

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02807784.9

[51] Int. Cl.

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 11 月 25 日

[11] 授权公告号 CN 100562339C

[22] 申请日 2002.4.2 [21] 申请号 02807784.9

[30] 优先权

[32] 2001.4.2 [33] JP [31] 103627/2001

[32] 2001.4.6 [33] JP [31] 109131/2001

[86] 国际申请 PCT/JP2002/003312 2002.4.2

[87] 国际公布 WO2002/080969 日 2002.10.17

[85] 进入国家阶段日期 2003.9.30

[73] 专利权人 中外制药株式会社

地址 日本东京都

[72] 发明人 吉崎和幸 西本宪弘 岩本雅弘

簗田清次 横田俊平 宫前多佳子

[56] 参考文献

WO9813383A1 1998.4.2

US5888510A 1999.3.30

WO9618648A1 1996.6.20

WO9948523A2 1999.9.30

审查员 曹 维

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 段承恩 黄革生

权利要求书 3 页 说明书 28 页

[54] 发明名称

小儿慢性关节炎相关疾病治疗剂

[57] 摘要

一种小儿慢性关节炎相关疾病，如小儿慢性关节炎，斯提尔氏病等的治疗剂，以白细胞介素-6 (IL-6) 拮抗剂为有效成分。

1. 使用白细胞介素-6 即 IL-6 拮抗剂制备小儿慢性关节炎的治疗剂的用途。

2. 如权利要求 1 所述的用途, 其特征在于, IL-6 拮抗剂是对 IL-6 受体的抗体。

3. 如权利要求 2 所述的用途, 其特征在于, 对 IL-6 受体的抗体是对 IL-6 受体的单克隆抗体。

4. 如权利要求 3 所述的用途, 其特征在于, 对 IL-6 受体的抗体是对人 IL-6 受体的单克隆抗体。

5. 如权利要求 3 所述的用途, 其特征在于, 对 IL-6 受体的抗体是对小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体。

6. 如权利要求 2 所述的用途, 其特征在于, 对 IL-6 受体的抗体是重组抗体。

7. 如权利要求 4 所述的用途, 其特征在于, 对人 IL-6 受体的单克隆抗体是 PM-1 抗体。

8. 如权利要求 5 所述的用途, 其特征在于, 对小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体是 MR16-1 抗体。

9. 如权利要求 2 所述的用途, 其特征在于, 对 IL-6 受体的抗体是对 IL-6 受体的嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

10. 如权利要求 9 所述的用途, 其特征在于, 对 IL-6 受体的人源化抗体是人源化的 PM-1 抗体。

11. 如权利要求 1~10 的任一项所述的用途, 其中上述小儿慢性关节炎是 ARA 分类中的全身型、多关节炎型或少关节炎型。

12. 如权利要求 11 所述的用途, 其中上述小儿慢性关节炎是 ARA 分类中的全身型或多关节炎型。

13. 如权利要求 1~10 的任一项所述的用途, 其中上述小儿慢性关节

炎是 EULAR 分类中的全身型、多关节炎型或少关节炎型。

14. 如权利要求 13 所述的用途，其中上述小儿慢性关节炎是 EULAR 分类中的全身型或多关节炎型。

15. 如权利要求 1~10 的任一项所述的用途，其中上述小儿慢性关节炎是 ILAR 分类中的全身型、RF 阳性型多关节炎型、RF 阴性型多关节炎型、少关节炎型或发展型少关节炎型。

16. 如权利要求 15 所述的用途，其中上述小儿慢性关节炎是 ILAR 分类中的全身型、RF 阳性型多关节炎型、RF 阴性型多关节炎型或发展型少关节炎型。

17. 如权利要求 16 所述的用途，其中上述小儿慢性关节炎是 ILAR 分类中的全身型、RF 阳性型多关节炎型或发展型少关节炎型。

18. 使用白细胞介素-6 即 IL-6 拮抗剂制备斯提尔氏病治疗剂的用途。

19. 如权利要求 18 所述的用途，其特征在于，IL-6 拮抗剂是对于 IL-6 受体的抗体。

20. 如权利要求 19 所述的用途，其特征在于，对于 IL-6 受体的抗体是对于 IL-6 受体的单克隆抗体。

21. 如权利要求 20 所述的用途，其特征在于，对 IL-6 受体的抗体是对人 IL-6 受体的单克隆抗体。

22. 如权利要求 20 所述的用途，其特征在于，对 IL-6 受体的抗体是对小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体。

23. 如权利要求 19 所述的用途，其特征在于，对 IL-6 受体的抗体是重组抗体。

24. 如权利要求 21 所述的用途，其特征在于，对人 IL-6 受体的单克隆抗体是 PM-1 抗体。

25. 如权利要求 22 中所述的用途，其特征在于，对小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体是 MR16-1 抗体。

26. 如权利要求 19 所述的用途，其特征在于，对 IL-6 受体的抗体是对 IL-6 受体的嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

27. 如权利要求 26 所述的用途, 其特征在于, 对 IL-6 受体的人源化抗体是人源化的 PM-1 抗体。

28. 如权利要求 18 所述的用途, 其特征在于, 斯提尔氏病是成人斯提尔氏病。

29. 如权利要求 18~27 的任一项所述的用途, 其特征在于, 斯提尔氏病是小儿的斯提尔氏病。

小儿慢性关节炎相关疾病治疗剂

发明所属技术领域

本发明涉及一种小儿慢性关节炎相关疾病治疗剂，其含有白细胞介素-6(IL-6)的拮抗剂作为有效成分。小儿慢性关节炎相关疾病包括小儿慢性关节炎，斯提尔氏病等。

背景技术

IL-6 是被称为 B 细胞刺激因子 2 (BSF2) 或干扰素 β 2 的细胞因子。IL-6 作为与 B 淋巴细胞系细胞的活化相关的分化因子被发现(Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73 - 76)，之后，已明确 IL-6 为对各种细胞的功能有影响的多功能细胞因子(Akira, S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1 - 78)。有报告指出，IL-6 是诱导 T 淋巴细胞系细胞的成熟化的因子(Lotz, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253 - 1258)。

IL-6 在细胞上通过两种蛋白质传递其生物学活性。其一是，IL-6 结合的分子量约 80kD 的配体结合性蛋白质的 IL-6 受体(Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967 - 981, Yamasaki, K. et al., Science (1987) 241, 825 - 828)。IL-6 受体除了跨细胞膜在细胞膜上表达的膜结合型外，主要也作为从其细胞外区域形成的可溶性 IL-6 受体存在。

另一个是与非配体结合性的信号传递有关的分子量约 130kD 的膜蛋白质 gp130。IL-6 和 IL-6 受体通过形成 IL-6/IL-6 受体复合体、然后和 gp130 结合，使 IL-6 的生物学活性被传递入细胞内(Taga, T. et al., Cell (1989) 58, 573 - 581)。

IL-6 拮抗剂为阻碍 IL-6 的生物学活性传递的物质。到目前为止，已知对于 IL-6 的抗体(抗 IL-6 抗体)、对于 IL-6 受体的抗体(抗 IL-6 受体抗

体)、对于 gp130 的抗体(抗 gp130 抗体)、IL-6 变异体、IL-6 或 IL-6 受体部分肽等。

关于抗 IL-6 受体抗体,有很多报告(Novick, D. et al., Hybridoma (1991) 10, 137-146、Huang, Y. W. et al., Hybridoma (1993) 12, 621-630、国际专利申请公开号 WO 95-09873、法国专利申请公开号 FR 2694767、美国专利号 US 521628)。已知其中之一是通过将小鼠抗体 PM-1 (Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906) 的互补决定区(CDR)向人抗体移植得到的人源化 PM-1 抗体(国际专利申请公开号 WO 92-19759)。

小儿慢性关节炎(Chronic Arthritides Diseases of Childhood)是以未满 16 岁发生的慢性关节炎疾病为主的疾病,且是在小儿中发生的胶原性疾病中最多的疾病。由于与成人的慢性风湿关节病(Rheumatoid Arthritis (RA))有区别,不能说是类似的疾病,有各种各样的病型,因此有将其作为与成人的慢性风湿关节病不同的疾病进行处理的倾向。

作为小儿慢性关节炎的名称,在日本是按照美国的诊断基准使用“幼儿型类风湿关节炎 Juvenile Rheumatoid Arthritis (JRA)”,但在欧洲则主要使用幼儿慢性关节炎 Juvenile Chronic Arthritis (JCA)。最近也使用自发性慢性关节炎 Idiopathic Chronic Arthritis (ICA) 或是幼儿自发性关节炎 Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA) 等。

小儿慢性关节炎的类型被分成几类,美国风湿病学协会(American College of Rheumatology (ACR))将在未满 16 岁的小儿中发生的持续 6 周或以上的关节炎疾病的分为:1)全身型(Systemic onset JRA)、2)多关节炎型(Polyarticular)、3)少关节炎型(Pauciarticular)三种(ARA 分类)(JRA Criteria Subcommittee of the Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association Arthritis Rheum 20(Suppl)195, 1977)。另外在欧洲,European League Against Rheumatism (EULAR)虽然在关节炎的持续时间在三个月或以上这一点,或由于牛皮癣、强直性脊椎炎等原因引起的关节炎除外这一点等

与上述 ARA 分类不同，但进行了同样三种病型的分类。（Bulletin 4, Nomenclature and classification of Arthritis in Children. Basel, National Zeitung AG, 1977）。

最近，有重新认识这种分类的倾向，International League of Association for Rheumatology (ILAR) 在 1995 年提出小儿自发性关节炎 (Idiopathic Arthritides of Childhood) 的分类提案 (Fink CW, Proposal for the development of classification criteria for idiopathic arthritides of childhood. J. Rheumatol., vol.22 1566(1995))，进一步在 1997 年将对其的修改作为 ILAR 案提案 (Southwood TR, Classifying childhood arthritis. Ann. Rheum. Dis. Vol.56, 79 (1997))。这种分类中分为 1) 全身型关节炎 (Systemic Arthritides)、2) 多关节炎型 (RF 阳性型) (Polyarthritis RF positive)、3) 多关节炎型 (RF 阴性型) (Polyarthritis RF negative)、4) 少关节炎型 (Oligoarthritis)、5) 发展型少关节炎型 (Extended oligoarthritis)、6) 附着部炎症相关关节炎 (Enthesitis related Arthritis)、7) 牛皮癣相关关节炎 (Psoriatic Arthritis)、8) 其他。

进一步本发明者们提案将小儿慢性关节炎分为

1) 小儿原发性慢性关节炎 (Primary Chronic Arthritides of Childhood)

(1) PARASH 综合征 (SPRASH syndrome) (SPRASH: 高热 (spiking fever), 心包炎 (pericarditis), 皮疹 (rash), 关节炎 (arthritis), 脾(肿)大 (splenomegaly), 肝肿大 (hepatomegaly))。

首先出现弛张热和皮疹症状、诊断有浆膜炎、肝脾肿大症状，同时或延迟并发关节炎，但有时未诊断是关节炎。

(2) 小儿自发性慢性关节炎 (Idiopathic Chronic Arthritides of Childhood)

没有基础病患，关节炎即是病患的中心。

a) 类风湿病因子 (RF) 阳性型

b) 抗核抗体 (ANA) 阳性型

c) RF/ANA 阴性型

2) 小儿继发性慢性关节炎 (Secondary Chronic Arthritides of Childhood)

伴随遗传性，非遗传性的原疾病表现的关节炎（横田俊平，“小児慢性関節炎の最近の治療法の進歩”、リウマチ、39巻、860、（1999））。

有报道指出小儿慢性关节炎与各种细胞因子有关。特别是，认为炎症细胞因子 IL-1、IL-6、IL-12、TNF- α 与抗炎症细胞因子 IL-1 ra (IL-1 受体 - 拮抗剂)、IL-10、IL-13、sTNFR(可溶性 TNF 受体)的不平衡与疾病相关。

作为小儿慢性关节炎的治疗，以往使用非甾体抗炎药、肾上腺皮质激素药、抗风湿药（金剂等）、免疫抑制剂、氨甲蝶呤（MTX 等）治疗。但是不同患者其治疗效果不一定，所以希望开发出更有效的治疗方法。

斯提尔氏病 (Still disease)，是 1897 年英国的小儿科医生斯提尔报道的，该疾病是作为与成人的慢性风湿关节病具有明显不同的临床症状的疾病被报道的在小儿到成人（成人主要是青年期）中发病的疾病，主要症状为发热、红斑、关节炎、浆膜炎等。其中将成人病例称为成人斯提尔氏病 (Adult onset Still's disease)，在斯提尔氏病中，类风湿病因子通常是阴性的。

斯提尔氏病，在小儿中，是在未满 16 岁的小儿中发生的慢性关节炎的幼年性风湿疾病 (Juvenile Rheumatoid Arthritis (JRA), JCA(Juvenile Chronic Arthritis), Juvenile Idiopathic Arthritis (JIA)) 中的全身发症型 (Systemic Type) 的别名。斯提尔氏病的病因，虽然有关于病毒等的环境要因或 HLA 等的宿主要因或免疫异常等的报道，但是现在还不十分清楚。

成人斯提尔氏病与小儿斯提尔氏病虽然除了发病年龄不同外还有某些临床症状不同，但基本可认为是同种疾病。小儿斯提尔氏病指的是上述的全身发病型的 JRA，但由于 JRA 在临床上与成人的风湿关节疾病 (Rheumatoid Arthritis, (RA)) 有很多地方不同，因此作为别的疾病治疗，也由于同样原因，成人的斯提尔氏病大多作为风湿性疾病中独立的

疾病单位被处理。

作为斯提尔氏病的诊断标准, 已知有 Yamaguchi (Journal of Rheumatology. 19(3):424-30, 1992)、Reginato(Seminars in Arthritis & Rheumatism. 17(1)39-57, 1987)、Cush(Rheumatology Grand Rounds, University of Pittsburgh Medical Center: Jan.30, 1984) 、Goldman(Southern Medical Journal 73:555-563, 1980)等标准。

关于斯提尔氏病与细胞因子的关系, 曾报道了 IL-1、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、TNF- α 、IFN- γ 等细胞因子与斯提尔氏病的关系, 认为其中的 IL-1、IL-6 、TNF- α 、IFN- γ 等炎症性细胞因子与斯提尔氏病的病态有某些关联。

关于 IL-6, de Benedetti 等人报告指出在小儿斯提尔氏病中, 血清中 IL-6 值上升 (Arthritis Rheum. Vol.34, 1158,1991), 同样据 de Benedetti 等人报道, 小儿斯提尔氏病患者的血清中存在大量 IL-6/可溶性 IL-6 受体 (sIL-6R) 复合体, 可看到这种复合体的水平与 CRP 值有相关关系 (J.Clin. Invest. Vol.93, 2114, 1994)。另外 Rooney 等人也作了在小儿斯提尔氏患者的血浆中 IL-6 与 TNF- α 的水平上升的报道 (Br J Rheumatol. Vol.34 454, 1995)。

作为斯提尔氏病的治疗, 以往用非甾体抗炎药、肾上腺皮质甾体药、抗风湿药 (金剂等)、免疫抑制剂、 γ 球蛋白制剂、氨甲蝶呤 (MTX 等)。但是由于患者不同其治疗效果不一定, 因此希望开发出更有效的治疗方法。

发明的公开

因此本发明是要提供一种与以往的小儿慢性关节炎相关疾病治疗剂不同形式的新的儿童慢性关节炎相关疾病的治疗剂。在本发明中, 儿童慢性关节炎相关疾病包括儿童慢性关节炎以及斯提尔氏病。

本发明者们为了解决上述课题, 进行了各种研究, 结果发现白细胞介素-6(IL-6)的拮抗剂对儿童慢性关节炎相关疾病有治疗效果, 并完成了发明。

因此本发明提供一种含有白细胞介素-6(IL-6)拮抗剂作为有效成分构成的小儿慢性关节炎相关疾病治疗剂。

更具体地说,本发明提供一种含有白细胞介素-6(IL-6)拮抗剂作为有效成分的小儿慢性关节炎治疗剂。

本发明进一步提供一种含有白细胞介素-6(IL-6)拮抗剂作为有效成分的斯提尔氏病治疗剂。

发明的实施方案

上述 IL-6 拮抗剂优选是对于 IL-6 受体的抗体,也优选是对于人 IL-6 受体的单克隆抗体或对于小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体。作为上述对于人 IL-6 受体的单克隆抗体可以列举 PM-1 抗体,另外,作为对于小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体可以列举 MR16-1 抗体。

上述的抗体优选嵌合抗体,人源化抗体或是人抗体,例如:有人源化 PM-1 抗体。

作为本发明治疗剂治疗对象的小儿慢性关节炎,包括前所述的 ARA、EULAR、ILAR 以及发明者们所分类的所有疾病。随着血清学诊断法和治疗方法的进步,现在关于小儿慢性关节炎的疾病类型分类在世界范围内已被重新认识,可以说正处于“病型分类的混乱期”,但是作为本发明治疗剂的优选治疗对象,有 ARA 分类中的全身型、多关节炎型、少关节炎型, EULAR 分类中的全身型、多关节炎型、少关节炎型, ILAR 分类中的全身型、多关节炎型(RF 阳性)、多关节炎型(RF 阴性)、少关节炎型、发展型少关节炎型,在本发明者们的分类中的小儿原发性慢性关节炎 (SPRASH 综合征、小儿自发性慢性关节炎(a. 类风湿病因子(RF)阳性型, b.抗核抗体(ANA)阳性型, c. RF/ANA 阴性型));作为特别优选的治疗对象,是 ARA 分类中的全身型、多关节炎型, EULAR 分类中的全身型、多关节炎型, ILAR 分类中的全身型、多关节炎型(RF 阳性)、多关节炎型(RF 阴性)、发展型少关节炎型,本发明者们的分类中的小儿原发性慢性关节炎 (SPRASH 综合征、小儿自发性慢性关节炎(a.类风湿

病因因子 (RF) 阳性型、b. 抗核抗体 (ANA) 阳性型)。进一步, 作为最优选的治疗对象, 可列举 ARA 分类中的全身型、多关节炎型, EULAR 分类中的全身型、多关节炎型, ILAR 分类中的全身型、多关节炎型 (RF 阳性)、发展型少关节炎型, 本发明者们的分类中的小儿原发性慢性关节炎 (SPRASH 综合征、小儿自发性慢性关节炎 (a. 类风湿病因因子 (RF) 阳性型))。

在本发明使用的 IL-6 拮抗剂, 若为对小儿慢性关节炎相关疾病显示出治疗效果, 则不论其由来、种类和形状。

IL-6 拮抗剂为隔断 IL-6 产生的信号传递、阻碍 IL-6 的生物学活性的物质。IL-6 拮抗剂优选为对 IL-6、IL-6 受体及 gp130 的任一个的结合具有阻碍作用的物质。作为 IL-6 拮抗剂, 可以列举例如抗 IL-6 抗体、抗 IL-6 受体抗体、抗 gp130 抗体、IL-6 变异体、可溶性 IL-6 受体变异体或者 IL-6 或 IL-6 受体的部分肽、以及和它们显示相同活性的低分子物质。

本发明中使用的抗 IL-6 抗体, 可以使用公知的手段作为多克隆或单克隆抗体得到。作为本发明中使用的抗 IL-6 抗体, 特别优选来自哺乳动物的单克隆抗体。作为来自哺乳动物的单克隆抗体, 有产生于杂交瘤中的抗体、以及通过基因工程的手段产生于用含有抗体基因的表达型载体转化的宿主中的抗体。该抗体通过与 IL-6 结合, 阻碍 IL-6 与 IL-6 受体结合、阻断 IL-6 的生物学活性向细胞内传递。

作为这种抗体, 可以列举 MH166 (Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956) 或 SK2 抗体 (Sato, K. et al., 第 21 次 日本免疫学会总会、学术纪录 (1991) 21, 166) 等。

产生抗 IL-6 抗体的杂交瘤, 基本可以使用公知技术、如下所述进行制备。即, 使用 IL-6 作为致敏抗原、将其按照通常的免疫方法进行免疫, 得到的免疫细胞按照通常的细胞融合法和已知的亲代细胞融合, 通过通常的筛选法, 可以通过筛选单克隆的抗体产生细胞来制备。

具体地, 制备抗 IL-6 抗体可按下面的方法进行。例如, 作为取得抗体的致敏抗原被使用的人 IL-6 可以通过使用 Eur. J. Biochem (1987) 168,

543 - 550、J. Immunol.(1988)140, 1534 - 1541、或 Agr. Biol. Chem.(1990) 54, 2685 - 2688 中公开的 IL-6 基因/氨基酸序列得到。

在公知的表达型载体系中插入 IL-6 的基因序列、使适当的宿主细胞转化后,用公知的方法纯化来自该宿主细胞中或培养上清液中的目的 IL-6 蛋白质,可将该纯化 IL-6 蛋白质作为致敏抗原使用。另外,也可以将 IL-6 蛋白质与其它蛋白质的融合蛋白质作为致敏抗原使用。

本发明中使用的抗 IL-6 受体抗体,可以使用公知的手段作为多克隆抗体或单克隆抗体得到。作为本发明中使用的抗 IL-6 受体抗体,特别优选来自哺乳动物的单克隆抗体。作为来自哺乳动物的单克隆抗体,有产生于杂交瘤中的物质、和通过基因工程的手段,产生于用含有抗体基因的表达型载体转化的宿主中的物质。该抗体通过与 IL-6 受体结合,阻碍 IL-6 与 IL-6 受体结合、阻断 IL-6 的生物学活性向细胞内传递。

作为这种抗体,可以列举 MR16-1 抗体 (Tamura, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924 - 11928)、PM-1 抗体 (Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900 - 2906)、AUK12-20 抗体、AUK64-7 抗体或 AUK146-15 抗体 (国际专利申请公开号 WO 92-19759) 等。其中,作为特别优选的抗体可以列举 PM-1 抗体。

另外,产生 PM-1 抗体的杂交瘤细胞株作为 PM-1,基于布达佩斯条约,在平成 2 年 7 月 10 日、作为 FERM BP-2998 被国际保藏在工业技术院生命工学工业技术研究所 (茨城县つくば市东 1 丁目 1 番 3 号)。另外,产生 MR16-1 抗体的杂交瘤细胞株作为大鼠-小鼠杂交瘤 MR16-1,基于布达佩斯条约,在平成 3 年 3 月 13 日、作为 FERM BP-5875 被国际保藏在工业技术院生命工学工业技术研究所 (茨城县つくば市东 1 丁目 1 番 3 号)。

产生抗 IL-6 受体单克隆抗体的杂交瘤,基本可以使用已知技术、如下进行制备。即,使用 IL-6 受体作为致敏抗原、将其按照通常的免疫方法进行免疫,得到的免疫细胞按照通常的细胞融合法和已知的亲代细胞融合,通过通常的筛选法,可以通过筛选单克隆抗体的产生细胞来制备。

具体地说,制备抗 IL-6 受体抗体可按下面的方法进行。例如,作为引

起抗体的致敏抗原被使用的人 IL-6 受体可以通过使用在欧洲专利申请公开号 EP 325474 中公开的、小鼠 IL-6 受体可以通过使用在日本专利申请公开号特开平 3-155795 中公开的 IL-6 受体基因/氨基酸序列来得到。

IL-6 受体蛋白质,有在细胞膜上表达的蛋白质和从细胞膜脱离的蛋白质(可溶性 IL-6 受体)(Yasukawa, K. et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676)两种。可溶性 IL-6 受体蛋白质是由与细胞膜结合的 IL-6 受体的实质性细胞外区域构成的,在缺损跨细胞膜区域或跨细胞膜区域和细胞内区域方面与膜结合型 IL-6 受体不同。IL-6 受体蛋白质只要是在本发明中使用的抗 IL-6 受体抗体的制备中作为致敏抗原使用,就可以使用任一种 IL-6 受体。

在公知的表达型载体系中插入 IL-6 受体的基因序列、使适当的宿主细胞转化后,用已知的方法纯化来自该宿主细胞中或培养上清液中的目的 IL-6 受体蛋白质,可将该纯化 IL-6 受体蛋白质作为致敏抗原使用。另外,也可以将表达 IL-6 受体的细胞或 IL-6 受体蛋白质和其它蛋白质的融合蛋白质作为致敏抗原使用。

含有含编码人 IL-6 受体的 cDNA 的质粒 pIBIBSF2R 的大肠杆菌(E. coli),基于布达佩斯条约,在 1989 年 1 月 9 日、作为 HB101-pIBIBSF2R,保藏号 FERM BP-2232 被国际保藏在工业技术院生命工学工业技术研究所。

本发明中使用的抗 gp130 抗体,可以使用公知的手段作为多克隆或单克隆抗体得到。作为本发明中使用的抗 gp130 抗体,特别优选来自哺乳动物的单克隆抗体。作为来自哺乳动物的单克隆抗体,有产生于杂交瘤中的抗体、和通过基因工程的手段产生于用含有抗体基因的表达型载体转化的宿主中的抗体。该抗体通过和 gp130 结合,阻碍 IL-6/IL-6 受体复合体与 gp130 结合、并阻断 IL-6 的生物学活性向细胞内传递。

作为这种抗体,可以列举 AM64 抗体(特开平 3-219894)、4B11 抗体和 2H4 抗体(US 5571513) B-S12 抗体以及 B-P8 抗体(特开平 8-291199)等。

产生抗 gp130 单克隆抗体的杂交瘤，基本可以使用公知技术、如下所述进行制备。即，使用 gp130 作为致敏抗原、将其按照通常的免疫方法进行免疫，得到的免疫细胞通过通常的细胞融合法和公知的亲代细胞融合，通过通常的筛选法，可以通过筛选单克隆抗体的产生细胞来制备。

具体地，制备单克隆抗体可按下面的方法进行。例如，作为引起抗体的致敏抗原被使用的 gp130 可以使用在欧洲专利申请公开号 EP 411946 中公开的 gp130 基因/氨基酸序列来得到。

在已知的表达型载体系统中插入 gp130 的基因序列、使适当的宿主细胞转化后，用已知的方法纯化来自该宿主细胞中或培养上清液中的目的 gp130 蛋白质，可将该纯化 gp130 受体蛋白质作为致敏抗原使用。另外，也可以将表达 gp130 的细胞或 gp130 蛋白质和其它蛋白质的融合蛋白质作为致敏抗原使用。

作为用致敏抗原免疫的哺乳动物，虽没有特别的限制，但是优选考虑与在细胞融合中使用的亲代细胞的相容性来进行选择，一般地可以使用啮齿类动物，例如小鼠、大鼠、仓鼠等。

用致敏抗原免疫动物时可以按已知的方法进行。例如，作为一般的方法，通过在哺乳动物的腹腔内或皮下注射致敏抗原进行。具体地说，用适量的 PBS（磷酸盐缓冲生理盐水）或生理盐水等稀释致敏抗原、悬浊液根据需要混合通常的佐剂，例如弗氏完全佐剂，乳化后，优选每 4-21 日向哺乳动物给药数次。另外，致敏抗原免疫时也可以使用适当的载体。

这样进行免疫、确认血清中所期望的抗体水平上升后，从哺乳动物中取出免疫细胞、进行细胞融合。作为进行细胞融合的优选的免疫细胞，特别可以列举脾细胞。

作为和上述免疫细胞融合的另一亲代细胞的哺乳动物骨髓瘤细胞，适宜使用以前、已知的各种细胞株，例如 P3X63Ag8.653 (Kearney, J. F. et al. J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies.

D. H. et al., Cell (1976) 8, 405 - 415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269 - 270)、F0 (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1 - 21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313 - 323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131 - 133) 等。

上述免疫细胞和骨髓瘤细胞的细胞融合基本可以按照已知的方法、例如 Milstein 等的方法 (Kohler, G. and Milstein, C.、Methods Enzymol. (1981) 73, 3 - 46) 等进行。

更具体地说, 上述细胞融合例如可在细胞融合促进剂存在下, 在通常的营养培养液中进行。作为融合促进剂, 可使用例如聚乙二醇 (PEG)、日本血细胞凝集病毒 (HVJ) 等, 进一步, 根据需要, 为了提高融合效率, 也可以添加二甲基亚砷等的辅助溶剂来使用。

免疫细胞和骨髓瘤细胞的使用比例, 例如, 相对于骨髓瘤细胞、免疫细胞优选为 1 - 10 倍。作为上述细胞融合中使用的培养液, 例如, 可以使用在上述骨髓瘤细胞株的增殖中适合的 RPMI1640 培养液、MEM 培养液, 除此之外, 还可使用在该种细胞培养中可使用的通常的培养液, 进一步, 也可能并用胎牛血清 (FCS) 等的血清补液。

细胞融合是将上述免疫细胞和骨髓瘤细胞的规定量在上述培养液中充分混合, 通常在 30 - 60% (w/v) 的浓度下添加预先加热至 37℃ 左右的 PEG 溶液、例如平均分子量为 1000 - 6000 左右的 PEG 溶液, 通过混合形成目的融合细胞 (杂交瘤)。然后, 通过反复进行依次添加适当的培养液, 离心除去上清液的操作、可以除去杂交瘤的繁殖中不优选的细胞融合剂等。

该杂交瘤通过在通常的选择培养液、例如 HAT 培养液 (含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的培养液) 中培养来进行选择。在该 HAT 培养液中的培养, 持续使目的杂交瘤以外的细胞 (非融合细胞) 灭绝所需的充分的时间、通常要持续数日 - 数周。然后, 实施通常的极限稀释法、进行产生目的抗体的杂交瘤的筛选和克隆。

另外, 除了在人以外的动物中免疫抗原得到上述杂交瘤以外, 将人淋巴细胞在体外被所期望的抗原蛋白质或抗原表达细胞致敏、使致敏 B 淋巴

细胞和人骨髓瘤细胞、例如 U266 融合,也可以得到对期望的抗原或抗原表达细胞具有结合活性的所期望的人抗体(参照特公平 1-59878)。进一步,也可以对具有人抗体基因储藏库的转基因动物给与抗原或抗原表达细胞,按上述方法得到所期望的人抗体(参照国际专利申请公开号 WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 94/25585、WO 96/34096、WO 96/33735)。

产生这样制备的单克隆抗体的杂交瘤,可在通常的培养液中传代培养,另外,也可在液氮中长期保存。

从该杂交瘤取得单克隆抗体时,可以采用将该杂交瘤用通常的方法培养、得到其培养上清液的方法,或将杂交瘤投入与其有相容性的哺乳动物中使其增殖、得到其腹水的方法等。前者的方法适于得到高纯度的抗体,另一方面,后者的方法适于抗体的大量生产。

例如,产生抗 IL-6 受体抗体的杂交瘤的制备,可以按照特开平 3-139293 中公开的方法进行。可以进行将基于布达佩斯条约,在平成 2 年年 7 月 10 日、作为 FERM BP-2998 被国际保藏在工业技术院生命工学工业技术研究所(茨城县つくば市东 1 丁目 1 番 3 号)的产生 PM-1 抗体的杂交瘤注入 BALB/c 小鼠的腹腔内、得到腹水,从该腹水纯化 PM-1 抗体的方法,或将该杂交瘤在适当的培养基中、例如 10%胎牛血清、含有 5% BM-Condimed H1 (Boehringer Mannheim 制) RPMI1640 培养基、杂交瘤 SFM 培养基 (GIBCO-BRL 制)、PFHM-II 培养基 (GIBCO-BRL 制) 等中培养,由该培养上清液纯化 PM-1 抗体的方法。

本发明中,作为单克隆抗体,可以使用基因重组技术,由杂交瘤克隆抗体基因,将其整合入适当的载体,然后将载体导入宿主中而产生的重组型抗体(例如,参照 Borrebaeck C. A. K. and Larrick J. W. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD,1990)。

具体地,产生目的抗体的细胞,例如由杂交瘤分离编码抗体的可变(V)区域的 mRNA。mRNA 的分离可以按照公知的方法,例如脲超离心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294 - 5299)、AGPC

法 (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156 - 159) 等制备总 RNA, 使用 mRNA 纯化试剂盒 (Pharmacia 制) 等制备 mRNA。另外, 通过使用 QuickPrep mRNA 纯化试剂盒 (Pharmacia 制) 直接制备 mRNA。

由得到的 mRNA 使用逆转录酶合成抗体 V 区域的 cDNA。cDNA 的合成可以使用 AMV 逆转录酶第一链 cDNA 合成试剂盒等进行。另外, 进行 cDNA 的合成及扩增中也可以使用 5'-Ampli FINDER RACE 试剂盒 (Clontech 制) 及 PCR 的 5'-RACE 法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998 - 9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919 - 2932)。由得到的 PCR 产物纯化目的 DNA 片断, 与载体 DNA 连结。进一步, 由此制备重组载体、导入大肠杆菌等中、选择集落制备所期望的重组载体。目的 DNA 的碱基序列可通过已知的方法、例如脱氧法确认。

若得到编码目的抗体的 V 区域的 DNA、将其和编码期望的抗体恒定区域 (C 区域) 的 DNA 连结, 整合入表达型载体中。另外, 也可以将含有编码抗体的 V 区域的 DNA 整合入含有抗体 C 区域的 DNA 的表达型载体中。

制备本发明中使用的抗体, 是将下述的抗体基因整合入表达型载体, 以使其在表达控制区域、例如在增强子、启动子的控制下表达。然后, 通过该表达型载体转化宿主细胞、可以使抗体表达。

本发明中, 以降低对人的异种抗原性等作为目的、可以使用人为地改变了的基因重组型抗体, 例如嵌合抗体、人源化抗体、人抗体。这些修饰抗体可以用已知的方法制备。

嵌合抗体可通过将编码上述得到的抗体 V 区域的 DNA 与编码人抗体 C 区域的 DNA 连结, 通过将其整合入表达型载体中、导入宿主产生得到 (参照欧洲专利申请公开号 EP 125023、国际专利申请公开号 WO 92-19759)。使用该已知方法, 可以得到本发明中有用的嵌合抗体。

例如, 含有编码嵌合 PM-1 抗体的 L 链及 H 链的 V 区域的 DNA 的质

粒，分别被命名为 pPM-k3 和 pPM-h1，具有该质粒的大肠杆菌基于布达佩斯条约，在 1991 年 2 月 11 日分别作为 NCIMB 40366 和 NCIMB 40362 被国际保藏在国立工业和海洋微生物保藏有限公司（National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited）。

人源化抗体也被称为重构人抗体，是将人以外的哺乳动物、例如小鼠抗体的互补决定区（CDR）移植入人抗体的互补决定区得到的抗体，也知道其一般的基因重组方法（参照欧洲专利申请公开号 EP 125023、国际专利申请公开号 WO 92-19759）。

具体地说，将设计为连结小鼠抗体的 CDR 和人抗体的构架区域（FR）的 DNA 序列，通过 PCR 法由在制造成末端部分具有重叠部分的多个寡核苷酸合成。将得到的 DNA 与编码人抗体 C 区域的 DNA 连结，然后通过整合入表达型载体中，将其导入宿主产生可得到（参照欧洲专利申请公开号 EP 239400、国际专利申请公开号 WO 92-19759）。

通过 CDR 连结的人抗体的 FR，可选择互补决定区域形成良好的抗原结合部位的物质。根据需要，也可以置换抗体可变区域的构架区域的氨基酸以使重构人抗体的互补决定区形成适当的抗原结合部位（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851 - 856）。

在嵌合抗体、人源化抗体中也可以使用人抗体 C 区域。作为人抗体 C 区域，可以列举 C γ ，例如，可以使用 C γ 1、C γ 2、C γ 3 或 C γ 4。另外，为了改善抗体及其产生的稳定性，也可以修饰人抗体 C 区域。

嵌合抗体由来自人以外的哺乳动物的抗体的可变区域和来自人的抗体 C 区域构成，人源化抗体由来自人以外的哺乳动物的抗体的互补决定区域和来自人抗体的构架区域和 C 区域构成，为了降低人体内的抗原性，它们作为本发明中使用的抗体是有用的。

作为本发明中使用的人源化抗体的优选具体实例，可以列举人源化 PM-1 抗体（参照国际专利申请公开号 WO 92-19759）。

另外，作为人抗体的取得方法，除上述方法以外，已知还有使用人抗体的基因库，通过淘选取得人抗体的技术。例如，将人抗体的可变区域作

为单链抗体 (scFv) 用噬菌体显示方法使其在嗜菌体表面表达, 可选择与抗原结合的嗜菌体。如果解析选择的嗜菌体基因, 可以决定与抗原结合的编码人抗体的可变区域的 DNA 的序列。如果明确了与抗原结合的 scFv 的 DNA 序列, 则可使用该序列制作适当的表达载体, 从而可以取得人抗体。这种方法已是众所周知的, 可以参考 WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388。

如上所述构建的抗体基因, 可以通过公知的方法使之表达、取得。在哺乳类细胞的情况下, 可通过功能性结合了经常使用的有用的启动子、被表达的抗体基因、在其 3' 侧下游的 poly A 信号的 DNA 或含有该 DNA 的载体使之表达。例如作为启动子/增强子, 可以列举人巨细胞病毒立即早期启动子/增强子。

另外, 作为其它在本发明中使用的可用于抗体表达时的启动子/增强子, 也可以使用逆转录病毒、多瘤病毒、腺病毒、猿病毒 40 (SV 40) 等的病毒启动子/增强子或人促进因子-1 α (HEF1 α) 等来自哺乳类细胞的启动子/增强子。

例如, 使用 SV 40 启动子/增强子时, 按照 Mulligan 等的方法 (Mulligan, R. C. et al., Nature (1979) 277, 108 - 114), 或者, 在使用 HEF1 α 启动子/增强子时, 按照 Mizushima 等的方法 (Mizushima, S. and Nagata, S. Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) 可以容易地实施。

在大肠杆菌的情况下, 可以功能性结合被经常使用的有用的启动子、为了抗体分泌的信号序列、被表达的抗体基因并使之表达。例如作为启动子, 可以列举 lacZ 启动子、araB 启动子。在使用 lacZ 启动子时, 可以按照 Ward 等的方法 (Ward, E. S. et al., Nature (1989) 341, 544 - 546; Ward, E. S. et al. FASEB J. (1992) 6, 2422 - 2427), 使用 araB 启动子时, 可以按照 Better 等的方法 (Better, M. et al. Science (1988) 240, 1041 - 1043)。

作为为了抗体分泌的信号序列, 在产生于大肠杆菌的周质间隙时, 可以使用 pelB 信号序列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379 - 4383)。

分离产生于周质间隙的抗体后，将抗体的结构适当地再折叠使用（例如，参照 WO96/30394）。

作为复制起点，可以使用来自 SV40、多瘤病毒、腺病毒、牛乳头状瘤病毒（BPV）等的物质，进一步，为了增加宿主细胞系中的基因复制数量，表达型载体，可以含有氨基糖苷磷酸转移酶（APH）基因、胸苷激酶（TK）基因、大肠杆菌黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶（Ecogpt）基因、二氢叶酸还原酶（dhfr）基因等作为选择标记。

为了制备本发明中使用的抗体，可以使用任意的生产系。对于为制造抗体的生产系，有体外和体内的生产系。作为体外的生产系，可以列举使用真核细胞的生产系或使用原核细胞的生产系。

使用真核细胞时，有使用动物细胞、植物细胞、或真菌细胞的生产系。作为动物细胞，已知（1）哺乳类细胞，例如 CHO、COS、骨髓瘤、BHK（幼仓鼠肾）、Hela、Vero 等，（2）两栖类细胞，例如爪蟾卵细胞，或（3）昆虫细胞，例如 sf9、sf21、Tn5 等。作为植物细胞，已知来自烟草（*Nicotiana tabacum*）的细胞，可以将其进行愈伤组织培养。作为真菌细胞，已知酵母、例如酵母（*Saccharomyces*）属、例如啤酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*），丝状真菌、例如曲霉（*Aspergillus*）属、例如黑曲霉（*Aspergillus niger*）等。

使用原核细胞时，有使用细菌细胞的生产系。作为细菌细胞，已知大肠杆菌（*E. coli*）、枯草杆菌。

通过转化将目的抗体基因导入这些细胞中，通过在体外培养被转化的细胞可得到抗体。培养按公知的方法进行。例如，作为培养液，可以使用 DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM，也可以并用胎牛血清（FCS）等的血清补液。另外，通过将导入了抗体基因的细胞移入动物的腹腔等，也可以在体内产生抗体。

另一方面，作为体内的生产系，可以列举使用动物的生产系或使用植物的生产系。使用动物时，有使用哺乳类动物、昆虫的生产系等。

作为哺乳动物，可以使用山羊、猪、绵羊、小鼠、牛等（Vicki Glaser,

SPECTRUM Biotechnology Applications,1993)。另外,作为昆虫,可以使用蚕。使用植物时,例如可以使用烟草。

在这些动物或植物中导入抗体基因,在动物或植物的体内使抗体产生,然后回收。例如,在编码山羊 β 酪蛋白那样的在乳汁中固有产生的蛋白质的基因中插入抗体基因作为融合基因进行制备。将含有插入了抗体基因的融合基因的DNA片断注入山羊的胚胎中,将该胚胎导入母山羊体内。从容纳该胚胎的山羊生出的转基因山羊或其子孙产生的乳汁中可得到所期望的抗体。为了增加由转基因山羊产生的含有期望抗体的乳汁量,也可以对转基因山羊使用适宜的激素。(Ebert, K. M. et al., Bio/ Technology (1994) 12, 699-702)。

另外,使用蚕时,可使蚕感染插入了目的抗体基因的杆状病毒,通过该蚕的体液得到期望的抗体(Maeda, S. et al., Nature (1985) 315, 592-594)。另外,使用烟草时,在植物表达用载体、例如pMON 530中插入目的抗体基因,在根癌病菌样的细菌中导入该载体。使烟、例如烟草感染该细菌,通过该烟叶可得到期望的抗体(Julian, K. -C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

如上所述,在用体外或体内的生产系产生抗体时,可以将编码抗体重链(H链)或轻链(L链)的DNA分别整合入表达型载体中、同时转化宿主,或者也可以将编码H链和L链的DNA整合入单一的表达型载体中、使宿主转化(参照国际专利申请公开号WO 94-11523)。

本发明中使用的抗体,只要适于使用在本发明中,也可以是抗体的片断或其修饰物。例如,作为抗体的片断,可以列举Fab、 $F(ab')_2$ 、Fv或H链和L链的Fv用适当的连接物连结而成的单链Fv(scFv)。

具体地说,抗体用酶、例如木瓜酶、胃蛋白酶处理生成抗体片段,或者,构建编码这些抗体片段的基因、将其导入表达型载体中后,在适当的宿主细胞中使之表达(例如,参照Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology

(1989) 178, 476 - 496、Lamoyi, E., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 652 - 663、Rousseaux, J. et al., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 663 - 669、Bird, R. E. et al., *TIBTECH* (1991) 9, 132 - 137)。

scFv 可以通过连结抗体的 H 链 V 区域和 L 链 V 区域得到。该 scFv 中, H 链 V 区域和 L 链 V 区域通过连接物、优选通过肽连接物被连结 (Huston, J. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) 85, 5879 - 5883)。scFv 中 H 链 V 区域和 L 链 V 区域可以是来自上述记载的抗体的任一种。作为连结 V 区域的肽连接物, 可以使用例如由 12 - 19 个氨基酸残基组成的任意的单链肽。

编码 scFv 的 DNA, 可以通过将编码上述抗体的 H 链或 H 链 V 区域的 DNA、以及编码 L 链或 L 链 V 区域的 DNA 作为模板, 使用规定其两端的引物对, 通过 PCR 法将这些序列中编码期望的氨基酸序列的 DNA 部分扩增, 然后, 进一步组合引物对并扩增得到, 该引物规定编码肽连接物部分的 DNA 并使其两端分别连结 H 链、L 链。

另外, 一旦制备编码 scFv 的 DNA、则可以按照常规方法得到含有它们的表达型载体和该表达型载体转化的宿主, 另外, 使用该宿主按照常规方法, 可以得到 scFv。

这些抗体的片断, 可以与上述相同, 取得它的基因并使之表达、通过宿主产生。在本发明中所说的“抗体”中也包含这些抗体的片段。

作为抗体的修饰物, 可以使用和聚乙二醇 (PEG) 等各种分子结合的抗体。在本发明中所说的“抗体”中也包含这些抗体的修饰物。为了得到这种抗体修饰物, 可通过对得到的抗体进行化学修饰得到。这些方法在该领域已经被确立。

如上所述生产、表达的抗体可以从细胞内外、宿主分离纯化至均一。本发明中使用的抗体的分离、纯化可以用亲和层析进行。作为亲和层析中使用的层析柱, 可以列举例如蛋白质 A 柱、蛋白质 G 柱。作为蛋白质 A 柱中使用的载体, 可以列举例如 Hyper D、POROS、Sepharese F.F.等。此外, 可以使用在通常的蛋白质中使用的分离、纯化方法, 没有什么限制。

例如,若适当选择、组合除上述亲和层析以外的色谱法、过滤、超滤、盐析、透析等,可以分离、纯化本发明中使用的抗体。作为色谱法,可以列举例如离子交换色谱法、疏水色谱法、凝胶过滤等。这些色谱法适用于HPLC(高效液相色谱)。另外,也可以使用反相HPLC(反相HPLC)。

上述所得抗体的浓度测定可以通过吸光度的测定或ELISA等进行。即,用吸光度的测定时,用PBS(-)适当稀释后、测定280nm的吸光度、1mg/ml相当于1.35 OD、算出浓度。另外,用ELISA时,可以如下进行测定。即,将用0.1M碳酸氢盐缓冲液(pH 9.6)稀释至1 μ g/ml的山羊抗人IgG(TAG制)100 μ l加入96孔板(Nunc制)中,在4℃下温育1夜、固定化抗体。封闭后、添加适当稀释的本发明中使用的抗体或含有抗体的样品、或作为标准品的人IgG(CAPPEL制)100 μ l、室温下温育1小时。

洗涤后,加入稀释了5000倍的碱性磷酸酯酶标记的抗人IgG(BIOSOURCE制)100 μ l,在室温下温育1小时。洗涤后,加入底物溶液温育后、用MICROPLATE READER Model 3550(Bio-Rad制)测定405nm的吸光度,算出目的抗体的浓度。

本发明中使用的IL-6变异体,具有和IL-6受体的结合活性、且为不传递IL-6的生物学活性的物质。即,虽然IL-6变异体相对于IL-6受体与IL-6竞争结合,但是由于不传递IL-6的生物学活性,故将阻断IL-6产生的信号传递。

IL-6变异体是通过置换IL-6的氨基酸序列的氨基酸残基、引入变异而制备的。虽然不管作为IL-6变异体原料的IL-6的由来,但是若考虑到抗原性等、优选人IL-6。

具体地说,IL-6的氨基酸序列可以使用已知的分子模型程序、例如WHATIF(Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56)来预测其二次结构,通过进一步评价被置换的氨基酸残基对总体的影响来进行。决定适当的置换氨基酸残基后、以含有编码人IL-6基因的碱基序列的载体作为模板,按照通常使用的PCR法引入变异使氨基酸被置换,可以得到编码IL-6变异体的基因。按照需要,将其整合入适当的表达型载体中、按照上

述重组型抗体的表达、产生及纯化方法可以得到 IL-6 变异体。

作为 IL-6 变异体的具体实例, 在 Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93、及 Savino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367、WO 96-18648、WO 96-17869 中有公开。

本发明中使用的 IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽, 具有和各自 IL-6 受体或 IL-6 的结合活性, 且为不传递 IL-6 生物学活性的物质。即, IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽与 IL-6 受体或 IL-6 结合, 通过捕捉它们可特异地阻碍 IL-6 与 IL-6 受体的结合。其结果, 由于不传递 IL-6 的生物学活性, 因此将阻断 IL-6 产生的信号传递。

IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽是由在 IL-6 或 IL-6 受体的氨基酸序列中与 IL-6 和 IL-6 受体的结合相关区域的一部分或全部的氨基酸序列组成的肽。这种肽通常由 10~80、优选为 20~50、更优选为 20~40 个氨基酸残基组成。

IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽, 可通过在 IL-6 或 IL-6 受体的氨基酸序列中特定与 IL-6 和 IL-6 受体的结合相关的区域, 将其一部分或全部的氨基酸序列用通常已知的方法、例如基因工程方法或肽合成法来制备。

通过基因工程方法制备 IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽时, 可将编码期望的肽的 DNA 序列整合入表达型载体中, 按照上述重组型抗体的表达、产生及纯化方法可以得到。

通过肽合成法制备 IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽时, 可以使用在肽合成中通常用的方法、例如固相合成法或液相合成法。

具体地说, 也可以按照续药品的开发第 14 卷肽合成 监修矢岛治明 广川书店 1991 年中记载的方法进行。作为固相合成法, 可以使用使与要合成的肽的 C 末端对应的氨基酸与例如在有机溶剂中不溶性的支撑体结合, 通过交互重复进行将用适当的保护基团保护了 α -氨基及侧链官能团的氨基酸按从 C 末端到 N 末端方向的顺序逐一缩合氨基酸的反应、和使树脂上结合的氨基酸或肽的 α -氨基的保护基团脱离的反应, 使肽链延长的方法。固相肽合成法根据使用的保护基团种类, 可大致分为 Boc 法和 Fmoc 法。

这样合成目的肽后,进行脱保护反应以及将肽链从支撑体切断的反应。与肽链的切断反应中,在 Boc 法中可以通常使用氟化氢或三氟甲磺酸、而 Fmoc 法中可以使用 TFA。在 Boc 法中,例如在氟化氢中,在苯甲醚存在的情况下处理上述保护肽树脂。然后,进行保护基团的脱离和从支撑体的切断、回收肽。通过将其冻结干燥、可以得到粗肽。另一方面,在 Fmoc 法中,例如在 TFA 中可以进行与上述相同的操作,进行脱保护反应以及从支撑体切断肽链的反应。

得到的粗肽,由于适用于 HPLC,因此可以进行分离、纯化。洗脱时,可以使用在蛋白质的纯化中通常使用的水-乙腈系溶剂在最适条件下进行。分别取得相当于所得色谱法的曲线峰的馏分、将其冷冻干燥。对于这样纯化的肽馏分、通过根据质谱分析的分子量解析、氨基酸组成分析、或氨基酸序列解析等来鉴定。

IL-6 部分肽及 IL-6 受体部分肽的具体实例,在特开平 2-188600、特开平 7-324097、特开平 8-311098 及美国专利公报 US 5210075 中公开。

本发明中使用的 IL-6 拮抗剂的 IL-6 信号传递阻碍活性,可以用通常使用的方法评价。具体地说,培养 IL-6 依赖性人骨髓瘤细胞株 (S6B45, KPMM2), 人レンネルト T 淋巴瘤细胞株 KT3, IL-6 依赖性细胞 MH60.BSF2, 向其中加入 IL-6、同时使 IL-6 拮抗剂共存,由此可以测定 IL-6 依赖性细胞的 ^3H -胸苷的摄取。另外,培养 IL-6 受体表达细胞 U266、加入 ^{125}I 标记的 IL-6, 同时加入 IL-6 拮抗剂,由此测定与 IL-6 受体表达细胞结合的 ^{125}I 标记的 IL-6。在上述分析体系中,如果除了使 IL-6 拮抗剂存在的组以外、还准备不含 IL-6 拮抗剂的阴性对照组,比较两者得到的结果,可以评价 IL-6 拮抗剂的 IL-6 抑制活性。

如下述实施例所示,由于通过给药抗 IL-6 受体抗体,在小儿慢性关节炎患者中能够看到治疗效果,因此表明抗 IL-6 受体抗体等 IL-6 拮抗剂作为小儿慢性关节炎相关疾病治疗剂是有用的。

本发明的治疗对象是哺乳动物。治疗对象的哺乳动物优选为人。

本发明的小儿慢性关节炎相关疾病治疗剂可以口服或非口服地全身或

局部给药。例如，可以选择点滴等的静脉内注射、肌肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、栓剂、灌肠、口服性肠溶剂等，可以按照患者的年龄、症状来选择适宜的给药方法。有效给药量在每次 1kg 体重 0.01mg ~ 100 mg 的范围内选择。或者，也可以选择每个患者 1 ~ 1000 mg、优选为 5 ~ 50 mg 的给药量。优选的给药量、给药方法是，例如，在抗 IL-6 受体抗体的情况下，血液中存在的游离抗体程度的量为有效给药量，作为具体的例子，1kg 体重每月(4 周)分 1 次到几次给药 0.5 mg ~ 40 mg、优选 1 mg ~ 20 mg，例如在 2 次/周、1 次/周、1 次/2 周、1 次/4 周等给药日程表下，用点滴等静脉内注射、皮下注射等方法的给药方法等。给药日程表可以在观察病情和血液检查值的动向的同时将给药间隔由 2 次/周或 1 次/周调整为 1 次/2 周、1 次/3 周、1 次/4 周那样延长给药间隔。

本发明的小儿慢性关节炎相关疾病治疗剂，也可以同时含有在给药路径下药物所容许的载体或添加物。作为这种载体及添加物的例子，可以列举水、药物中容许的有机溶剂、胶原蛋白、聚乙烯基醇、聚乙烯基吡咯烷酮、羧乙烯基聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、海藻酸钠、水溶性葡聚糖、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯胶、酪蛋白、明胶、琼脂、一缩二丙二醇、丙二醇、聚乙二醇、凡士林、石蜡、硬脂酰醇、硬脂酸、人血清白蛋白(HSA)、甘露醇、山梨糖醇、乳糖、作为药品添加物容许的表面活性剂等。使用的添加物，按照剂型可以从上述中适宜选择或组合使用，但不限于这些。

实施例

以下，通过实施例和参考例对本发明进行具体的说明，但本发明并不仅限于这些。

实施例 1

对有以下经过的全身型幼儿风湿性关节患者(5 岁、男性)，实行 MRA 治疗。

治疗前的经过

弛张热（连日 $\sim 40^{\circ}\text{C}$ 的单峰性发热）、两膝关节痛、皮疹症状。白血球增多，抗核抗体阴性、类风湿因子阴性、血沉值亢进、CRP 值高等诊断后，开始用阿司匹林给药，但是并未改善弛张热和关节炎，且全身症状恶化。因此改为大量口服给药甾体药物（强的松龙 30 mg/日 ），看到各种症状的改善。但是伴随着强的松龙的逐渐减少，在量为 10mg/日 时，又复发了，住院后，用甲基强的松龙(mPSL)脉冲疗法和血浆交换疗法，进一步同时并用环孢霉素 A(Cs A)也无改善，炎症症状增强（白血球数 $25400/\mu\text{L}$ 、CRP 11.2mg/dL ），基于用血浆交换疗法 + mPSL 脉冲疗法 + Cs A 的见解，作为后疗法用强的松龙-氟联苯丙酸进行控制弛张热，临床上能看到退热，但是血液的炎症却仍然维持很高的值（CRP $>5\text{mg/dL}$ ），出院后由于有周期性的弛张热，实行外来中心的治疗观察。但是，患者诉说在发热时背部疼痛增强，MBI 等的精查结果，确认在第 4~5 胸椎有破坏性伤，可认为是由于甾体导致的受压骨折。由于有必要向胸椎免负荷，在床上保持安静状态约一年，下肢肌肉显著衰退，成为完全不能步行的状态。虽然继续强的松龙 + 氟联苯丙酸 + Cs A 三者疗法，但 CRP 也未降低至 5mg/dL 或以下。

治疗结果

由于开始以 2mg/kg 给药，没见到特别的副作用，因此增加至 4mg/kg ，每周给药一次。在那以前确认的发热很快消失，CRP 约 2 周后阴性化，全身倦怠感也被去除，能见到患者有朝气。强的松龙可慢慢减量，减至 1mg/日 。

从以上结果可知，MRA 对阿司匹林、氟联苯丙酸等非甾体抗炎药，长期大量的甾体药物（强的松龙（プレドニン）、甲基强的松龙（メドロール）等）、环孢霉素 A、甲氨蝶呤等免疫抑制药都不能抑制病状的小儿慢性关节炎的治疗是有效的。因此，IL-6 拮抗剂，特别是抗 IL-6 受体抗体对小儿慢性关节炎，特别是作为 ARA 分类的全身型、EULAR 分类的全身型、ILAR 分类的全身型、本发明者们分类的 SPRASH 综合征的小儿慢性关节炎的治疗剂是有用的。

实施例 2

22 岁女性。1998 年 4 月，大腿、前胸部、手指处出现点状红斑，5 月肩、肘、膝关节痛。出现 38℃ 的发热。开始使用非甾体抗炎药抗炎剂（NSAIDs），但发热还是持续，7 月白血球数 18100/ μ l, CRP 18.3mg/dl, 血清铁蛋白 440ng/ml。诊断为成人斯提尔氏病。2000 年 1 月初出现 39℃ 的发热以及出现关节痛，认为成人斯提尔氏病的复发（CRP 15.8mg/dl, 铁蛋白 205.8mg/ml）。

由于甾体减量困难，因此并用氨甲蝶呤 MTX 及环孢霉素（CsA），但不能抑制病势。由于病势加重，呼吸状态恶化，需要人工呼吸管理。用甾体脉冲疗法改善了病势，但并发了重症骨质疏松症。开始用人源化的抗 IL-6 受体抗体（MRA）治疗。每 2 周通过点滴静脉注射 MRA 200mg。给药 6 日后炎症反应阴性化，肾上腺皮质甾体药物能顺利的减量，也未见严重的副作用。

从以上结果可知，MRA 对于联用 MTX 和 CsA 也不能抑制病状的成人斯提尔氏病有效。因此，IL-6 的拮抗剂，特别是抗 IL-6 受体抗体作为斯提尔氏病特别是成人斯提尔氏病的治疗剂是有用的。

参考例 1. 人可溶性 IL-6 受体的制备

使用含有编码按 Yamasaki 等的方法（Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828）得到的 IL-6 受体的 cDNA 的质粒 pBSF2R.236，通过 PCR 法制备可溶性 IL-6 受体。用限制酶 Sph I 消化质粒 pBSF2R.236，得到 IL-6 受体 cDNA、将其插入 mp18（Amersham 制）中。使用设计为以便在 IL-6 受体 cDNA 中导入终止密码子的合成寡引物，通过体外突变形系统（Amersham 制）、用 PCR 法在 IL-6 受体 cDNA 中导入变异。通过该操作终止密码子被导入氨基酸 345 的位置，得到编码可溶性 IL-6 受体的 cDNA。

为了在 CHO 细胞中表达可溶性 IL-6 受体，使其与质粒 pSV（Pharmacia 制）连结，得到质粒 pSVL344。在含有 dhfr 的 cDNA 的质粒 pECEdhfr 中插入用 Hind III-Sal I 切断的可溶性 IL-6 受体 cDNA，得到 CHO 细胞表达质粒 pECEdhfr344。

通过磷酸钙沉淀法 (Chen, C. et al., Mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745 - 2751) 向 dhfr-CHO 细胞株 DXB-11 (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216 - 4220) 转染 10 μ g 的质粒 pECEdhfr344。将转染的 CHO 细胞用含有 1mM 谷氨酰胺、10% 透析 FCS、100U/ml 青霉素和 100 μ /ml 链霉素的不含核苷的 α MEM 选择培养液培养 3 周。

被选择的 CHO 细胞用极限稀释法筛选, 得到单一的 CHO 细胞克隆。用 20nM ~ 200nM 浓度的氨甲蝶呤扩增该 CHO 细胞克隆, 得到产生人可溶性 IL-6 受体的 CHO 细胞株 5E27。用含有 5% FBS 的伊斯考夫改良的杜尔贝科培养基 (IMDM, Gibco 制) 培养 CHO 细胞株 5E27。回收培养上清液, 用 ELISA 测定培养上清液中的可溶性 IL-6 受体的浓度。其结果, 可以确认在培养上清液中存在可溶性 IL-6 受体。

参考例 2. 抗人 IL-6 抗体的制备

用 10 μ g 的重组型 IL-6 (Hirano, T. et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41) 和弗氏完全佐剂一起免疫 BALB/c 小鼠, 每周连续进行免疫至血清中能检出抗 IL-6 抗体为止。从局部淋巴结中取出免疫细胞, 用聚乙二醇 1500 使其与骨髓瘤细胞株 P3U1 融合。按照使用 HAT 培养液的 Oi 等的方法 (Selective Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) 选择杂交瘤, 建立产生抗人 IL-6 抗体的杂交瘤。

产生抗人 IL-6 抗体的杂交瘤如下所示进行 IL-6 结合分析。即, 将柔软的聚乙烯制的 96 孔微孔板 (Dynatech Laboratories, Inc. 制, Alexandria, VA) 在 0.1M 的碳酸氢盐碳酸盐缓冲溶液 (pH 9.6) 中用 100 μ l 的山羊抗小鼠 Ig (10 μ g/ml, Cooper Biomedical, Inc 制 Malvern, PA) 在 4 $^{\circ}$ C 下包被一夜。然后, 将板用含有 100 μ l 的 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 在室温下处理 2 小时。

将其用 PBS 洗涤后, 在各孔中加入 100 μ l 的杂交瘤培养上清液、在 4 $^{\circ}$ C 下温育一夜。洗涤该板后、在各孔中加入 125 I 标记的重组型 IL-6 使其达到 2000cpm/0.5ng/孔, 洗涤后用 γ 计数器 (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA) 测定各孔的放射活性。通过 IL-6 结

合分析, 216 杂交瘤克隆中 32 个杂交瘤克隆为阳性。在这些克隆中可得到最终稳定的 MH166.BSF2。该杂交瘤产生的抗 IL-6 抗体 MH166 具有 IgG1 κ 型的亚型。

然后, 使用 IL-6 依赖性小鼠杂交瘤克隆 MH60.BSF2 研究与 MH166 抗体导致的杂交瘤增殖相关的中和活性。将 MH60.BSF2 细胞分别注入小孔中达到 $1 \times 10^4/200 \mu\text{l}$ /孔, 向其中加入含有 MH166 抗体的试样, 培养 48 小时, 加入 $0.5 \mu\text{Ci}$ /孔的 ^3H 胸苷 (New England Nuclear, Boston, MA) 后, 进而连续培养 6 小时。将细胞放置在玻璃滤纸上, 用自动采集机 (Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan) 处理。作为对照使用兔抗 IL-6 抗体。

其结果, MH166 抗体, 剂量依赖性地阻碍被 IL-6 诱导的 MH60.BSF2 细胞的 ^3H 胸苷的摄取。由此可知, MH166 抗体中和 IL-6 的活性。

参考例 3. 抗人 IL-6 受体抗体的制备

使按 Hirata 等的方法 (Hirata, Y. et al. J. Immunol. (1989) 143, 2900 - 2906) 制备的抗 IL-6 受体抗体 MT18 与通过 CNBr 活化的琼脂糖 4B (Pharmacia Fine Chemicals 制, Piscataway, NJ) 按照附上的配方结合, 纯化 IL-6 受体 (Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825 - 828)。将人骨髓瘤细胞株 U266 用含有 1% 毛地黄皂苷 (Wako Chemicals 制)、10mM 三乙醇胺 (pH7.8) 及 0.15M NaCl 的 1mM 对氨基苯基甲磺酰氟盐 (Wako Chemicals 制) (毛地黄皂苷缓冲液) 裂解, 和与琼脂糖 4B 珠结合的 MT18 抗体混合。然后, 将该珠用毛地黄皂苷缓冲液洗涤 6 次, 作为用于免疫的部分纯化 IL-6 受体。

用由 3×10^9 个 U266 细胞得到的上述部分纯化 IL-6 受体每 10 天免疫 BALB/c 小鼠 4 次, 然后用常规方法制备杂交瘤。用下述方法调查来自成长阳性孔的杂交瘤培养上清液对 IL-6 受体的结合活性。用 ^{35}S -蛋氨酸 (2.5mCi) 标记的 5×10^7 个 U266 细胞, 用上述毛地黄皂苷缓冲液使之裂解。将裂解的 U266 细胞和 0.04ml 容量的与琼脂糖 4B 珠结合的 MT18 抗体混合, 然后, 用毛地黄皂苷缓冲液洗涤 6 次, 使用 0.25ml 毛地黄皂苷缓冲液 (pH3.4) 使 ^{35}S -蛋氨酸标记的 IL-6 受体洗脱, 用 0.025ml 的 1M Tris

(pH7.4) 中和。

将 0.05ml 的杂交瘤培养上清液和 0.01ml 的蛋白 G 琼脂糖(Pharmacia 制)混合。洗涤后,将琼脂糖和上述制备的 0.005ml³⁵S 标记的 IL-6 受体溶液一起温育。用 SDS-PAGE 分析免疫沉降物,研究与 IL-6 受体反应的杂交瘤培养上清液。其结果确立了反应阳性杂交瘤克隆 PM-1 (FERM BP-2998)。产生于杂交瘤 PM-1 的抗体具有 IgG1 κ 型的亚型。

用人骨髓瘤细胞株 U266 研究杂交瘤 PM-1 产生的抗体相对于人 IL-6 受体的 IL-6 的结合抑制活性。人重组型 IL-6 用大肠杆菌制备 (Hirano, T. et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41-45)、用 Bolton-Hunter 试剂 (New Engl and Nuclear, Boston, MA) 进行 ¹²⁵I 标记的 (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981)。

将 4×10^5 个 U266 细胞与 70% (v/v) 杂交瘤 PM-1 的培养上清液和 14000cpm 的 ¹²⁵I 标记的 IL-6 一起培养一小时。将 70 μl 样品铺到 400 μl 的微植菌聚乙烯管中的 300 μl 的 FCS 上,离心后,测定细胞上的放射活性。

结果表明,杂交瘤 PM-1 产生的抗体抑制 IL-6 与 IL-6 受体的结合。

参考例 4. 抗小鼠 IL-6 受体抗体的制备

通过 Saito, T. et al., J. Immunol. (1991) 147, 168-173 记载的方法,制备对小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体。

在含有 10%FCS 的 IMDM 培养液中培养产生小鼠可溶性 IL-6 受体的 CHO 细胞,从其培养上清液使用将抗小鼠 IL-6 受体抗体 RS12 (参照上述 Saito, T. et al) 固定于 Affigel 10 凝胶 (Biorad 制) 的亲合性色谱柱纯化小鼠可溶性 IL-6 受体。

混合得到的小鼠可溶性 IL-6 受体 50 μg 和弗氏完全佐剂,向ウ、スタ一大鼠的腹部注射。2 周后开始用弗氏不完全佐剂追加免疫。第 45 天采集大鼠脾脏细胞,使 2×10^8 个脾脏细胞按照常规方法与 1×10^7 个小鼠骨髓瘤细胞 P3U1 和 50%的 PEG1500 (Boehringer Mannheim 制) 细胞融合后,在 HAT 培养基中筛选杂交瘤。

在包被了兔抗大鼠 IgG 抗体 (Cappel 制) 的板上加入杂交瘤培养上清液后, 使小鼠可溶性 IL-6 受体反应。然后, 通过使用兔抗小鼠 IL-6 受体抗体和碱性磷酸酯酶标记的的绵羊抗兔 IgG 的 ELISA 法筛选对于小鼠可溶性 IL-6 受体产生抗体的杂交瘤。对已确认产生抗体的杂交瘤克隆进行 2 次亚筛选, 得到单一的杂交瘤克隆。此克隆被命名为 MR16-1。

用 MH60.BSF2 细胞 (Matsuda, T. et al., J. Immunol. (1988) 18, 951 - 956) 用 ^3H 胸苷的摄取研究该杂交瘤产生的抗体在小鼠 IL-6 的信息传递中的中和活性。在 96 孔板上制备 MH60.BSF2 细胞至 1×10^4 个/200 μl /孔。在该板上加入 10pg/ml 的小鼠 IL-6 和 MR16-1 抗体或 RS12 抗体 12.3 ~ 1000ng/ml, 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下培养 44 小时后, 加入 1 μCi /孔的 ^3H 胸苷。4 小时后测定 ^3H 胸苷的摄取。结果表明, MR16-1 抗体抑制 MH60.BSF2 细胞的 ^3H 胸苷摄取。

因此表明, 杂交瘤 MR16-1 (FERM BP - 5874) 产生的抗体, 阻碍 IL-6 与 IL-6 受体的结合。