲートウェイ組換法は非常に特異的で、DNA 増幅を必要としないため、配列確認は必要でなかった。ゲートウェイ組換を用いたインサートの正しい転写が、我々の研究所の別個の実験で確認されている。

20

30

【0045】

(C) 培養及びトランスフェクション

CHO - K1 細胞を、10% FBS 捕捉ハム F12 培地にて、37℃、水飽和雰囲気下、5% 二酸化炭素で成長させた。維持培養を、3 ~ 4 日ごとに分割し、最高 20 継代のみを用いた。細胞を、リポフェクタミン 2000 及びインビトロゲンによって供給された CHO - K1 用の標準条件を用いて発現構成 pcDNA - DEST40 - sgp130 (D1 - D3) S_n - Fc でトランスフェクションした。最初の一時的な発現テストのために、CHO - K1 を、6 ウェルプレートでトランスフェクトし、細胞及び上澄を、トランスフェクションの 24 時間後に収穫した。sgp130 (D1 - D3) S_n - Fc を、メーカーの指示に従って、プロテイン A / G プラスアガロース及び抗ヒト IgG (Fc) 抗体を用いて上澄から免疫沈降した。全細胞タンパク質を抽出し、抗ヒト IgG (Fc) 抗体を用いたウェスタンブロットを、Waetzigら、J. Immunol. 168: 5342 (2002) で記載されたように、細胞溶解物及び免疫沈降を用いて行った。

40

【0046】

(D) CHO 細胞中での sgp130 (D1 - D3) S_n - Fc の発現

成功した一時的な発現後、CHO - K1 細胞を、10 cm のプレートで 400 µg / ml

50

1 F 4 1 8 を用いてトランスフェクトし、選択した。製品品質及び特性についての一次影響のために、予め選ばれた多クローン性 CHO - K 1 プールを、ローラーボトルへ移した。融合性細胞の上澄を、1 週間につき 3 回収穫し、細胞デブリスを除去するために 15 分間 4, 0 0 0 r p m、4 にて 2 回遠心分離し、すぐに処理するか、- 8 0 で凍結した。平行に、安定した細胞クローンを、限られた希釈法を用いて、予め選ばれたプールから選択し、上述したように、ウエスタンブロット発現分析によって特徴づけした。最も高い及び最も安定した発現のクローンを、ローラーボトルに移し、さらなる生成のために使用した。

【 0 0 4 7 】

(E) 結果

図 2 に示したように、s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S_n - F c (具体例として、s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S₁ - F c を示した) は、親の s g p 1 3 0 F c タンパク質のために得られるそれらよりさらに良好な生成率で発現した。これは、s g p 1 3 0 F c のより小さな変異体の発現能が強化されたようであり、タンパク質の製造に利点を与えることを示す。

最後に、より高生成率は、工業生産のための経費をかなり低減する。

【 0 0 4 8 】

実施例 2 ; s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S_n - F c の精製

(A) 材料

真空ろ過ユニット用酢酸セルロースフィルター (0 . 45 μ m) を Sartorius (Gottinge n , Germany) から購入した。P B S を P A A ラボラトリー (Colbe , Germany) から得た。親和性及びサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) を、全て GE Healthcare (Freiburg , Germany) から得た。X K 1 6 / 2 0 カラム中の MabSelect 材料 (プロダクトコード 17-5199-0 1)、P D - 1 0 脱塩カラム及び S E C 用 HiLoad 2 6 / 6 0 Superdex 200 pg. Amicon Ultra-15 50 kD Ultracel-PL 膜濃縮ユニットを Millipore (Eschborn , Germany) 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 %) が、Bio-Rad (Munich , Germany) によって供給された。

【 0 0 4 9 】

(B) 親和性クロマトグラフィー

s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S_n - F c 変異体の生成を、具体例として、s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S₁ - F c で示す。ローラーボトル培養からの s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S₁ - F c 含有上澄を、4 にて、P - I 蠕動ポンプ及び AKTA Purifier 100 システム (双方 GE Healthcare から入手、Freiburg , Germany) を用いて精製した。プロトコールは、モノクローナル抗体の精製用にメーカー推奨方法に基づいた。遠心後、新鮮又は解凍 (氷上で) した上澄の pH を 6 . 7 ~ 7 . 0 に調整した。真空ろ過 (0 . 45 μ m) を 2 回繰り返した後、上澄を、脱気し、必要により、再度 6 . 7 ~ 7 . 0 に pH 値を再調整した。その後、P B S 平衡親和性クロマトグラフィーカラム (X K 1 6 / 2 0 カラム中、6 ~ 2 5 m l MabSelect) に 2 ~ 4 リットルの上澄を、P - I ポンプを用いて 3 ~ 1 0 m l / 分の流速で充填した。P B S で洗浄した後、カラムを、A K T A 精製器に移し、A₂₈₀ が、未結合タンパク質の量的除去後安定するまで、P B S で再洗浄した。溶出のために、A K T A システムに、それぞれ、p H 3 . 2 5 及び 5 . 5 で 2 つの 5 0 m M のクエン酸ナトリウムバッファを装備し、それを、望ましい pH 条件を与えるために混合した。p H 5 . 1 での 1 つの洗浄工程の後、p H 3 . 7 での溶出を続けた。1 0 m l のフラクションを 2 m l の 1 M の トリス - H C l (p H 1 1) を含有する 1 5 m l の試験管に採取した。ピークフラクションをプールし、p H を測定し、必要に応じて、7 . 5 に調整した。プールのタンパク質濃度を A₂₈₀ で測定し、プールを、Amicon Ultra-15 50kD ユニットを使って、最高 1 . 5 m g / m l に慎重に濃縮した。P B S 平衡 P D - 1 0 脱塩カラムを、バッファを P B S に変えるために用い、次いで、2 8 0 n m でもう一つのタンパク質濃度を測定した。

【 0 0 5 0 】

(C) ゲルろ過によるサイズ除外クロマトグラフィー (S E C)

SECのために、PBS中1.2 mg/mlの最高濃度が推奨された。SECを、PBS平衡HiLoad 26/60 Superdex 200 pgカラム中で、流速0.8 ml/minにて、AKAシステムで行った。sgp130 (D1-D3) S₁-Fcを、高分子量の凝集の低プラトー後に、単一ピークで溶出した(図4A)。最初の動作で、全てのフラクションのサンプルを、PAGE分析のために得た(以下参照)。ピークフラクションをプールし、それらのタンパク質濃度を測定し、PBS中400~500 µg/mlにセットし、単一使用のアリコートをして長期保存のために-80℃で凍結した。

【0051】

(D) ポリペプチドアクリルアミド電気泳動(PAGE)

フラクション及びプールサンプルを、本来のPAGE(7.5%ポリペプチドアクリルアミドゲル)によって分析し、銀又はクマシー染色した(図4A)。

10

【0052】

(E) 結果

図4A及び4Bで示したように、望まれていない二次生成物の量は、もう一つの実験(結果を図3に示す)で平行に精製した親化合物sgp130Fcと比較して、かなり減少した。さらに、主要生成物(図4A中のレーン8~14)の溶出は、不純物フラクション(図4A中のレーン1~6)と、明確に分離できる。sgp130Fcは、非常に多量の不純物を生成する傾向がある(図3中の最初のクロマトグラムピークとPAGE参照)。さらに、主要生成物(図3中のレーン6~11)を含む溶出フラクションのいずれも、不純物を含む。これらの結果は、親sgp130Fc分子と比較して、sgp130 (D1-D3) S_n-Fcの明確な改善を示す。しかし、スペーサ長は、sgp130 (D1-D3) S_n-Fc分子の精製能に対して決定的である。結合能、よって、治療効果は、スペーサ長を増やすことにより改善される。n=3で、「最適精製能のウィンドウ」が最適条件である(図4B)。従って、最適活性又は最適純度ならびに収率の必要によって、理想的なスペーサ長は、3及び5要素の間にある。

20

【0053】

実施例3: sgp130Fc及びsgp130 (D1-D3) S_n-FcのIL-6/sIL-6R複合体結合タンパク質の比較

(A) 材料

96ウェルのマイクロロン・マイクロタイター・プレート(Greiner Bio-One (Frickenhäuser, Germany)から購入した、組換ヒトIL-6及び可溶性IL-6レセプター(sIL-6R)を、BioSource (Solingen, Germany)及びR&D Systems (Wiesbaden, Germany)から、それぞれ得た。一次抗sIL-6R抗体(クローンM91、マウスIgG1)をBeckman Coulter (Krefeld, Germany)から得た。二次抗マウスIgGHRP結合抗体をから得、ウエスタンロット実験(実施例1のA~C参照)と同じものであった。すぐに使用ができるテトラメチルベンジジン(TMB)HRP基質をSigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany)から購入した。

30

【0054】

(B) 酵素結合免疫吸着分析(ELISA)

sgp130Fc変異体の異なるロット間の品質管理及び比較のために、標準ELISAを設計した。被覆以外の全工程を、室温で行い、全洗浄工程を250 µlの量で3回行い、全ての条件を3重に測定した。96ウェルマイクロタイター・プレートを、100 µm PBS中、内部標準として、本来のsgp130Fcの100 ng/ウェル及びsgp130 (D1-D3) S_n-Fcの等モル量で、4℃にて一晩被覆した。よって、sgp130Fc及びその変異体は、捕捉試薬として機能し、一方、結合sIL-6Rを検出した(以下参照)。0.05%のTween-20/PBSで洗浄した後、ウェルを2時間、200 µl/ウェルの3%BSA/PBSでブロックした。次いで、ブロッキング溶液を除去し、ウェルを1時間、3%BSA/PBS中、組換ヒトIL-6(3.2 µg/ml~50 ng/ml)及びsIL-6R(1.6 µg/ml~25 ng/ml)の1:2希釈系(100 µl/ウェル)でインキュベートした。0.05% Tween-20/PBS

40

50

Sで洗浄した後、ウェルを、1時間、3% BSA / PBS (100 μ l / ウェル)中、一次抗 s I L - 6 R 抗体とともにインキュベートした。0.05% Tween - 20 / PBS で3回洗浄した他の系を、二次抗マウス I g G H R P 結合抗体 (1 : 5000 (100 μ l / ウェル))とともに1時間インキュベートした。0.05% Tween - 20 / PBS 、続いて d H 2 O で洗浄した後、プレートを、約5分間 (発現した青色の強度によって) 、100 μ l / ウェル T M B 基質とともにインキュベートした。基質反応を、0.5 M 硫酸を100 μ l / ウェルでウェルに添加することによって停止させた。最後に A 4 5 0 を、マイクロプレートリーダーで測定した。

【0055】

(C) 結果

結合分析の結果を図5に示す。s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S_n - F c の結合能は、主に、各変異体で用いられるスペーサの反復数に依存していた。この場合、2回及び3回の反復 (S 2 及び S 3) を含む変異体は、s g p 1 3 0 F c と同等か、より良好であった。

これは、親 s g p 1 3 0 F c 分子の修飾がその精製を改善し、その生物学的活性及び I L - 6 がトリガーとなる疾患の治療用の医薬としての推定される使用に影響しなかったことを示す。

【図面の簡単な説明】

【0056】

【図1】s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S_n分子を示す概略図である。s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S_n変異体は、親分子s g p 1 3 0 F c のドメインD4からD6の欠損及び種々の長さ (S_n) のポリペプチドスペーサによるそれらの置換によって発生する。「n」はスペーサド領域内での反復数を示す。その後、分子は、I g G F c 断片 (上部パネル) によって共有結合的に二量体化するか、あるいは、例えば、ジスルフィド架橋、化学的相互作用又はその他の形成によって共有結合をもたらず天然に存在する又は人工的なリンカー要素へのさらなる融合 (下部パネル) によって共有結合的に二量体化する (s g p 1 3 0 (D 1 - D 3)) S_n - L) 。さらに、これらの分子は、精製及び / 又は検出目的のためにシーケンスタグを含むことができる。

【図2】CHO細胞でのs g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S₁の発現。s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S_nの発現を、s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S₁ - F c に対して例示的に示す。各構成体 (p D E S T 4 0 _ _ s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S₁ - F c) を、CHO細胞に、一時的にトランスフェクションした。平行して、もうセットのCHO細胞を、親のs g p 1 3 0 F c からなる構成体でトランスフェクションした。細胞を24時間インキュベートし、上澄を回収し、s g p 1 3 0 融合タンパク質を免疫沈降した。沈殿物は、最終的にS D S - P A G E によって分析し、標準的なウェスタンブロット法に従って、抗ヒトI g G 抗体を用いて検出した。

【図3】s g p 1 3 0 F c 融合分子の精製 s g p 1 3 0 F c のサイズ排除クロマトグラフィー (S E C) 。上部パネルはUVスキャンによるゲル濾過の間に誘発される溶出プロフィール (クロマトグラム) を示す。中央及び下部パネルは、天然ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (P A G E) 及び標準的な方法によるクマシー (C O O M) 又は銀のいずれかでの染色によって回収したフラクションの分析を表す。

【図4】s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S_n - F c 融合分子の精製 (A) サイズ排除クロマトグラフィー (S E C) によるs g p 1 3 0 (D 1 - D 3) の精製を、s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S₁ - F c に対して例示的に示す。上部のパネルは、UVスキャンによるゲル濾過の間に誘発される溶出プロフィール (クロマトグラム) を示す。中央及び下部パネルは、天然ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (P A G E) 及び標準的な方法によるクマシー (C O O M) 又は銀のいずれかでの染色によって回収したフラクションの分析を表す。 (B) (G G G G S)_n スペーサによる変異体のS E C 溶出クロマトグラムの比較は、生物学的活性の連続増加と相関しないn = 3 のスペーサ長の最適精製特性を示す (下図及び図5 参照) 。

【図5】s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S_n - F c 分子によるI L - 6 / s I L - 6 R の特異

10

20

30

40

50

結合精製された s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S_n - F c 分子 (n = 0 から 3) を、9 6 穴プレート上に被覆され、インキュベートして、組換え体 I L - 6 + 可溶 I L - 6 レセプター (s I L - 6 R) の量を増加した。結合した I L - 6 / s I L - 6 複合体を、マウス抗 I L - 6 R 抗体及び抗マウス I g G 抗体に結合したホースラディッシュペルオキシダーゼを利用して検出した (白四角、黒丸、黒四角、黒三角) 。平行して、親 s g p 1 3 0 F c 分子をテストした (黒ひし形) 。

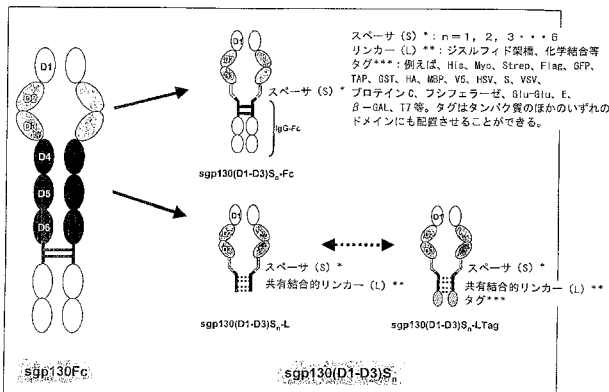
【 図 6 】 s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S_n - F c 結合抗体を検出するための分析の概略図。

(A) 固体マトリックスに固定された s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S_n - F c を、予め標識された (例えば、蛍光染料で) 抗体混合物 (例えば、血清サンプルに含まれる) とともにインキュベートした。未結合抗体を洗い流し、特異結合分子を、最高水準の技術で検出した。 (B) 固体マトリックスに固定された s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S_n - F c を、抗体混合物 (例えば、血清サンプルに含まれる) とともにインキュベートした。未結合抗体を洗い流し、残存 s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S_n - F c / 抗体複合体を、所定量で標識された (例えば、蛍光染料で) s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) S_n - F c とともにインキュベートし、最高水準の技術で最終的に検出した。

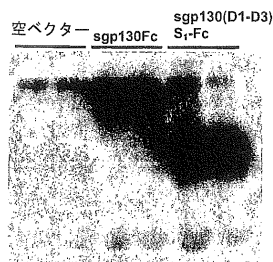
【 図 7 】 最適化 s g p 1 3 0 (D 1 - D 3) の c D N A 配列 配列は、s g p 1 3 0 のドメイン D 1 から D 3 とともにシグナリングペプチドを含む。その配列は、哺乳類の細胞でコードされたポリペプチドの発現に対して最適化したコドンであった。

【 図 8 】 可溶 g p 1 3 0 (D 1 - D 3) のアミノ酸配列 所定の分子フラグメントに、以下のように下線を付した。シグナリングポリペプチド (二重線) 、 I g 様 C 2 タイプドメイン (D 1) (点線) 、フィブロネクチンタイプ III ドメイン (D 2) (一重線) 、フィブロネクチンタイプ III ドメイン (D 3) (細点線) 。

【 図 1 】

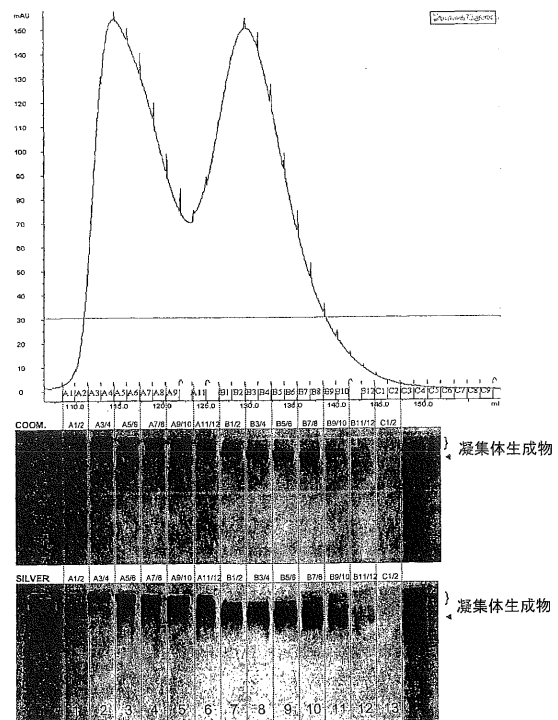


【 図 2 】



【 図 3 】

s g p 1 3 0 F c (親分子)
 構築物 : pcDNA-DEST40_sgp130Fc、CHO-K1 中で安定
 M A b 選択 - A C におけるサンプル前精製、ゲルろ過 : Superdes-GF SDS PAGE、染色 : クマシー / インベリアル染色 (COOM) 及び銀

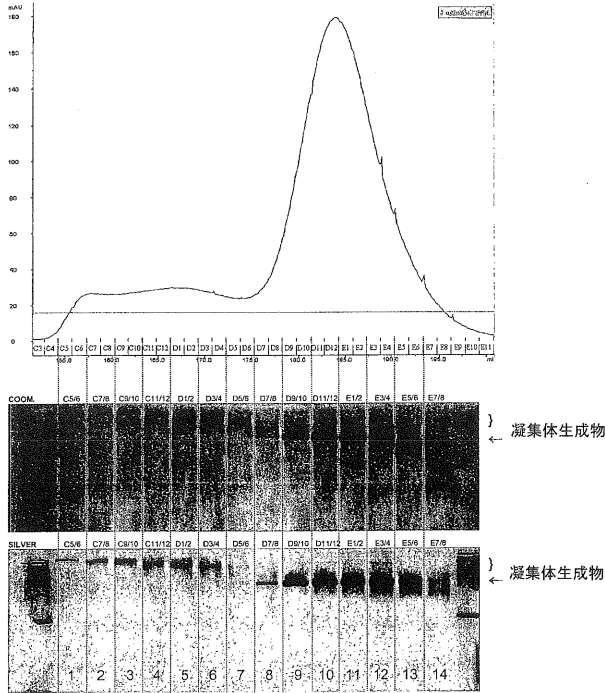


10

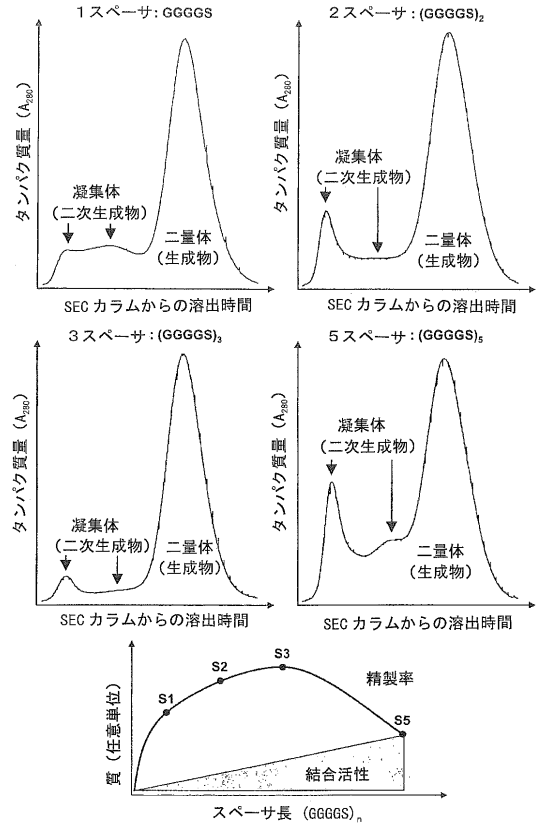
20

【 図 4 A 】

s p g 1 3 0 (D 1 - D 3) S₁-F_c
構築物 : pcDNA-DEST40_spg130(D1-D3)S₁-Fc、CHO-K1 中で安定
M A b 選択-A C におけるサンプル前精製、ゲルろ過 : Superdes-GF SDS
PAGE、染色 : クマシー/インベリアル染色 (COOM) 及び銀

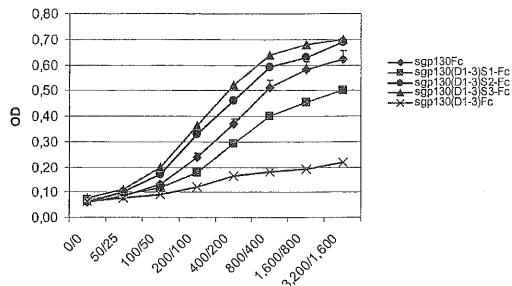


【 図 4 B 】

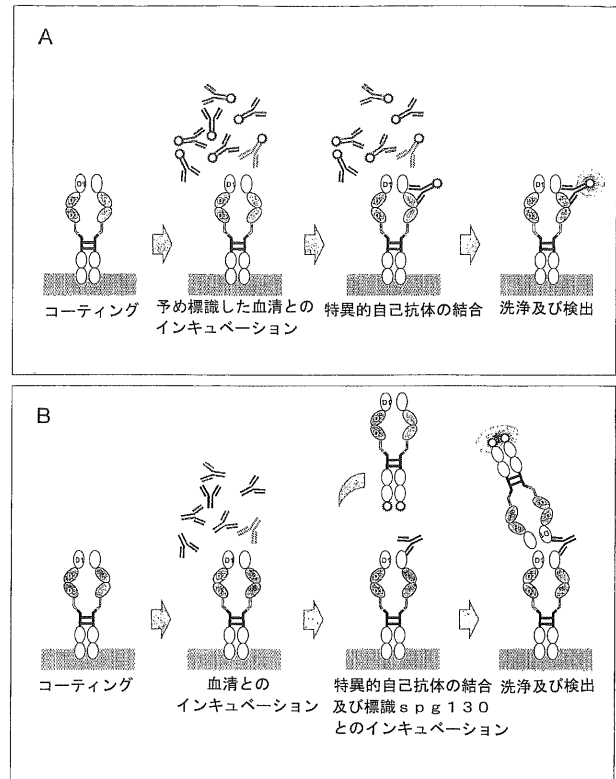


【 図 5 】

ELISA: spg130(D1-D3)S_n-Fc vs spg130Fc



【 図 6 】



【 図 7 】

```

1   ATGCTGACACTGCAGACATGGCTGGTGCAGGCCCTGTTTATCTTTCTGAC
51  CACCGAGTCTACAGGAGAGCTGTGGATCCTTGGCGGTATATCTCCCTG
101 AGTCTCCCTGGTGCAGCTGCATTCTAACTTACCAGCGGTGTGTGCTG
151 AAGGAAAAGTGCATGGACTACTTCCACGTGAACGCCAACTACATCGTGTG
201 GAAAACCAACCCTTACCATCCCAAGGAGCAGTACACCATCATCAACC
251 GGACCGCTTCTTCTGTGACCTTACCAGATATCGCCTCCCTGAATATCCAG
301 CTGACCTGCAACATCCTGACCTTTGGACAGCTGGAGCAGAATGTGTACGG
351 CATCACCATCATCTCTGGCCTGCCTCCAGAGAAGCCTAAGAACCCTGCTCT
401 GCATCGTGAATGAGGGCAAGAAGATGAGGTGTAGTGGGATGGCGGCAGA
451 GAGACACATCTGGAGACCAACTTACCCTGAAGTCTGAGTGGGCCACCCA
501 CAAGTTTGGCGACTGCAAGGCCAAGAGAGATACCCTTACCTCTTGCACCG
551 TGGACTACTCCACCGTGTACTTCTGTAACATCGAGGTGTGGGTGGAGGCT
601 GAGAATGCTCTGGGCAAGGTGACCTCTGACCACATCAACTTCGACCCCGT
651 GTACAAGGTGAAGCCTAACCTCCTCACAACCTGTCCGTGATCAACTCTG
701 AGGAGCTGTCCTTATCCTGAAGCTGACCTGGACCAACCCTTCCATCAAG
751 TCCGTGATCATCCTGAAGTACAACATCCAGTACAGGACCAAGGATGCTTC
801 TACCTGGTCTCAGATCCTCCTGAGGATACCGCTTCCACCAGATCCAGCT
851 TCACAGTGCAGGACCTGAAGCCTTTTACCAGTACGTGTTACAGGATCCGG
901 TGCATGAAGGAGGATGGCAAGGCTATTTGGTCTGACTGGTCTGAGGAGGC
951 TTCTGGCATCACCTACGAGGAC (972 bp)

```

【 図 8 】

```

1   MLTLQTNLVQALPFLTTESTGELLDPGCIISPESPVVQLHSNFTAVCVL
51  KEKCMDYFHVNANYIVKTNHFTIPKBQYTIINRTASSVTFTDIASLNIQ
101 LTCNLLTFGQLEQNVYGITIISGLPEKPKNLSCIVNEGKMRCEWDGGR
151 ETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKRDTPTSCTVDYSTVYFVNIEVWVEA
201 ENALGKVTSDHINFDPVYKVPNPPHNLSVINSEELSSILKLTWTPSIX
251 SVIILKYNIOYRTKDASTNSQIPPPEDTASTRSSEFTVQDLKPFTEYVFRIR
301 CMKEDGKGVNSDWSSEASGITVED (324 aa)

```

【 配列表 】

200952048000001.xml

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/EP2006/012515
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/715 C07K16/28 A61K38/17 ADD. C12N5/10 C12N1/15 C12N1/21		
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 A61K C12N 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, WPI Data, Sequence Search, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 491 554 A (CONARIS RESEARCH INSTITUTE AG) 29 December 2004 (2004-12-29) paragraph [0011] - paragraph [0013] paragraph [0015]	1-26
X	EP 1 148 065 A (ROSE-JOHN, STEFAN) 24 October 2001 (2001-10-24) abstract; claims 1-14; figure 1	1,2
A	WO 94/12520 A (ENZON, INC) 9 June 1994 (1994-06-09) abstract	6-11
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
26 April 2007		04/05/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Kools, Patrick

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2006/012515

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CHOW DAR-CHONE ET AL: "A structural template for gp130-cytokine signaling assemblies." BIOCHIMICA ET BIOPHYSICA ACTA, vol. 1592, no. 3, 11 November 2002 (2002-11-11), pages 225-235, XP002384264 ISSN: 0006-3002 the whole document</p>	1-26
A	<p>GIESE BERND ET AL: "Dimerization of the cytokine receptors gp130 and LIFR analysed in single cells" JOURNAL OF CELL SCIENCE, vol. 118, no. 21, November 2005 (2005-11), pages 5129-5140, XP002384265 ISSN: 0021-9533 the whole document</p>	1-26
A	<p>WARD L D ET AL: "Influence of interleukin-6 (IL-6) dimerization on formation of the high affinity hexameric IL-6.receptor complex." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 16 AUG 1996, vol. 271, no. 33, 16 August 1996 (1996-08-16), pages 20138-20144, XP002384266 ISSN: 0021-9258 the whole document</p>	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2006/012515**Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 26
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 26 is interpreted as directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2006/012515

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1491554	A	WO 2004113383 A2	29-12-2004
EP 1148065	A	NONE	
WO 9412520	A	AU 5670194 A	22-06-1994
		US 5856456 A	05-01-1999

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K	14/715 (2006.01)	C 0 7 K 14/715	
C 1 2 P	21/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/02	C
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	3/14 (2006.01)	A 6 1 P 3/14	
A 6 1 P	7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P	19/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
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	31/12 (2006.01)	A 6 1 P 31/12	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P	1/04 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
A 6 1 P	19/02 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P	11/06 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P	25/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P	27/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
		A 6 1 P 43/00 1 1 1	

(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, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, 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, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

Fターム(参考) 4B064 AG20 CA19 CC24 CE10 DA01 DA13
 4B065 AA91X AA93Y AB01 AC14 BA02 CA24 CA44 CA46
 4C084 AA02 AA03 AA06 AA07 AA13 BA01 BA26 BA41 BA44 DC50
 NA05 NA12 ZA01 ZA33 ZA62 ZA66 ZA89 ZA96 ZB08 ZB11
 ZB15 ZB26 ZB33 ZB35 ZC21 ZC54
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA51 DA76 EA22 EA50
 FA74 GA22

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2009520480A5	公开(公告)日	2010-01-21
申请号	JP2008546287	申请日	2006-12-22
申请(专利权)人(译)	Konarisu研究所AG		
[标]发明人	セーゲルトディルク ヴェーツィヒゲオルクハー		
发明人	セーゲルト,ディルク ヴェーツィヒ,ゲオルク,ハー.		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/21 C12N1/19 C12N1/15 C12N5/10 C07K19/00 C07K16/28 C07K14/715 C12P21/02 A61K38/00 A61K48/00 A61P3/14 A61P7/00 A61P19/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 G01N33/53 A61P1/04 A61P19/02 A61P11/06 A61P17/06 A61P25/00 A61P27/02 A61P43/00		
CPC分类号	A61P1/04 A61P3/14 A61P7/00 A61P11/06 A61P17/06 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/08 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P35/00 A61P37/00 A61P37/06 A61P43/00 C07K14/7155		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/21 C12N1/19 C12N1/15 C12N5/00.A C07K19/00 C07K16/28 C07K14/715 C12P21/02.C A61K37/02 A61K48/00 A61P3/14 A61P7/00 A61P19/00 A61P35/00 A61P37/06 A61P29/00 A61P31/04 A61P31/12 A61P29/00.101 G01N33/53.D A61P1/04 A61P19/02 A61P11/06 A61P17/06 A61P25/00 A61P27/02 A61P43/00.111		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA63 4B024/CA05 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA13 4B024/HA01 4B064/AG20 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/CE10 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA91X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA06 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA26 4C084/BA41 4C084/BA44 4C084/DC50 4C084/NA05 4C084/NA12 4C084/ZA01 4C084/ZA33 4C084/ZA62 4C084/ZA66 4C084/ZA89 4C084/ZA96 4C084/ZB08 4C084/ZB11 4C084/ZB15 4C084/ZB26 4C084/ZB33 4C084/ZB35 4C084/ZC21 4C084/ZC54 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA51 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA22		
优先权	2005028420 2005-12-23 EP		
其他公开文献	JP5390191B2 JP2009520480A		

摘要(译)

描述了由两个相同的单体片段构成的多肽 - 二聚体，其包含糖蛋白 (gp) 130的细胞外 (可溶) 部分的结构域1至3和特定的多肽间隔物，它们彼此共价连接并且具有显著的优点。它们在宿主细胞中的产生率，它们改进的纯化以及它们与IL-6 /可溶性IL-6受体复合物结合的潜力。此外，描述了含有所述二聚体分子和各种医学用途的药物组合物。