



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 690 28 671 T3** 2006.01.12

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 413 908 B2**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **690 28 671.6**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **90 110 487.7**

(96) Europäischer Anmeldetag: **01.06.1990**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.02.1991**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **25.09.1996**

(97) Veröffentlichungstag

des geänderten Patents beim EPA: **03.08.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.01.2006**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12P 21/02** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 14/00** (2006.01)

**A61K 38/21** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**90488**                      **01.06.1989**      **IL**

**92444**                      **26.11.1989**      **IL**

(73) Patentinhaber:

**Yeda Research and Development Co., Ltd.,  
Rehovot, IL**

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &  
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**CH, DE, FR, GB, IT, LI**

(72) Erfinder:

**Novick, Daniela, Rehovot, IL; Chen, Louis, Ramat  
Aviv Tel Aviv, IL; Engelmann, Hartmut, D-8000  
Munich 70, DE; Revel, Michel, Rehovot, IL;  
Rubinstein, Menachem, Givat Shmuel, IL; Wallach,  
David, Rehovot, IL**

(54) Bezeichnung: **Lösliches extrazelluläres Fragment des menschlichen IFN-beta 2/IL-6-Rezeptors, seine Herstellung und diesen Fragment enthaltende pharmazeutische Mischung**

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

## Gebiet der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft ein lösliches, extrazelluläres Fragment von humanem Interferon- $\beta$ 2/Interleukin-6-Rezeptor (im folgenden IFN- $\beta$ 2/IL-6-R), Salze, funktionelle Derivate und aktive Fraktionen davon, mit der Maßgabe, dass das extrazelluläre Fragment nicht ein Fragment ist, das aus den Aminosäuren 20 bis 323 oder 20 bis 344 von IFN- $\beta$ 2/IL-6-Rezeptor besteht. Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Reinigung des löslichen, extrazellulären Fragments, das Klonieren des löslichen, extrazellulären Fragments und seine Herstellung durch rekombinante DNA-Techniken und Verfahren zum Herstellen von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern, die daran binden. Sie betrifft ferner pharmazeutische Zusammensetzungen, umfassend das lösliche, extrazelluläre Fragment oder Salze, funktionelle Derivate, Vorläufer und aktive Fraktionen davon.

**[0002]** Interferon- $\beta$ 2, jetzt Interleukin-6 genannt (im folgenden IFN- $\beta$ 2/IL-6) ist ein multifunktionelles Zytokin, das das Wachstum und die Differenzierung von verschiedenen Zellen und Geweben reguliert, und es scheint einer der wichtigen Mediatoren der Antwort auf virale und bakterielle Infektionen und auf Schock zu sein. Die biologischen Wirkungen, die jetzt IFN- $\beta$ 2/IL-6 zugeschrieben werden, umfassen: Stimulierung der Immunglobulinsekretion durch reife B-Lymphozyten (BSF-2-Aktivität), Wachstumsstimulierung von Plasmazytomen und Hybridomen (HGF-Aktivität), Aktivierung von T-Zellen, Stimulierung der hepatischen Synthese von akute Phase-Protein (HSF-Aktivität), Stimulation der Hämatopoese, Zelldifferenzierung (DIF-Aktivität), Hemmung des Tumorzellwachstums (AP-Aktivität) und andere IFN-ähnliche Wirkungen. Als ein typisches Zytokin wird IFN- $\beta$ 2/IL-6 von verschiedenen Zellarten sezerniert, und es wirkt in verschiedenen Kombinationen mit anderen Interleukinen und Interferonen. Unter seinen Wirkungen, denen ein Anti-Tumorpotential zugeschrieben wird, befinden sich: Hemmung des Krebszellwachstums und der Koloniebildung, Differenzierung von malignen Zellen zu normaleren Phänotypen, Stimulierung der normalen Hämatopoese, Stimulierung der T-Lymphozytenaktivierung, Stimulierung der Antikörpersekretion von B-Zellen, Stimulierung der Komplementsynthese und Stimulierung der Antiproteasesynthese.

**[0003]** Die Klonierung des humanen IFN- $\beta$ 2/IL-6-Rezeptors wurde berichtet (Yamasaki et al., Science, Band 241, Seiten 825–828). Jedoch ist der natürliche, humane IFN- $\beta$ 2/IL-6-Rezeptor und ein lösliches, extrazelluläres Fragment davon nicht isoliert und in der Literatur beschrieben worden.

**[0004]** Die japanische Patentanmeldung Nr. 62/290736 offenbart einen Rezeptor für den B-Zelldifferenzierungsfaktor, der hergestellt werden kann durch Kultivieren eines humanen Myelomzellstamms, der diesen Rezeptor exprimiert, und Solubilisieren des kultivierten Zellstamms und Abtrennen und Reinigen des Produkts mit herkömmlichen Mitteln.

**[0005]** EP-A-325474, die relevanten Stand der Technik unter Art. 54(3) EPÜ bildet, beschreibt die Expression von zwei löslichen Rezeptorproteinen unter Verwendung von Plasmiden, die die IFN- $\beta$ 2/IL-6-R-Aminosäuren 1 bis 323 bzw. 1 bis 344 codieren, in COS-Zellen.

## Zusammenfassung der Erfindung

**[0006]** Es ist nun gefunden worden, daß das lösliche Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R die stimulierende Wirkung von IFN- $\beta$ 2/IL-6 auf Mausplasmazytomzellen stark steigert und die wachstumshemmende Wirkung von humanem IFN- $\beta$ 2/IL-6 auf humane Brustkrebszellen deutlich verstärkt, und es kann somit zum Steigern der biologischen Aktivität von IFN- $\beta$ 2/IL-6 verwendet werden. Somit stellt die vorliegende Erfindung ein lösliches, extrazelluläres Fragment von humanem, natürlichem Interferon- $\beta$ 2/Interleukin-6-Rezeptor mit der folgenden N-terminalen Aminosäuresequenz:

**Leu-Ala-Pro-Arg-Arg-Cys-Pro-Ala-Gln-Glu-Val-Ala-Arg-Gly-Val-  
Leu-Thr-Ser-Leu-Pro-Gly-Asp-Ser-Val-Thr-Leu-Thr-Cys-Pro-Gly-**

(hierin als IFN- $\beta$ 2/IL-6-R bezeichnet), Salze, funktionelle Derivate und aktive Fraktionen davon mit der N-terminalen Sequenz und Mischungen von jedem der Vorgenannten bereit, wobei sie spezifisch IFN- $\beta$ 2/IL-6 binden können, das die vorteilhaften biologischen Wirkungen von IFN- $\beta$ 2/IL-6 stimulieren und verstärken kann, mit der Maßgabe, dass das extrazelluläre Fragment nicht ein Fragment ist, das aus den Aminosäuren 20 bis 323 oder 20 bis 344 von IFN- $\beta$ 2/IL-6-Rezeptor besteht.

**[0007]** Die Erfindung ist auf das humane, natürliche, lösliche, extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R in im wesentlichen gereinigter Form gerichtet, wobei es frei von proteinartigen Verunreinigungen ist, und auf ein Verfahren für dessen Isolierung.

**[0008]** Die Erfindung betrifft auch das humane, lösliche, extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R in im wesentlichen gereinigter Form, wobei es frei von proteinartigen Verunreinigungen ist und das als einzelner Peak auf Umkehrphasen-HPLC wandert, sowie ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung des Fragments aus humanen Flüssigkeiten, z.B. Urin.

**[0009]** Die Erfindung ist auch auf Verfahren zum Herstellen von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern gegen das humane, lösliche, extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R gerichtet.

**[0010]** Die Erfindung betrifft weiterhin die Herstellung des beanspruchten löslichen, extrazellulären Fragments von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R durch rekombinante DNA-Techniken, und DNA-Moleküle mit der Nukleotidsequenz, die für das lösliche, extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R codiert, mit der Maßgabe, dass die Nukleotidsequenz nicht ein IFN- $\beta$ 2/IL-6-R-Fragment codiert, das aus den Aminosäuren 1 bis 323 oder den Aminosäuren 1 bis 344 besteht. Außerdem betrifft die Erfindung Expressionsvehikel, die dieses DNA-Molekül enthalten, und damit transformierte Wirtszellen, sowie ein Verfahren zum Herstellen des löslichen, extrazellulären Fragments von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R durch Kultivieren der transformierten Zellen in einem geeigneten Kulturmedium.

**[0011]** Das humane, natürliche, lösliche, extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R und Salze, funktionelle Derivate und aktive Fraktionen davon sowie Mischungen aus den zuvor Genannten dienen der Verwendung als Wirkstoffe in Kombination mit IFN- $\beta$ 2/IL-6 in pharmazeutischen Zusammensetzungen, um die vorteilhaften Wirkungen von IFN- $\beta$ 2/IL-6 zu verstärken.

#### Kurze Beschreibung der Figuren

**[0012]** [Fig. 1](#) zeigt das Elutionsmuster der Umkehrphasen-HPLC-Säule der Fraktionen mit löslichem, extrazellulärem Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R nach partieller Reinigung auf einer immobilisierten IFN- $\beta$ 2/IL-6-Säule.

**[0013]** [Fig. 2](#) zeigt die Ergebnisse der Analyse der gereinigten Fraktion mit löslichem, extrazellulärem Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R durch SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen, gefolgt von Silberfärbung (Spuren 1 und 2) oder gefolgt von einem Elektrolotverfahren, dem Binden von  $^{125}\text{I}$ -rIFN- $\beta$ 2/IL-6 und dem Sichtbarmachen durch Autoradiographie (Spuren 3 und 4).

**[0014]** [Fig. 3](#) zeigt die Verstärkung der HGF-Aktivität von IFN- $\beta$ 2/IL-6 durch das lösliche, extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R auf humane Brustcarcinomzellen T47D.

#### Ausführliche Beschreibung der Erfindung

**[0015]** Die Rezeptoren für IFN- $\beta$ 2/IL-6 auf verschiedenen humanen Zellen werden identifiziert durch Vernetzungsexperimente mit radiomarkiertem IFN- $\beta$ 2/IL-6. Kurz ausgeführt, reines IFN- $\beta$ 2/IL-6 wird nach veröffentlichten Verfahren mit [ $^{125}\text{I}$ ] durch das Chloramin-T-Verfahren markiert, wobei es seine intakte biologische Aktivität beibehält. So markiertes IFN- $\beta$ 2/IL-6 wird mit verschiedenen humanen Zellen bei 4°C reagierengelassen, und die erhaltenen IFN- $\beta$ 2/IL-6-Rezeptorkomplexe werden covalent vernetzt und dann durch Polyacrylamid-gelelektrophorese (PAGE) in der Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat (SDS), gefolgt von Autoradiographie analysiert. Nach ihrer Identifizierung werden die Rezeptoren mit einem Verfahren isoliert, das das Solubilisieren von humanen Zellen umfaßt, die die Rezeptoren tragen, um eine Suspension zu erhalten, Zentrifugieren der Suspension, um einen Überstand zu erhalten, Auftragen des Überstands auf eine immobilisierte IFN- $\beta$ 2/IL-6- oder Anti-IFN- $\beta$ 2/IL-6- monoklonale Antikörpersäule und Eluieren des gebundenen Rezeptorproteins durch Variieren der pH-Bedingungen in einem Stadium gesteigerter Reinheit. Falls notwendig, können die eluierten Fraktionen weiter gereinigt werden.

**[0016]** Das erfindungsgemäße lösliche, extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R wurde in Humanurin aufgefunden. In seiner im wesentlichen gereinigten Form, die im wesentlichen frei von proteinartigen Verunreinigungen ist, besitzt es ein Molekulargewicht von ungefähr 50 (40 bis 60) kD, wenn es mit SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert wird, und es wandert als einzelner Peak auf einer Umkehrphasen-HPLC.

**[0017]** Es ist weiterhin charakterisiert durch die folgende Sequenz, die durch N-terminale Sequenzanalyse

des Proteins erhalten wurde:

**Leu-Ala-Pro-Arg-Arg-Cys-Pro-Ala-Gln-Glu-Val-Ala-Arg-Gly-Val-Leu-Thr-Ser-**

**Leu-Pro-Gly-Asp-Ser-Val-Thr-Leu-Thr-Cys-Pro-Gly-**

**[0018]** Die vorliegende Erfindung umfasst ein Polypeptid mit der obigen N-terminalen Sequenz, wie auch andere Polypeptide, in denen eine oder mehrere Aminosäuren in der Struktur des IFN- $\beta$ 2/IL-6-R-Fragments deletiert oder durch andere Aminosäuren ersetzt sind, oder eine oder mehrere Aminosäuren diesem angefügt sind, solange sie IFN- $\beta$ 2/IL-6 spezifisch binden, mit der Maßgabe, dass das extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R nicht ein Fragment ist, das aus den Aminosäuren 20 bis 323 oder 20 bis 344 von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R besteht.

**[0019]** Diese Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum Isolieren des löslichen, extrazellulären Fragments von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R aus humanen Flüssigkeiten, z.B. Urin, und dessen Reinigung. Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße, im wesentlichen gereinigte Rezeptorfragment hergestellt durch ein Verfahren, das umfaßt:

- a) Gewinnen der rohen Proteinfraktion aus einem dialysierten Konzentrat von menschlichem Urin von gesunden Spendern;
- b) Unterziehen der rohen Proteinfraktion aus Schritt a) einer Affinitätsreinigung auf einer Säule von immobilisiertem IFN- $\beta$ 2/IL-6;
- c) Auftragen der affinitätsgereinigten, aktiven Fraktionen von IFN- $\beta$ 2/IL-6-bindenden Proteinen aus Schritt b) auf Umkehrphasen-HPLC; und
- d) Gewinnen der Fraktionen, die bei 39% Acetonitril eluieren und das im wesentlichen gereinigte, lösliche, extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R enthalten, wobei das Protein ein Molekulargewicht von ungefähr 50 kD auf SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen aufweist und als einzelner Peak auf Umkehrphasen-HPLC wandert.

**[0020]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird die rohe Proteinfraktion aus Schritt a) zunächst einer Ionenaustauschchromatographie unterzogen, z.B. auf einer Carboxymethylsepharose<sup>®</sup> (CM-Sepharose<sup>®</sup>- oder CMS)-Säule.

**[0021]** Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Affinitätsreinigung in Schritt b) auf einer Säule von immobilisierten monoklonalen Antikörpern durchgeführt, die gegen das lösliche Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R gerichtet sind. Die Erfindung betrifft weiterhin die Herstellung von löslichem, extrazellulärem Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R durch gentechnologische Verfahren und umfaßt sämtliche, in diesen Techniken verwendete Mittel. Somit betrifft die Erfindung DNA-Moleküle mit der Nukleotidsequenz, die für das Rezeptorfragment codiert, mit der Maßgabe, dass die Nukleotidsequenz nicht ein IFN- $\beta$ 2/IL-6-Fragment codiert, das aus den Aminosäuren 1 bis 323 oder den Aminosäuren 1 bis 344 besteht. Diese DNA-Moleküle können genomische DNA, cDNA, synthetische DNA und Kombinationen davon darstellen.

**[0022]** Das Klonieren des löslichen, extrazellulären Fragments von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R kann mit verschiedenen Techniken ausgeführt werden. Die für das Fragment codierende DNA wird synthetisiert oder das dafür codierende Gen wird aus einer DNA-Bank isoliert, oder das Gen, das für den gesamten IFN- $\beta$ 2/IL-6-Rezeptor codiert, wird zunächst erhalten und dann mit bekannten Techniken gespalten. Nach einem Ansatz werden spezifische Antikörper (polyklonal oder monoklonal) gegen den IFN- $\beta$ 2/IL-6-Rezeptor hergestellt und zum Suchen nach Zellen, die den Rezeptor erzeugen, durch Immunfluoreszenz oder durch Western-Blots verwendet. Dann wird die mRNA aus diesen IFN- $\beta$ 2/IL-6-Rezeptor-produzierenden Zellen extrahiert und in cDNA umgewandelt durch Inkontaktbringen mit reverser Transkriptase für eine Zeitspanne und unter Bedingungen, die geeignet sind, um die cDNA zu bilden. Die cDNA wird dann in einem Expressionsvektor, wie Lambda gt 11, kloniert und unter Verwendung der Antikörper abgesehen. Der Lambda gt 11-Expressionsvektor kann verwendet werden zum Einfügen von DNA bis zu 7 kb Länge in eine einzige EcoRI-Stelle 53 Basen stromaufwärts von dem  $\beta$ -Galactosidase-Stoppkodon. Deshalb können fremde DNA-Sequenzen in diese Stelle eingefügt und unter geeigneten Bedingungen als Fusionsproteine exprimiert werden. Der Lambda gt 11-Expressionsvektor ist insbesondere nützlich für die Konstruktion von cDNA-Banken, die mit Antikörperproben abgesehen werden sollen (Huyhn, T. V. et al., in: David Glover (Herausgeber), DNA Cloning Techniques: A Practical Approach, IRL Press, Oxford (1984), Seiten 49 bis 78).

**[0023]** Einem anderen Ansatz folgend wird ein synthetisches Oligonukleotid oder eine Mischung von synthetischen Oligonukleotiden hergestellt, deren Sequenz sich aus der Aminosäuresequenz eines Fragments des

Proteins ableitet, z.B. der N-terminalen Aminosäuresequenz, und sie werden als Proben zum Klonieren der cDNA oder der genomischen DNA verwendet, die für das lösliche IFN- $\beta$ /IL-6-Rezeptorfragment codiert. Geeignete DNA-Präparationen, wie humane genomische DNA, werden enzymatisch durch Restriktionsenzyme gespalten oder zufällig geschert, und die Fragmente werden in geeignete rekombinante Vektoren eingefügt, um eine Genbank herzustellen. Solche Vektoren können dann mit synthetischen Oligonukleotidproben abgesehen werden, um eine Sequenz zu identifizieren, die für das lösliche IFN- $\beta$ /IL-6-Rezeptorfragment codiert.

**[0024]** Alternativ wird die mRNA aus Zellen isoliert, die den Rezeptor exprimieren, und sie wird nach der Reinigung in cDNA umgewandelt, wie oben beschrieben. Die cDNA wird in doppelsträngige cDNA durch bekannte Techniken umgewandelt, kloniert, und die erhaltenen Klone werden mit einer geeigneten Probe nach cDNA abgesucht, die für die gewünschten Sequenzen codiert. Ist der gewünschte Klon einmal isoliert, wird die cDNA im wesentlichen auf die gleiche Weise wie die genomische DNA manipuliert. Jedoch bei cDNA gibt es keine Introns oder intervenierende Sequenzen.

**[0025]** Synthetische Oligonukleotide, die als Proben für die DNA verwendet werden sollen, die für das lösliche IFN- $\beta$ /IL-6-R-Fragment codiert, werden nach bekannten Verfahren auf der Basis der Aminosäuresequenz des Fragments von IFN- $\beta$ /IL-6-R synthetisiert. Zu diesem Zweck ist es entweder möglich, die Sequenzanalyse des intakten IFN- $\beta$ /IL-6-R durchzuführen, oder seines löslichen, extrazellulären Fragments, um Peptidfragmente davon zu erhalten und ihre Aminosäuresequenz zu charakterisieren. Die Peptidfragmente werden erhalten durch Unterziehen der gereinigten Proteinpräparationen einer Fragmentierung, z.B. durch Verdau mit Proteasen, wie Trypsin, Chymotrypsin oder Papain, oder durch bekannte Verfahren (Oike, Y. et al. (1982) J. Biol. Chem. 257: 9751–9758), dann werden sie durch Umkehrphasen-HPLC aufgetrennt und durch automatisierte Aminosäuresequenzieretechniken sequenziert.

**[0026]** Sind ein oder mehrere geeignete Peptidfragmente einmal sequenziert worden oder eine partielle Sequenz des Proteins bestimmt worden, werden die DNA-Sequenzen, die sie codieren können, untersucht. Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes kann mehr als ein Codon zum Codieren einer bestimmten Aminosäure verwendet werden und ein oder mehrere verschiedene Oligonukleotide können hergestellt werden, wobei jedes in der Lage wäre, die IFN- $\beta$ /IL-6-R-Peptidfragmente zu codieren (Watson, J. D., in: Molecular-Biology of the Gene, 3. Ausgabe, W. A. Benjamin, Inc. Menlo Park, CA (1977), Seiten 356 bis 357). Jedoch besitzt nur ein Mitglied dieses Satzes die Nukleotidsequenz, die identisch ist zu der Nukleotidsequenz des Gens. Seine Anwesenheit in dem Satz und seine Fähigkeit, an DNA selbst in der Anwesenheit von anderen Mitgliedern des Satzes zu hybridisieren, ermöglicht es, den unfractionierten Satz an Oligonukleotiden auf die gleiche Weise zu verwenden, auf die man ein einzelnes Oligonukleotid verwenden würde, um das Gen zu klonieren, das das Peptid codiert. Die Verwendung eines solchen Oligonukleotids oder Satzes an Oligonukleotiden, enthaltend die theoretisch "am wahrscheinlichste" Sequenz, die das IFN- $\beta$ /IL-6-R-Genfragment codieren kann (indem den "Regeln der Codon-Usage" gefolgt wird, wie offenbart von Lathe, R., et al., (1985) J. Molec. Biol. 183: 1–12), erlaubt das Identifizieren der Sequenz eines komplementären Oligonukleotids oder eines Satzes an Oligonukleotiden, der an die "am wahrscheinlichste" Sequenz hybridisiert, die den IFN- $\beta$ /IL-6-R oder mindestens einen Teil davon codiert, oder an einen Satz solcher Sequenzen. Dieses Oligonukleotid, enthaltend eine solche komplementäre Sequenz wird dann synthetisiert und als Probe verwendet, um ein DNA-Molekül zu identifizieren und aus einer DNA-Bank zu isolieren, das für das erfindungsgemäße lösliche IFN- $\beta$ /IL-6-Fragment codiert (Maniatis, T. et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1982)).

**[0027]** Die Isolierung des Gens für den IFN- $\beta$ /IL-6-Rezeptor kann durch Koloniehybridisierungstechniken unter stringenten Bedingungen erfolgen. Verfahren zum Hybridisieren von Nukleinsäuren gehören zum allgemeinen Fachwissen und sind beispielsweise offenbart in Maniatis, T., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, siehe oben, und in Haymes, B. T., et al., Nucleic Acid Hybridization: A Practical Approach, IRL Press, Oxford, England (1985). Durch die Hybridisierung mit den obigen Nukleotid- oder Oligonukleotidsatzproben ist es möglich, in einer cDNA oder genomischen Bank die DNA-Sequenzen zu identifizieren, die zu einer solchen Hybridisierung fähig sind, und sie werden dann analysiert, um das Ausmaß zu ermitteln, in dem sie codierende Sequenzen für den IFN- $\beta$ /IL-6-R enthalten. Die DNA, die für das lösliche, extrazelluläre Rezeptorfragment gemäß der vorliegenden Erfindung codiert, wird dann aus der DNA von positiven Klonen des Gesamtrezeptors anhand bekannter Verfahren erhalten und wird in geeignet konstruierte Expressionsvektoren durch bekannte Techniken eingeführt (siehe Maniatis et al., siehe oben). Doppelsträngige cDNA wird mit Plasmidvektoren durch homopolymeres Verlängern (tailing) oder durch Restriktionsverknüpfung unter Beteiligung der Verwendung von synthetischen DNA-Linkern oder Ligierungstechniken, die mit glatten Enden arbeiten, verbunden. DNA-Ligasen werden verwendet zum Ligieren der DNA-Moleküle und unerwünschte Verknüpfung wird durch die Behandlung mit alkalischer Phosphatase vermieden.

**[0028]** Zur Expression des gewünschten Proteins sollte der Expressionvektor auch spezifische Nukleotidsequenzen enthalten, die Transkriptions- und Translations-regulierende Information enthalten, die mit der DNA, die für das gewünschte Protein codiert, derart verbunden sind, daß Genexpression und die Herstellung des Proteins erlaubt wird. Erstens, damit das Gen transkribiert wird, muß ihm ein Promotor vorangestellt sein, der von einer RNA-Polymerase erkennbar ist, an den die Polymerase bindet, und somit den Transkriptionsvorgang einleitet. Es sind eine Vielzahl solcher Promotoren im Einsatz, die mit unterschiedlichen Wirkungsgraden (starke und schwache Promotoren) arbeiten, und die für prokaryotische und eukaryotische Zellen verschieden sind. Hohe Spiegel an Genexpression werden in prokaryotischen Zellen erzielt, indem auch Ribosomenbindungsstellen verwendet werden, wie die Shine-Dalgarno-Sequenz (SD-Sequenz). Für eukaryotische Wirte können verschiedene Transkriptions- und Translations-regulierende Sequenzen verwendet werden, abhängig von der Natur des Wirts. Sie können aus verschiedenen Virusquellen erhalten werden, wie Adenovirus, Rinderpapillomvirus, Affenvirus oder ähnlichen, in denen die regulatorischen Signale mit einem bestimmten Gen assoziiert sind, das einen hohen Expressionsspiegel aufweist. Beispiele sind der TK-Promotor von Herpes-Virus, der SV40-Early-Promotor, der ga14-Gen-Promotor aus Hefe usw. Es können Transkriptions-initiiierende regulatorische Signale ausgewählt werden, die die Repression oder Aktivierung ermöglichen, so daß die Expression des Gens moduliert werden kann.

**[0029]** Das DNA-Molekül mit der Nukleotidsequenz, die für ein Protein codiert, das die Aminosäuresequenz des erfindungsgemäßen, löslichen, extrazellulären IFN- $\beta$ /IL-6-R-Fragments umfasst, dem eine Nukleotidsequenz für ein Signalpeptid vorangestellt ist, und die in funktionsfähiger Weise damit verknüpften Transkriptions- und Translationsregulierenden Signale werden in einen Vektor eingeführt, der die gewünschten Gensequenzen in das Wirtszellchromosom integrieren kann. Die Zellen, die die eingeführte DNA stabil in ihre Chromosomen integriert haben, können selektiert werden, indem ebenfalls ein oder mehrere Marker eingeführt werden, die die Selektion auf Wirtszellen ermöglichen, die den Expressionsvektor enthalten.

**[0030]** Bei einer bevorzugten Ausführungsform wird das eingeführte DNA-Molekül in ein Plasmid oder einen viralen Vektor eingebaut sein, die zur autonomen Replikation im Empfängerwirt befähigt sind. Prokaryotische und eukaryotische Plasmide sind aus der Literatur bekannt. Wichtige Faktoren bei der Wahl eines bestimmten Plasmids oder viralen Vektors umfassen die Einfachheit, mit der Empfängerzellen, die den Vektor enthalten, erkannt und aus solchen Empfängerzellen selektiert werden können, die den Vektor nicht enthalten; der Anzahl der Kopien des Vektors, die in einem bestimmten Wirt erwünscht ist; und ob es wünschenswert ist, den Vektor zwischen Wirtszellen verschiedener Arten "hin und her übertragen" zu können.

**[0031]** Ist der Vektor oder die DNA-Sequenz, die das bzw. die Konstrukt(e) enthalten, einmal für die Expression hergestellt, kann das bzw. die DNA-Konstrukt(e) in eine geeignete Wirtszelle durch ein beliebiges einer Vielzahl von geeigneten Mitteln eingebracht werden: Transformation, Transfektion, Konjugation, Protoplastenfusion, Elektroporation, Calciumphosphat-Präzipitation, direkte Mikroinjektion usw. Die in der vorliegenden Erfindung zu verwendenden Wirtszellen können entweder prokaryotisch oder eukaryotisch sein. Bevorzugte prokaryotische Wirte umfassen Bakterien, wie *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia* usw. Der am meisten bevorzugte prokaryotische Wirt ist *E. coli*. Unter diesen Bedingungen wird das Protein nicht glykosyliert. Der prokaryotische Wirt muß mit dem Replikon und den Kontrollsequenzen in dem Expressionsplasmid kompatibel sein. Bevorzugte eukaryotische Wirte sind Säugerzellen, z.B. Human-, Affen-, Maus- und Ovarienzellen des chinesischen Hamsters (CHO), da sie die posttranslationalen Modifikationen für Proteinmoleküle bereitstellen, einschließlich dem richtigen Falten oder Glykosylieren an den richtigen Stellen. Auch Hefezellen können die posttranslationalen Peptidmodifikationen, einschließlich der Glykosylierung, durchführen.

**[0032]** Nach dem Einbringen des Vektors werden die Wirtszellen in einem selektiven Medium kultiviert, das auf das Wachstum der vektorhaltigen Zellen selektiert. Die Expression des bzw. der klonierten Gensequenz(en) führt zu der Herstellung des gewünschten IFN- $\beta$ /IL-6-R-Fragments. Das exprimierte Protein wird dann isoliert und gereinigt in Übereinstimmung mit dem in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Reinigungsverfahren oder anhand eines anderen herkömmlichen Verfahrens, umfassend die Extraktion, Präzipitation, Chromatographie, Elektrophorese oder ähnliches.

**[0033]** Ein weiteres Reinigungsverfahren, das vorzugsweise für die Reinigung des erfindungsgemäßen Proteins verwendet wird, ist die Affinitätschromatographie unter Verwendung von monoklonalen Anti-IFN- $\beta$ /IL-6-R-Antikörpern, die hergestellt und auf einer Gelmatrix immobilisiert werden, die in einer Säule vorliegt. Verunreinigte Präparationen, enthaltend das rekombinante Protein, werden über die Säule gegeben. Das Protein bindet an die Säule durch den spezifischen Antikörper, während die Verunreinigungen durchlaufen. Nach dem Waschen wird das Protein von dem Gel durch Änderung des pHs oder der Ionenstärke eluiert.

**[0034]** Wie hierin verwendet, bezieht sich der Begriff "Salze" sowohl auf Salze von Carboxylgruppen, wie auch auf Säureadditionssalze von Aminogruppen des Proteinmoleküls, die sich mit bekannten Mitteln ausbilden. Salze einer Carboxylgruppe umfassen anorganische Salze, z.B. Natrium, Calcium, und Salze mit organischen Basen, wie diejenigen, die sich beispielsweise mit Aminen, wie Triethanolamin, Arginin oder Lysin, ausbilden. Säureadditionssalze umfassen z.B. Salze mit Mineralsäuren und Salze von organischen Säuren.

**[0035]** "Funktionelle Derivate", wie hierin verwendet, umfaßt Derivate, die aus den funktionellen Gruppen hergestellt werden können, die als Seitenketten in den Resten oder den N- oder C-terminalen Gruppen auftreten, durch bekannte Mittel, und sie werden von der vorliegenden Erfindung umfaßt, solange sie pharmazeutisch verträglich bleiben, d.h. sie zerstören nicht die Aktivität des Proteins und verleihen den Zusammensetzungen, die sie enthalten, keine toxischen Eigenschaften. Diese Derivate umfassen aliphatische Ester oder Amide der Carboxylgruppen und N-Acylderivate von freien Aminogruppen oder O-Acylderivate von freien Hydroxylgruppen, die sich mit Acylresten (z.B. Alkanoyl- oder carbocyclische Aroylgruppen) bilden.

**[0036]** Als "aktive Fraktionen" des im wesentlichen gereinigten Proteins umfaßt die vorliegende Erfindung jedes Fragment der Polypeptidkette des Proteinmoleküls, alleine oder zusammen mit assoziierten Molekülen oder damit verknüpften Resten, z.B. Zucker- oder Phosphatresten, oder Aggregate des Proteinmoleküls oder der Zuckerreste selbst, vorausgesetzt, daß die Fraktion die Fähigkeit besitzt, IFN- $\beta$ /IL-6 spezifisch zu binden.

**[0037]** Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zum Herstellen von Antikörpern gegen das lösliche, extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ /IL-6-R und F(ab)-Fragmente davon. Die funktionelle Wechselwirkung der erfindungsgemäßen Antikörper mit dem IFN- $\beta$ /IL-6-R-Fragment stellt auch ein neues diagnostisches Werkzeug bereit, basierend auf Immuno-Assays, wie Radioimmuno-Assay, ELISA usw., für den Nachweis der Über- oder Unterproduktion von IFN- $\beta$ /IL-6-R durch Zellen in dem Körper bei bestimmten Störungen.

**[0038]** Die Antikörper können entweder polyklonal oder monoklonal sein. Sie können in Kaninchen, Mäusen oder anderen Tieren oder davon erhaltenen Gewebekulturzellen erzeugt werden, oder sie können die Produkte von Zellen von humanem Ursprung sein. Sie können auch durch rekombinante DNA-Technologie hergestellt werden, entweder in einer Form, die identisch ist zu dem nativen Antikörper, oder als chimäre Moleküle, die durch Rekombination von Antikörpermolekülen des Menschen und tierischen Ursprungs konstruiert sind. Die Entwicklung des Antikörperspiegels kann verfolgt werden anhand der Fähigkeit des tierischen Serums, die Hybridomwachstumsfaktor(HGF)-Aktivität von IFN- $\beta$ /IL-6 zu hemmen.

**[0039]** Für die Herstellung der Antikörper können das lösliche, extrazelluläre Fragment oder ein oder mehrere synthetische Peptide, die identisch sind zu der bekannten Sequenz des Proteins, z.B. der N-terminalen Proteinsequenz, verwendet werden, um Tiere zu immunisieren. Eine weitere Möglichkeit besteht in dem Fusionieren einer der möglichen Nukleotidsequenzen, die für ein Fragment des Rezeptors codiert, an das Gen, das für Protein A codiert, um das Gen für das Fusionsprotein A-IFN- $\beta$ /IL-6-R in E. coli zu exprimieren, um das Fusionsprotein durch Affinitätschromatografie auf einer IgG-Sepharose<sup>®</sup>-Säule zu reinigen und es dann zum Immunisieren von Tieren zu verwenden.

**[0040]** Die monoklonalen Antikörper werden hergestellt unter Verwendung von herkömmlicher Hybridomtechnik (Köhler et al. (1975), Nature 256: 495; Köhler et al. (1976) Eur. J. Immunol. 6: 511). Nach dem Immunisieren werden Milzzellen alleine und/oder zusammen mit Lymphknotenzellen der immunisierten Tiere isoliert und mit einer geeigneten Myelomzelllinie fusioniert. Nach der Fusion werden die erhaltenen Hybridomzellen selektiv in HAT-Medium gehalten und dann kloniert. Die anhand einer solchen Selektion erhaltenen Hybridomzellen werden dann abgesucht, um Klone zu identifizieren, die Antikörper sezernieren, die das lösliche, extrazelluläre Fragment des IFN- $\beta$ /IL-6-Rezeptors binden können. Nach der Identifizierung werden die gewünschten Klone in großer Menge kultiviert, entweder in Suspensionskultur oder in Aszitesflüssigkeit, durch Injizieren der Zellen in das Peritoneum von geeigneten Wirtsmäusen. Die von den Hybridomen erzeugten monoklonalen Antikörper werden dann isoliert und gereinigt.

**[0041]** Wie zuvor erwähnt, können die monoklonalen Antikörper auch immobilisiert und für die Reinigung des IFN- $\beta$ /IL-6-Rezeptors oder seines löslichen, extrazellulären Fragments in Affinitätsreinigungsverfahren unter Verwendung einer Immunabsorptionssäule verwendet werden.

**[0042]** Das lösliche, extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ /IL-6-R und Salze, funktionelle Derivate und aktive Fraktionen davon und Mischungen aus den zuvor Genannten, sind geeignet zum Stimulieren und Verstärken der gewünschten Wirkungen von IFN- $\beta$ /IL-6 in Säugern, wie der antiproliferativen Aktivität von IFN- $\beta$ /IL-6.

**[0043]** Die vorliegende Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Zusammensetzungen, umfassend einen pharmazeutisch verträglichen Träger, IFN- $\beta$ /IL-6 und das lösliche, extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ /IL-6-R oder Salze, funktionelle Derivate oder aktive Fraktionen davon und Mischungen aus den zuvor Genannten, als Wirkstoffe. Diese Zusammensetzungen können unter beliebigen Bedingungen verwendet werden, wo es wünschenswert ist, die Aktivität von IL-6 zu stimulieren. Natürlich ist die Menge an zu verabreichendem IFN- $\beta$ /IL-6 niedriger in Anbetracht der verstärkenden Wirkung des Rezeptors. Die Art der Verabreichung kann auf beliebige zulässige Art der Verabreichung für ähnliche Mittel erfolgen und hängt von dem zu behandelnden Zustand ab.

**[0044]** Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen werden für die Verabreichung hergestellt durch Mischen der Wirkstoffe mit physiologisch verträglichen Trägern, Stabilisatoren und Hilfsstoffen und werden in dosierter Form hergestellt, z.B. durch Lyophilisieren in Dosiergefäßen. Die Menge an zu verabreichendem Wirkstoff hängt vom Weg der Verabreichung, der zu behandelnden Krankheit und dem Zustand des Patienten ab.

**[0045]** Das lösliche, extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ /IL-6-R und Salze, funktionelle Derivate und aktive Fraktionen davon und Mischungen aus den zuvor Genannten können auch alleine verwendet werden zum Verstärken der Aktivität von endogen gebildetem IFN- $\beta$ /IL-6 bei Zuständen, wie bakteriellen Infektionen, Verbrennungen, Trauma usw.

**[0046]** Die Erfindung wird jetzt anhand der folgenden, nicht-beschränkenden Beispiele erläutert.

#### Beispiel 1:

##### Isolierung und Reinigung von IFN- $\beta$ /IL-6-Rezeptor aus humaner Placenta

**[0047]** Placentamembranen wurden wie folgt nach dem Verfahren von R. A. Hock und M. D. Hollenberg (1980), J. Biol. Chem. 255, 10731–10736 hergestellt: Placentastücke werden in einem Puffer homogenisiert, der aus 25 mM Tris-HCl, pH 7,4, 0,25 M Sucrose, 0,1 M NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM EGTA, 1 mM PMSF und 22 Trypsinhemmende Einheiten (Tiu)/ml Aprotinin besteht, gefolgt von dem Filtrieren durch Gaze und Zentrifugieren (10000 g für 30 Minuten bei 4°C). NaCl und MgSO<sub>4</sub> werden dem Überstand auf eine Endkonzentration von 0,1 M bzw. 0,2 mM zugesetzt. Die Mischung wird zentrifugiert (48000 g für 40 Minuten bei 4°C), und das erhaltene Pellet wird in einem Puffer aus 10 mM Hepes, pH 7,4, 150 mM NaCl und 1 mM PMSF und 22 Tiu/ml resuspendiert. Die Membranen werden dann in einem Solubilisierungspuffer (Endkonzentrationen: 10 mM Hepes, pH 7,4, 1 bis 2% Triton<sup>®</sup>X-100, 1 mM PMSF und 20 Tiu/ml Aprotinin) solubilisiert. Die Suspension wird dann zunächst bei 10000 g für 15 Minuten und dann bei 100000 g für 60 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird auf eine immobilisierte IFN- $\beta$ /IL-6-Säule (2,5 mg pro 0,8 ml Affigel<sup>®</sup>10) aufgetragen. Die Beladung erfolgt mit einer Flußrate von 0,2 bis 0,5 ml/Min. Die Säule wird dann mit PBS (50 ml) gewaschen, und das gebundene Material wird mit einer Lösung aus 25 mM Zitronensäure eluiert. Fraktionen von 1 ml werden gesammelt und unmittelbar mit 1 M Hepes, pH 8,5, neutralisiert. Jede Fraktion wird auf ihre Fähigkeit, <sup>125</sup>I-IFN- $\beta$ /IL-6 zu binden und auf den Proteingehalt hin untersucht. Das Protein wird mit Fluorescamin bestimmt.

#### Beispiel 2:

##### Isolierung und Reinigung von löslichem extrazellulärem IFN- $\beta$ /IL-6-R-Fragment

###### 2.1 Herstellung des Urinkonzentrats

**[0048]** Ein Pool aus 200 Liter Urin von gesunden Frauen in der Menopause wurde einer Mikrofiltration auf einer Pelliconmembran mit einer Porengröße von 0,45  $\mu$ m unterzogen. Das Filtrat wurde durch Ultrafiltration unter Verwendung einer Pelliconmembran mit einer Molekulargewichtsausschlußgrenze von 10 kD auf ein Endvolumen von 500 ml konzentriert. Das Konzentrat wurde gegen Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung, enthaltend 1 mM Benzamidin und 0,1% Natriumazid, dialysiert.

###### 2.2. Ionenaustauschchromatographie auf CM-Sepharose<sup>®</sup>

**[0049]** Eine CM-Sepharose<sup>®</sup> (Pharmacia, Uppsala, Schweden) Kationenaustauschsäule (2,7  $\times$  10 cm) wurde mit 1 M NaCl, 10 mM Zitronensäure, pH 5,0, enthaltend 0,02% NaN<sub>3</sub> (Puffer C) vorgewaschen und mit 10 mM Zitronensäure (pH 5), enthaltend 0,02% NaN<sub>3</sub>, (Puffer A) äquilibriert. Das Konzentrat der Urinproteine wurde gegen Puffer A dialysiert und für 15 Minuten bei 8000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 4°C auf eine

Säule mit einer Flußrate von 2 ml/Min. aufgetragen. Die Säule wurde mit 1500 ml Puffer A gewaschen und mit 250 ml einer Lösung, enthaltend 200 mM NaCl, 10 mM Zitronensäure (pH 5,0) und 0,02%  $\text{NaN}_3$ , (Puffer B) eluiert. Ein zweiter Schritt der Eluierung wurde mit 150 ml Puffer C durchgeführt. Fraktionen von 50 ml wurden gesammelt und auf IFN- $\beta$ 2/IL-6-Bindungsaktivität hin getestet (Bindung von  $^{125}\text{I}$ -IFN- $\beta$ 2/IL-6) und ihre Proteinkonzentration wurde bestimmt.

### 2.3 Affinitätsreinigung auf einer IFN- $\beta$ 2/IL-6-Säule

**[0050]** IFN- $\beta$ 2/IL-6 wurde auf eine Konzentration von 5 mg/ml gebracht, dann mit PBS, enthaltend 0,02% Natriumazid, äquilibriert und an Affigel<sup>®</sup>-10 (2,5 mg auf 0,8 ml Kügelchen) gebunden. Die Konzentration der Urinproteine aus Schritt 2.1 bis 2.2 wurde mit Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) äquilibriert und auf die IFN- $\beta$ 2/IL-6-Affigel<sup>®</sup>-10-Säule (2,5 mg Protein, gebunden an 0,8 ml Affigel<sup>®</sup>-10) bei einer Durchflußrate von 0,2 ml/Min. bei 4°C aufgetragen. Ungebundene Proteine wurden mit PBS gewaschen, und die gebundenen Proteine wurden dann bei pH 2,5 durch Auftragen einer Lösung von 25 mM Zitronensäure eluiert, 1 ml-Fraktionen wurden in Röhrchen, enthaltend 1 M HEPES, pH 8,5, gesammelt. Das eluierte Protein wurde auf Protein und folgend auf ElektrobloTTing auf Bindung von  $^{125}\text{I}$ -IFN- $\beta$ 2/IL-6 hin untersucht.

### 2.4 Umkehrphasenhochdruckflüssigkeitschromatographie

**[0051]** Die Umkehrphasen-HPLC-Säule Aquapore<sup>®</sup>RP-300 4,6 × 30 mm (Brownlee Labs) wurde mit 0,3% wäßriger Trifluoressigsäure (TFA) (Puffer F) vorgewaschen bis eine stabile Grundlinie durch das Fluorescamin-Nachweisverfahren erhalten wurde. Die Proteinpeak-Fraktionen, die von den Affinitäts-IFN- $\beta$ 2/IL-6-Säulen aus Schritt 2.3 eluiert wurden, wurden vereinigt und in einer 1,8 ml-Portion auf die Säule injiziert. Die Säule wurde mit Puffer F bei einer Durchflußrate von 0,5 ml/Min. laufengelassen bis das Fluorometer kein Protein nachwies. Elution wurde bei einer Durchflußrate von 0,5 ml/Min. durchgeführt mit einem linearen Gradienten von Acetonitril in Puffer F (----) (0 bis 20% für 5 Minuten, gefolgt von 20 bis 50% für 60 Minuten, und schließlich 50 bis 80% für 5 Minuten). Die Säule wurde dann für 15 Minuten mit 80% Acetonitril gewaschen. Fraktionen von 0,5 ml wurden gesammelt und auf Proteingehalt (\_\_\_\_) und folgend auf ElektrobloTTing auf Bindung von  $^{125}\text{I}$ -IFN- $\beta$ 2/IL-6 hin getestet. Wie in [Fig. 1](#) gezeigt, wurde gefunden, daß die aktiven Proteine als ein Proteinpeak in Fraktionen, entsprechend ungefähr 39% Acetonitril, eluieren.

### 2.5 SDS-PAGE und Bindung an $^{125}\text{I}$ -IFN- $\beta$ 2/IL-6

**[0052]** Um das Ergebnis der Reinigung aufzuzeichnen, wurde Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) unter nicht-reduzierenden Bedingungen gemäß dem Verfahren von Laemmli U.K. et al. (Nature (1970) 227: 680) durchgeführt. Proben der aktiven Fraktionen, die von der Umkehrphasen-HPLC eluierten, wurden mit dreifach konzentriertem Probenpuffer, enthaltend kein SDS und kein  $\beta$ -Mercaptoethanol, gemischt und auf ein 12% Acrylamidgel geladen. In [Fig. 2](#) wurde als Referenz für das Molekulargewicht eine Mischung an Molekulargewichtsmarkern ( $\alpha$ -Lactalbumin 14,4 kD, Sojabohnentrypsininhibitor 20,1 kD, Carboanhydrase 30 kD, Ovalbumin 43 kD, Rinderserumalbumin 67 kD und Phosphorylase b. 94 kD) in Spur 1 geladen. Das Gel lief bei 150 Volt, und die Proteinbanden wurden durch Silberfärbung (Oakley, B. R. et al., Anal. Biochem. 105: 361) sichtbar gemacht. In Spur 2 ist gezeigt, daß das HPLC gereinigte IFN- $\beta$ 2/IL-6-bindende Protein als einzelne Bande mit einem apparenten Molekulargewicht von 50 (40 bis 60 kD) wanderte. Die Bindung an  $^{125}\text{I}$ -IFN- $\beta$ 2/IL-6 ( $2,2 \times 10^7$  cpm/ $\mu\text{g}$ ,  $1,5 \times 10^6$  cpm/ml) wurde folgend auf die SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen und ElektrobloTTing auf Nitrozellulosemembran (Schleicher und Schuell 0,45  $\mu\text{m}$ ) durchgeführt, wobei im wesentlichen dem Western-Blot-Verfahren (Towbin H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 4350–4354, 1979) gefolgt wurde. Wie in Spur 3 gezeigt, reagierte nur das 50 (40 bis 60) kD Protein der teilweise gereinigten Proteinprobe von dem Eluat der IFN- $\beta$ 2/IL-6-Affinitätssäule mit  $^{125}\text{I}$ -IFN- $\beta$ 2/IL-6. Eine Probe mit gereinigtem IFN-Gamma-bindendem Protein von dem IFN-Gamma-Affinitätssäuleneluat wurde als eine Negativkontrolle (Spur 4) verwendet. Spuren 3 und 4 wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

### 2.6 N-Terminale Sequenzanalyse

**[0053]** Proben des im wesentlichen gereinigten, löslichen, extrazellulären Fragments von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R gemäß der Erfindung (1 bis 5  $\mu\text{g}$ , 50 bis 200 pMol jeweils) wurden auf eine vorbehandelte Biobren-beschichtete Glasfaserscheibe aufgetragen. Die getrockneten Scheiben wurden mehrfachen Zyklen an Edman-Abbau in einem automatisierten, gepulsten Proteinmikrosequenzierer mit einer Flüssiggasphase (Modell 475) mit einem On-Line-HPLC-PTH-Aminosäureanalysator (Modell 120) und einer Datenaufnahme- und -verarbeitungseinheit (Modell 900) (sämtliche von Applied Biosystems Inc. Foster City, CA, USA) unterzogen. Die von dem Computer erstellte Sequenz wurde mit den Rohdaten verglichen und, falls erforderlich, berichtigt. Insgesamt wur-

den zwei getrennte Analysen durchgeführt, um die Sequenzdaten zu bestätigen. Die ursprüngliche Ausbeute betrug über 40%, wobei dies anzeigt, daß das Hauptprotein in der Präparation (die 50 kD-Bande) mit der erhaltenen Sequenz in Beziehung steht. Das N-terminale Sequenzieren dieses löslichen, extrazellulären Fragments des IFN- $\beta$ 2/IL-6-R ergab die folgende Aminosäuresequenz:

**Leu-Ala-Pro-Arg-Arg-Cys-Pro-Ala-Gln-Glu-Val-Ala-Arg-Gly-Val-Leu-Thr-Ser-**

**Leu-Pro-Gly-Asp-Ser-Val-Thr-Leu-Thr-Cys-Pro-Gly-**

Beispiel 3:

Herstellung von polyklonalen Antikörpern gegen IFN- $\beta$ 2/IL-6-R

**[0054]** Kaninchen wurden anfänglich subcutan injiziert mit 10  $\mu$ g einer reinen Präparation des löslichen, extrazellulären Fragments von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R, emulgiert in vollständigem Freund's Adjuvans. Drei Wochen später wurden sie erneut subcutan injiziert mit 10  $\mu$ g der Präparation in unvollständigem Freund's Adjuvans. Drei zusätzliche Injektionen als Lösung in PBS erfolgten in Abständen von 10 Tagen. Den Kaninchen wurde 10 Tage nach der letzten Immunisierung Blut abgenommen. Die Entwicklung des Antikörperspiegels wurde verfolgt anhand der Fähigkeit des Kaninchenserums, die HGF (Hybridomwachstumsfaktor)-Aktivität von IFN- $\beta$ 2/IL-6 zu hemmen. Die Immunglobuline der Kaninchenserum wurden präzipitiert durch den Zusatz von Ammoniumsulfat und Zentrifugation und durch Dialyse und Chromatographie gereinigt.

Beispiel 4:

Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen IFN- $\beta$ 2/IL-6-R

**[0055]** Weibliche Balb/C-Mäuse (drei Monate alt) wurden zunächst mit 2,5  $\mu$ g gereinigtem, löslichem, extrazellulärem Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R in einer Emulsion von vollständigem Freund's Adjuvans injiziert, und drei Wochen später subcutan in unvollständigem Freund's Adjuvans. Drei zusätzliche Injektionen erfolgten im Abstand von 10 Tagen, subcutan in PBS. Ein letzter Boost erfolgte intraperitoneal drei Tage vor der Fusion mit der Maus, die den höchsten Bindungstiter im umgekehrten Festphasen-RIA zeigte. Die Fusion wurde durchgeführt mit Hilfe der NSO/1-Myelomzelllinie und Lymphozyten, die aus der Milz und den Lymphknoten des Tieres hergestellt wurden, als Fusionspartnern. Die fusionierten Zellen wurden in Mikrokulturplatten verteilt, und die Hybridome wurden in DMEM, das mit HAT und 15% Pferdeserum ergänzt war, selektiert. Hybridome, die Antikörper gegen IFN- $\beta$ 2/IL-6-R erzeugten, wurden subkloniert durch das begrenzte Verdünnungsverfahren und in Balb/C-Mäuse injiziert, die mit Pristan sensibilisiert worden waren, für die Erzeugung von Aszites. Immunglobuline wurden von dem Aszites durch Ammoniumsulfatpräzipitation (50% Sättigung) isoliert, zentrifugiert, erneut in Wasser gelöst und gegen PBS, enthaltend 0,02% Azid, dialysiert. Die Isotypen der Antikörper wurden entweder definiert mit Hilfe eines gewerblich erhältlichen ELISA-Kits (Amersham, U.K.) oder durch das Ouchterlony-Verfahren unter Verwendung von gewerblich erhältlichen Antiseren gegen verschiedene Isotypen.

**[0056]** Das Absuchen der monoklonale Anti-IFN- $\beta$ 2/IL-6-R-Antikörper erzeugenden Hybridome wurde wie folgt durchgeführt. Hybridomüberstände wurden auf die Anwesenheit von Anti-IFN- $\beta$ 2/IL-6-R-Antikörpern getestet mit einem Umkehrfestphasenradioimmunoassay (iRIA). PVC-Mikrotiterplatten (Dynatech Laboratories, Alexandria, VA) wurden mit Affinitäts-gereinigten Anti-Mausserum-F(ab)<sub>2</sub>-Antikörpern der Ziege (BioMakor) (10  $\mu$ g/ml, 80  $\mu$ l/Vertiefung) beschichtet. Folgend auf die über-Nacht-Inkubation bei 4°C wurden die Platten zweimal mit PBS, enthaltend BSA (0,5%) und Tween<sup>®</sup>20 (0,05%), gewaschen und in einer Waschlösung für mindestens zwei Stunden bei 37°C geblockt. Hybridomkulturüberstände (50  $\mu$ l/Vertiefung) wurden zugesetzt, und die Platten wurden für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden dann dreimal mit der Waschlösung gewaschen, und <sup>125</sup>I-IFN- $\beta$ 2/IL-6-R (50  $\mu$ l, 10<sup>5</sup> cpm) wurde für die weitere Inkubation für 16 Stunden bei 4°C zugesetzt. Die Platten wurden dreimal gewaschen und einzelne Vertiefungen wurden herausgeschnitten und in einem Gammazähler ausgezählt. Proben, die Zählraten ergaben, die mindestens fünfmal höher waren als der Wert der Negativkontrolle, wurden als positiv angesehen (Tabelle I). Dreißig positive Klone wurden ausgewählt, subkloniert für weitere Untersuchungen und charakterisiert.

Beispiel 5:

Western-Blotverfahren

**[0057]** Das Western-Blotverfahren wurde wie folgt durchgeführt: Proben von teilweise gereinigtem, löslichem Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R aus Humanurin wurden mit SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert und per Elektrobplot auf Nitrozellulosefolien (BA85, Schleicher und Schuell) übertragen. Folgend auf die Elektrobplotübertragung wurden die Folien über Nacht mit einem Blockierpuffer (5% fettfreie Milch in PBS, enthaltend 0,05% Tween<sup>®</sup>20 und 0,02% Natriumazid) und dann für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem monoklonalen Anti-IFN- $\beta$ 2/IL-6-R-Antikörper Nr. 34-4 inkubiert. Folgend auf das Waschen in 0,05% Tween<sup>®</sup>20 in PBS wurde die Nitrozellulose für 4 Stunden bei Raumtemperatur mit <sup>125</sup>I-Anti-Mausserum der Ziege ( $0,7 \times 10^6$  cpm/ml in dem Blockierpuffer) inkubiert. Die Folie wurde dann gewaschen, getrocknet und autoradiographiert.

**[0058]** Einige der isolierten Klone und Subklone mit ihren Isotypen und die Ergebnisse der Bindung von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R in dem Umkehr-RIA und dem Western-Blotverfahren sind in Tabelle I aufgelistet.

Klone die monoklonale Antikörper gegen IFN- $\beta$ /IL-6-Rezeptor herstellen

Tabelle I

Klon Nr.	Screening mit iRIA [CPM]	Western-Blot		Isotyp
		+M*	-M	
4.4	20455	+	+	IgG <sub>1</sub>
5	1085	+	+	IgM
17.1	36565	+		IgG <sub>2a</sub>
20.2	31450	+		IgG <sub>1</sub>
22	11465	+	+	IgG <sub>2</sub>
24.2	8850	+	+	IgG <sub>1</sub>
25	2000			IgG <sub>2a</sub>
28.7	1645			IgG <sub>1</sub>
29	4165			
30.8	1755	+		IgM
31	3060			
32.5	31465	+	+	IgG <sub>1</sub>
33.2	14875			IgG <sub>1</sub>
34.4	33480	+		k, IgG <sub>1</sub>
35.2	35495	+	+	k, IgG <sub>3</sub>
36	1445	+		IgM
37	9640			IgG <sub>1</sub>
38.4	35975	+		IgG <sub>1</sub>
39.1	5195	+	+	IgG <sub>2</sub>
40	1415	+		IgG <sub>1</sub>
41	1870	+		IgG <sub>1</sub>
42.5	33565			IgG <sub>1</sub>
43	1255			IgG <sub>1</sub>
46	6090			
48	18000			IgG <sub>1</sub>
49	8000	+		IgM
50.3	28440	+	+	IgG <sub>1</sub>
51	1075			IgG <sub>1</sub>
52	3945			IgM
53.4	3440			IgG <sub>1</sub>

\* M: Mercaptoethanol (Reduktionsmittel)

Beispiel 6:

Affinitätschromatographie von Präparationen des löslichen Fragments von IFN- $\beta$ /IL-6-R mit monoklonalen Antikörpern

[0059] Antikörper gegen IFN- $\beta$ /IL-6-R werden für die Reinigung des löslichen Fragments mit Affinitätschromatographie verwendet. Der monoklonale Antikörper Nr. 34-4 wurde in diesem Beispiel für die Affinitätschromatographie verwendet, nachdem seine Bindungskapazität für das radiomarkierte Antigen in einem Umkehrfestphasenradioimmunoassay (iRIA) getestet worden war. Aszitesflüssigkeit, enthaltend den monoklonalen Antikörper, der von Hybridom Nr. 34-4 sezerniert wurde, wurde durch Ammoniumsulfatpräzipitation bei 50% Sättigung, gefolgt von extensiver Dialyse gegen PBS, gereinigt. Ungefähr 10 mg des Immunglobulins wurden auf 1 ml Polyacrylhydrazidagarose gebunden, wie von Wilchek und Miron, Methods in Enzymology, 34: 2-76, 1979, angegeben. 250 ml Humanurin, teilweise gereinigt auf Carboxymethylsepharose®(CMS)-Säule (äquivalent zu 250 l Rohurin) wurden auf 0,5 ml der Säule mit Anti-IFN- $\beta$ /IL-6-R-Antikörper bei 4°C und einer Flußrate von 0,25 ml/Min. gegeben. Die Säule wurde mit PBS gewaschen bis kein Protein in der Waschlösung nachge-

wiesen wurde. Lösliches Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R wurde mit 25 mM Zitronensäurepuffer, pH 2,2 (8 Fraktionen à 1 Säulenvolumen) eluiert und sofort durch 1 M Hepespuffer, pH 8,5, neutralisiert, mit einer gesamten Wiedergewinnung von 88% des löslichen Fragments von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R. Die Analyse der SDS-PAGE der eluierten Fraktionen mit Silberfärbung ergab eine Hauptbande von M. W. 50000 und eine weitere Hauptbande von 150000 (Verunreinigungen). Die weitere Reinigung dieser Präparation wurde durch RP-300 HPLC erreicht, und das lösliche Rezeptorfragment eluierte bei 39% Acetonitril mit einem Muster, das ähnlich ist zu dem in [Fig. 1](#).

#### Immunaффinitätsreinigung von IL-6-Rezeptor aus Urin (CMS)

Tabelle II

McAb-Säule	Probe	Fluorescamin			ELISA			
		ml	$\mu\text{g/l}$	$\mu\text{g}$	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g}$	Reinheit %	Ausbeute %
34.4	Beladung	250	2200	550000	0,38	95		
	Efluent	250	2000	500000	0,06	15		
	Elution 1	1,2	20	24	7,7	9	38	
	Elution 2	1,2	45	54	30,4	36,5	67	
	Elution 3	1,2	18	21,6	12	14,4	80	
	Elution 4	1,2	11	13	8	9,6	87	
	Gesamteluat					69,5		88

Beispiel 7:

#### ELISA-Test

**[0060]** Mikrotiterplatten (Dynatech oder Maxisorb von Nunc) wurden mit monoklonalem Anti-IFN- $\beta$ 2/IL-6-R-Antikörper Nr. 34-4 (Immunglobulin-Fraktion, 120  $\mu\text{l}$ , 20  $\mu\text{g/ml}$  in PBS) über Nacht bei 4°C beschichtet. Die Platten wurden mit PBS, enthaltend BSA (0,5%) und Tween<sup>®</sup>20 (0,05%), gewaschen und in der gleichen Lösung für mindestens 2 Stunden bei 37°C geblockt. Die getesteten Proben wurden in der Blockierlösung verdünnt und den Vertiefungen (100  $\mu\text{l}$ /Vertiefung) für 4 Stunden bei 37°C zugesetzt. Die Platten wurden dann dreimal mit PBS, enthaltend Tween<sup>®</sup>20 (0,05%), gewaschen, gefolgt von dem Zusatz von Anti-IFN- $\beta$ 2/IL-6-R-Serum des Kaninchens (1:1000, 100  $\mu\text{l}$ /Vertiefung) für die weitere Inkubation für 4 Stunden bei 37°C. Die Platten wurden dreimal gewaschen, und ein Konjugat aus Ziege-Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase (HRP, BioMakor, 1:2000, 100  $\mu\text{l}$ /Vertiefung) wurde für 2 Stunden bei 37°C zugesetzt. Die Platten wurden viermal gewaschen, und die Farbe wurde mit ABTS (2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonsäure), Sigma)-Substrat entwickelt. Die Platten wurden mit einem automatischen ELISA-Ablesegerät abgelesen. Alternativ kann der ELISA durchgeführt werden durch Ersetzen der polyklonalen Anti-IFN- $\beta$ 2/IL-6-R-Antikörper des Kaninchens mit einem monoklonalen Antikörper Nr. 22-1, der entweder an HRP konjugiert oder biotinyliert ist.

Beispiel 8:

**[0061]** Die Aktivität des löslichen, extrazellulären Fragments von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R wurde mit der Hybridom/Plasmazytom-Wachstumsfaktor(HGF)-Aktivität von IFN- $\beta$ 2/IL-6 getestet. Mausplasmazytom-T1165-Zellen wurden 16 Stunden einer niedrigen Konzentration an reinem, humanem, rekombinantem IFN- $\beta$ 2/IL-6, hergestellt in E. coli und bis zur Homogenität gereinigt ( $2 \times 10^6$  HGF Einheiten/mg), ausgesetzt. Parallel dazu wurde die gleiche IFN- $\beta$ 2/IL-6-Probe für 90 Minuten bei 37°C mit verschiedenen Konzentrationen des löslichen, extrazellulären Fragments von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R inkubiert und dann den Zellen zugesetzt. Mit 0,25 ng/ml IFN- $\beta$ 2/IL-6 alleine gab es keine Stimulierung des <sup>3</sup>H-Thymidineinbaus in die gepulsten T1165-Zellen, aber Zusatz von löslichem, extrazellulärem Fragment- von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R erzeugte eine Dosis-abhängige Stimulierung (Tabelle III). Bei 5 ng/ml IFN- $\beta$ 2/IL-6 wurde Wachstumsstimulierung der T1165-Zellen beobachtet, und nur eine schwache Stimulierung erfolgte durch das lösliche, extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R. Als eine Kontrolle zeigte der lösliche IFN-Gamma-Rezeptor, gereinigt aus Humanurin, keinen Effekt (Tabelle III).

**[0062]** Unterschwellige Konzentrationen an IFN- $\beta$ 2/IL-6 können deshalb spezifisch verstärkt werden durch den Zusatz von löslichem, extrazellulärem Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R. Unter der Annahme, daß ungefähr

5000 IFN- $\beta$ 2/IL-6-Rezeptoren auf den Zellen vorliegen, entsprechen 0,25 ng/ml IFN- $\beta$ 2/IL-6 ungefähr 150 Molekülen des Zytokins pro Rezeptor. Der stimulierende Effekt des löslichen extrazellulären Fragments von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R beginnt sichtbar zu werden, wenn 5 bis 10000 Moleküle von löslichem, extrazellulärem Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R pro IFN- $\beta$ 2/IL-6-Rezeptor der Maus zugesetzt werden. Obwohl ein Teil des löslichen, extrazellulären Fragments von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R inaktiv sein kann, scheint dieser Effekt nicht stöchiometrisch zu sein.

**[0063]** Mehrere Linien humaner B-Zellen, transformiert mit Epstein-Barr-Virus (EBV), zeigen eine Wachstumsstimulierung durch IFN- $\beta$ 2/IL-6. In der TI-Zelllinie führte der Zusatz von löslichem, extrazellulärem Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R nicht zu einer Verstärkung der Wirkung von IFN- $\beta$ 2/IL-6, wie es bei dem Mausplasmazytom T1165 der Fall war (Tabelle IV). Tatsächlich verhielt sich mit den TI-Zellen das lösliche, extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R als ein Inhibitor der IFN- $\beta$ 2/IL-6-Wirkung bei niedrigen Konzentrationen des Zytokins.

**[0064]** In dem HGF-Aktivitätsassay wurde die Bioaktivität des IFN- $\beta$ 2/IL-6 gemessen anhand der Stimulierung des  $^3\text{H}$ -Thymidineinbaus in Plasmazytomzellen T1165 der Maus (Nordan, R. P., und Potter, M., Science (1986) 233: 566–568). Kurz ausgeführt, serielle Verdünnungen (60  $\mu\text{l}$ ) der getesteten Proben wurden mit T1165-Zellen ( $10^4$  Zellen in 40  $\mu\text{l}$ ) über Nacht bei 37°C in 96-Loch-Mikrotiterplatten inkubiert. Ein Puls von  $^3\text{H}$ -Thymidin (1  $\mu\text{Ci}$ /Vertiefung) wurde für 4 Stunden bei 37°C gesetzt. Die Zellen wurden mit einem automatischen Erntegerät geerntet und ausgezählt. Eine Einheit IFN- $\beta$ 2/IL-6 wird definiert als die Menge an Protein, die 50% des maximalen Effekts in dem Assay ergibt.

Stimulierung des Wachstums der Plasmazytomzelle T1165 der Maus

Tabelle III

IFN- $\beta$ 2/IL-6 ng/ml	IFN- $\beta$ 2/IL-6-R lösliches extrazelluläres Fragment	$^3\text{H}$ -Thymidineinbau gezählte Zerfälle pro Minute
Kein	Kein	5800
0,25	Kein	5780
"	0,03	7750
"	0,06	9100
"	0,12	10100
"	0,25	20000
"	0,50	29750
"	1,00	40400
2,5	Kein	16000
2,5	0,25	16000
5,0	Kein	32000
5,0	0,25	48000
0,25	IFN- $\gamma$ -R lösliches Fragment	6350

## Stimulierung von EBV-transformierter, humaner B-Zelllinie TI

Tabelle IV

IFN- $\beta$ 2/IL-6 ng/ml	<sup>3</sup> H-Thymidineinbau gezählte Zerfälle pro Minute x 10 <sup>3</sup>	
	Allein	+ IFN- $\beta$ 2/IL-6-R lösliches extrazelluläres Fragment
Kein	20	25
0,05	33	25
0,2	39	29
12,5	39	40
25,0	42	39

[0065] Die Konzentration des löslichen, extrazellulären Fragments von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R betrug 0,6  $\mu$ g/ml.

Beispiel 9:

Aktivität auf humane Brustkrebszellen

[0066] Humane Carcinomzellen des Brustgangs T47D werden in ihrem Wachstum gehemmt durch IFN- $\beta$ 2/IL-6. Diese Zellen sind reich an IFN- $\beta$ 2/IL-6-Rezeptorbindungsstellen, zumindest vergleichbar zu dem, was auf Lymphozyten und myeloiden Zellen gefunden wird. Eine Serie von Subklonen der T47D-Krebszellkultur wurde isoliert und hinsichtlich ihrer Wachstumshemmung durch IFN- $\beta$ 2/IL-6 verglichen. Mit mehreren Tests, der Koloniebildung von dünn ausgesäten Zellen und dem <sup>3</sup>H-Thymidineinbau in semikonfluente Monolayer, zeigte sich, daß einige Klone (z.B. 07) stärker sensitiv und andere (z.B. 012) weniger sensitiv waren als die Elternkulturen T47D. Der Effekt des löslichen, extrazellulären Fragments von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R wurde in einem <sup>3</sup>H-Thymidineinbauassay getestet, in dem IFN- $\beta$ 2/IL-6 eine dosisabhängige Hemmung erzeugt (Tabelle V).

[0067] Während der Zusatz von löslichem, extrazellulärem Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R alleine keine Wirkung zeigte, steigerte der lösliche Rezeptor den wachstumshemmenden Effekt von IFN- $\beta$ 2/IL-6 stark (Tabelle V). Im Gegensatz zu dem Befund mit den Mausplasmazytomzellen war der Effekt des löslichen, extrazellulären Fragments von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R auf die humanen Brustkrebszellen deutlich bei höheren IFN- $\beta$ 2/IL-6-Konzentrationen. Es zeigte sich nicht nur eine Verringerung in der Menge an IFN- $\beta$ 2/IL-6, das benötigt wird für 50% Hemmung, sondern die Amplitude des Effekts war deutlich erhöht. In der Anwesenheit des löslichen, extrazellulären Fragments von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R erreichte die Hemmung des <sup>3</sup>H-Thymidineinbaus 98%, während ohne das lösliche, extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R eine restliche DNA-Synthese selbst bei hohen IFN- $\beta$ 2/IL-6-Dosen beobachtet wurde.

[0068] Dieses Ergebnis legte nahe, daß das lösliche, extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R auch einen stärker resistenten Subklon, wie 012, dazu bringen kann, voll auf die Wachstumshemmung durch IFN- $\beta$ 2/IL-6 anzusprechen. Tatsächlich ermöglichte der Zusatz von löslichem, extrazellulärem Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R auch nahezu das vollständige Hemmen des <sup>3</sup>H-Thymidineinbaus in 012-Zellen (Fig. 3), und der Effekt war wiederum offensichtlich bei den höheren IFN- $\beta$ 2/IL-6-Konzentrationen.

[0069] Diese Ergebnisse zeigen, daß das lösliche, extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R auf humane Brustkrebszellen einwirkt und sowohl die Sensitivität als auch die Amplitude der Antwort steigert.

Tabelle V

IFN- $\beta$ 2/IL-6 ng/ml	<sup>3</sup> H-Thymidineinbau gezählte Zerfälle pro Minute x 10 <sup>-3</sup>	
	Allein	+ IFN- $\beta$ 2/IL-6-R lösliches extrazelluläres Fragment
Kein	100	103
br 1,5	57	32
7,5	46	12
36	37	4
180	26	2
900	12	4

[0070] Die Konzentration des löslichen, extrazellulären Fragments von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R betrug 0,6  $\mu$ g/ml.

### Patentansprüche

1. Lösliches extrazelluläres Fragment von humanem natürlichem Interferon- $\beta$ 2/Interleukin-6-Rezeptor mit der folgenden N-terminalen Aminosäuresequenz:

**Leu-Ala-Pro-Arg-Arg-Cys-Pro-Ala-Gln-Glu-Val-Ala-Arg-Gly-Val-  
Leu-Thr-Ser-Leu-Pro-Gly-Asp-Ser-Val-Thr-Leu-Thr-Cys-Pro-Gly-**

(hierin als IFN- $\beta$ 2/IL-6-R bezeichnet), Salze, funktionelle Derivate und aktive Fraktionen davon mit der N-terminalen Sequenz und Mischungen von jedem der Vorgenannten, das in der Lage ist, spezifisch IFN- $\beta$ 2/IL-6 zu binden, mit der Maßgabe, dass das extrazelluläre Fragment von IFN- $\beta$ 2/IL-6-R nicht ein Fragment ist, das aus den Aminosäuren 20 bis 323 oder 20 bis 344 von IFN- $\beta$ 2/IL-6-Rezeptor besteht.

2. Humanes IFN- $\beta$ 2/IL-6-R lösliches extrazelluläres Fragment nach Anspruch 1 in im wesentlichen gereinigter Form.

3. Humanes IFN- $\beta$ 2/IL-6-R lösliches extrazelluläres Fragment nach Anspruch 2 mit einem Molekulargewicht von ungefähr 50 kD, wenn das im wesentlichen gereinigte Protein durch SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen analysiert wird.

4. Humanes IFN- $\beta$ 2/IL-6-R lösliches extrazelluläres Fragment nach einem der Ansprüche 2 bis 3, das als einzelner Peak auf Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) wandert.

5. Verfahren für die Herstellung des im wesentlichen gereinigten IFN- $\beta$ 2/IL-6-R löslichen extrazellulären Fragments nach Anspruch 1, welches umfaßt:

- (a) Gewinnen der rohen Proteinfraction aus einem dialysierten Konzentrat von menschlichem Urin;
- (b) Unterziehen der rohen Proteinfraction aus Schritt (a) einer Affinitätschromatographie auf einer Säule von immobilisiertem IFN- $\beta$ 2/IL-6;
- (c) Auftragen der gereinigten aktiven Fraktionen der IFN- $\beta$ 2/IL-6-Bindungsproteine aus Schritt (b) auf Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC); und
- (d) Gewinnen der Fraktionen, die bei 39% Acetonitril eluieren und die im wesentlichen gereinigtes IFN- $\beta$ 2/IL-6-R lösliches extrazelluläres Fragment enthalten, wobei das Protein ein Molekulargewicht von ungefähr 50 kD auf SDS PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen besitzt und als einzelner Peak auf Umkehrphasen-HPLC wandert.

6. Verfahren nach Anspruch 5, worin die rohe Proteinfraction aus Schritt (a) einer Ionenaustauschchromatographie vor der Affinitätschromatographie aus Schritt (b) unterzogen wird.

7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, worin die Affinitätschromatographie aus Schritt (b) auf einer Säule mit monoclonalem Anti-IFN- $\beta$ 2/IL-6-R-Antikörper durchgeführt wird.

8. IFN- $\beta$ 2/IL-6-R lösliches extrazelluläres Fragment nach Anspruch 1, welches ein rekombinantes Protein ist oder ein rekombinantes Protein, das im wesentlichen homolog damit ist.
9. DNA-Molekül mit der Nukleotidsequenz, die für das IFN- $\beta$ 2/IL-6-R lösliche extrazelluläre Fragment aus einem der Ansprüche 1 bis 4 oder 8 oder für ein im wesentlichen damit homologes Protein codiert, mit der Maßgabe, dass die Nukleotidsequenz nicht ein Interferon-I- $\beta$ 2/Interleukin-6-R-Fragment codiert, das aus den Aminosäuren 1 bis 323 oder den Aminosäuren 1 bis 344 besteht.
10. Replizierbares Expressionsvehikel, umfassend das DNA-Molekül nach Anspruch 9 und das in der Lage ist, das IFN- $\beta$ 2/IL-6-R lösliche extrazelluläre Fragment, wie in einem der Ansprüche 1 bis 4 oder 8 definiert, in einer Transformanten-Wirtszelle zu exprimieren.
11. Wirtszelle, ausgewählt aus einer prokaryotischen und einer eukaryotischen Zelle, transformiert mit einem replizierbaren Expressionsvehikel nach Anspruch 10.
12. Verfahren zum Herstellen des IFN- $\beta$ 2/IL-6-R löslichen extrazellulären Fragments nach Anspruch 1, umfassend die Schritte: (a) Kultivieren einer Transformanten-Wirtszelle nach Anspruch 11 in einem geeigneten Kulturmedium, und (b) Isolieren des IFN- $\beta$ 2/IL-6-R löslichen extrazellulären Fragments.
13. Verfahren zum Herstellen eines Antikörpers gegen das IFN- $\beta$ 2/IL-6-R lösliche extrazelluläre Fragment umfassend die Immunisierung eines Tieres unter Verwendung des löslichen extrazellulären Fragments nach Anspruch 1.
14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei das Verfahren außerdem die Herstellung von Hybridomen gemäß der herkömmlichen Hybridomtechnik umfasst.
15. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend als Wirkstoff ein lösliches extrazelluläres Fragment von humanem natürlichem IFN- $\beta$ 2/IL-6-R, Salze, funktionelle Derivate, aktive Fraktionen davon, oder Mischungen aus den Vorgenannten wie in Anspruch 1 beansprucht, humanes IFN- $\beta$ 2/IL-6 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger.
16. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 15, umfassend das humane IFN- $\beta$ 2/IL-6-R lösliche extrazelluläre Fragment als Wirkstoff.
17. Verwendung des Fragments nach den Ansprüchen 1 bis 4 in Verbindung mit humanem IFN- $\beta$ 2/IL-6 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Brustkrebs.
18. Verwendung des Fragments nach den Ansprüchen 1 bis 4 zur Herstellung eines Medikaments zum Stimulieren und Verstärken vorteilhafter Wirkungen von IFN- $\beta$ 2/IL-6, wie seiner antiproliferativen Aktivität.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

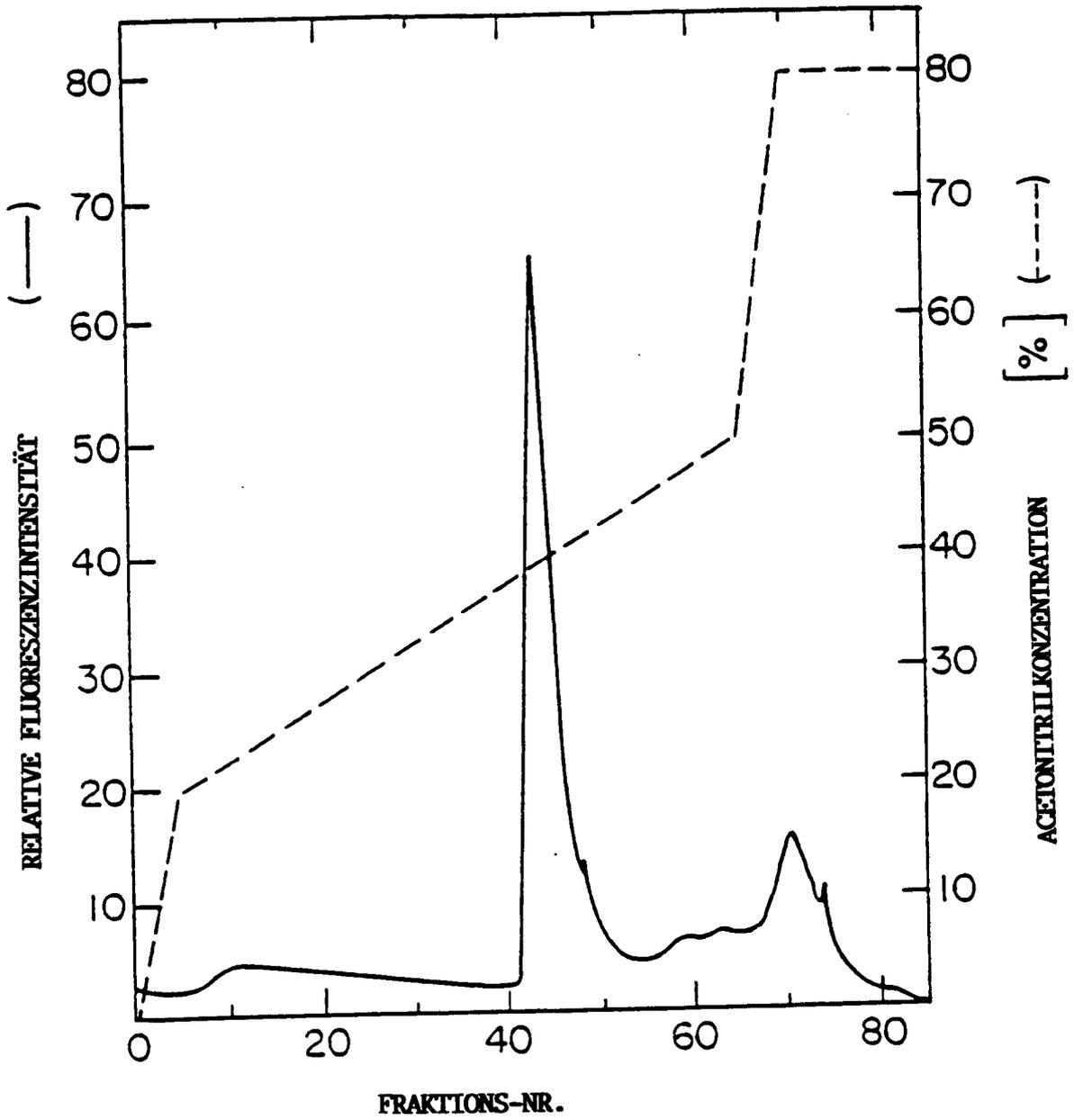


Fig. 1

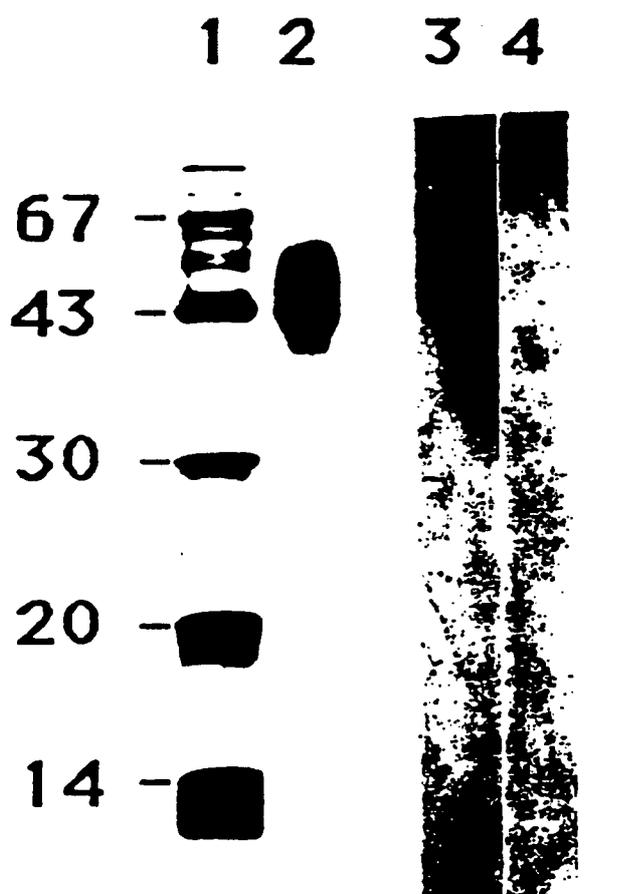


Fig. 2

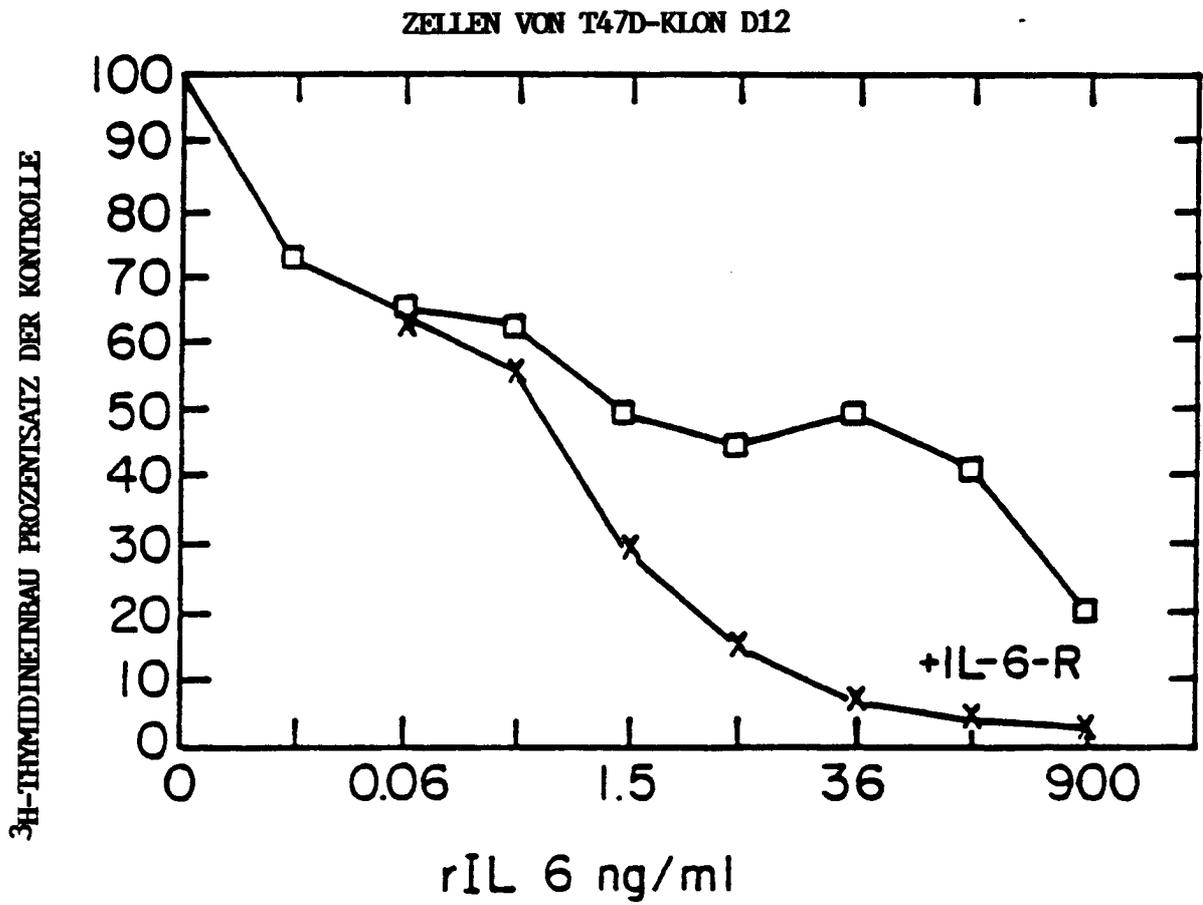


Fig. 3