(19) 中华人民共和国国家知识产权局

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1849135 B
(45) 授权公告日 2011.06.15

(21) 申请号 200480011401.1
(22) 申请日 2004.04.28
(30) 优先权数据
0309619.5 2003.04.28 GB
(85) PCT申请进入国家阶段日
2005.10.28
(86) PCT申请的申请数据
PCT/JP2004/006211 2004.04.28
(87) PCT申请的公布数据
WO2004/096273 EN 2004.11.11
(73) 专利权人 中外制药株式会社
地址 日本东京
(72) 发明人 奥田修 吉田宪彰 R·N·马伊尼
(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 罗菊华
(51) Int.Cl.
*A61K 39/395* (2006.01)
(56) 对比文件
US 5210075，第22栏第64行至第23栏第4行，第29栏最后一段.
EP 1074268 A1, 说明书第3页第16行至第37行.
审查员 吴立

权利要求书 1 页 说明书 18 页

(54) 发明名称

治疗白介素-6相关疾病的方法

(57) 摘要

本发明涉及治疗白介素-6(IL-6)相关疾病的药物组合物，包括白介素-6拮抗剂(IL-6拮抗剂)和免疫抑制剂。IL-6拮抗剂优选抗白介素-6受体(IL-6R)的抗体。

1. 治疗类风湿性关节炎的药物组合物,包含 MRA 和氨甲蝶呤。

2. 权利要求 1 的药物组合物,其中 MRA 的剂量为 0.02-150mg/kg/4 周或显示出与其等同的血液 MRA 浓度的剂量。

3. 权利要求 2 的药物组合物,其中 MRA 的剂量为 0.5-30mg/kg/4 周或显示出与其等同的血液 MRA 浓度的剂量。

4. 权利要求 3 的药物细合物,其中 MRA 剂量为 2-8mg/kg/4 周或显示出与其等同的血液 MRA 浓度的剂量。

5. 权利要求 1 的药物组合物,其中所述氨甲蝶呤的剂量是 1-100mg/ 个体 / 周。

6. 权利要求 5 的药物组合物,其中所述氨甲蝶呤的剂量是 4-50mg/ 个体 / 周。

7. 权利要求 6 的药物组合物,其中所述氨甲蝶呤的剂量是 7.5-25mg/ 个体 / 周。

8. 权利要求 1-7 任一项的药物组合物,其制备为用于将 MRA 和氨甲蝶呤同时施用的制剂。

9. 权利要求 1-7 任一项的药物组合物,其制备为用于将 MRA 和氨甲蝶呤在时间上间隔施用的制剂。

10.MRA 和氨甲蝶呤在制备用于治疗类风湿性关节炎的药物细合物中的用途。

11. 权利要求 10 的用途,其中 MRA 剂量是 0.02-150mg/kg/4 周或显示出与其等同的血液 MRA 浓度的剂量。

12. 权利要求 30 的用途,其中 MRA 剂量是 0.5-30mg/kg/4 周或显示出与其等同的血液 MRA 浓度的剂量。

13. 权利要求 31 的用途,其中 MRA 剂量是 2-8mg/kg/4 周或显示出与其等同的血液 MRA 浓度的剂量。

14. 权利要求 10 的用途,其中所述氨甲蝶呤的剂量是 1-100mg/ 个体 / 周。

15. 权利要求 14 的用途,其中所述氨甲蝶呤的剂量是 4-50mg/ 个体 / 周。

16. 权利要求 15 的用途,其中所述氨甲蝶呤的剂量是 7.5-25mg/ 个体 / 周。

17. 权利要求 10-16 任一项的用途,用于将 MRA 和氨甲蝶呤同时施用。

18. 权利要求 10-16 任一项的用途,用于将 MRA 和氨甲蝶呤在时间上间隔施用。

# 治疗白介素 -6 相关疾病的方法

[0001] 发明背景

[0002] 1. 发明领域

[0003] 本发明涉及通过将白介素 -6 拮抗剂（IL-6 拮抗剂），特别是抗白介素 -6 受体（IL-6R）的抗体（抗 -IL-6R 抗体）与免疫抑制剂组合，并以高剂量给予抗 IL-6R 抗体来治疗白介素 -6(IL-6) 相关疾病的方法。

[0004] 2. 相关背景技术

[0005] IL-6 是一种细胞因子，也被称为 B 细胞刺激因子 -2(BSF2) 或干扰素 β2。已经发现 IL-6 作为分化因子参与 B 淋巴细胞系细胞的活化（Hirano，T. 等，Nature，324 :73-76，1986），并且后来证明 IL-6 是影响多种细胞功能的多功能细胞因子（Akira，S. 等，Adv. in Immunology，54 :1-78，1993）。据报道，IL-6 诱导 T 淋巴细胞系细胞成熟（Lotz，M. 等，J. Exp. Med.，167 :1253-1258，1988）。

[0006] IL-6 通过细胞上两种类型的蛋白传导其生物活性。一种是 IL-6 受体，该蛋白是分子量约为 80kD 的配体结合蛋白，IL-6 与它结合（Taga，T. 等，J. Exp. Med.，166 :967-981，1987 ;Yamasaki，K. 等，Science，241 :825-828，1987）。除了贯穿细胞膜并在细胞膜上表达的膜结合类型，IL-6 受体也可以是主要包含其胞外区的可溶形式的 IL-6 受体。

[0007] 国际公开 WO 92/19759 描述了多种类型的抗 IL-6R 抗体，例如：人源化抗 IL-6R 抗体和嵌合抗 IL-6R 抗体。WO 96/11020 描述了主要成分是 IL-6 拮抗剂例如抗 IL-6R 抗体的类风湿性关节炎治疗剂和滑膜细胞生长抑制剂。WO96/12503 描述了对由 IL-6 产生而引起的疾病的治疗，所述疾病例子有浆细胞增多症、高免疫球蛋白血症、贫血、肾炎、恶病质、类风湿性关节炎、Castleman 氏症以及系膜增殖性肾炎。WO 98/42377 描述了与敏化的 T 细胞相关的疾病例如：多发性硬化症、葡萄膜炎、慢性甲状腺炎、迟发性过敏、接触性皮炎以及遗传过敏性皮炎的预防 / 治疗剂，其中活性成分是抗 IL-6R 抗体。

[0008] WO 98/42377 描述了系统性红斑狼疮的治疗剂，其中活性成分是抗 IL-6R 抗体。WO 99/47170 描述了 Crohn 氏病的治疗剂，其中活性成分是抗 IL-6R 抗体。WO 00/10607 描述了胰腺炎的治疗剂，其中活性成分是抗 IL-6R 抗体。WO 02/3492 描述了银屑病的治疗剂，其中活性成分是抗 IL-6R 抗体。另外，WO 02/080969 描述了幼年型特发性关节炎的治疗剂，其中活性成分是抗 IL-6R 抗体。

[0009] 发明概述

[0010] 如上所述，已经知道其活性成分是抗 IL-6R 抗体的多种预防或治疗剂。然而，还不知道抗 IL-6R 抗体与免疫抑制剂，例如氨甲蝶呤（methotrexate，MTX）组合在治疗 IL-6 相关疾病中可获得协同作用，不知道在与抗 IL-6R 抗体一起治疗类风湿性关节炎时免疫抑制剂，例如氨甲蝶呤（MTX）能降低或预防变态反应，不知道在以抗 IL-6 抗体治疗类风湿性关节炎时高剂量抗 IL-6R 抗体能降低或预防变态反应。

[0011] 因此，本发明提供了治疗 IL-6 相关疾病的药物组合物，包括白介素 -6 拮抗剂（IL-6 拮抗剂）和免疫抑制剂。

[0012] 本发明还提供了包括免疫抑制剂的药物组合物，以增强使用 IL-6 拮抗剂治疗

IL-6 相关疾病的效果。

[0013] 本发明还提供了包括免疫抑制剂的药物组合物，以预防或降低用 IL-6 拮抗剂治疗 IL-6 相关疾病时的变态反应。

[0014] 本发明进一步提供了用于高剂量给药的 IL-6 相关疾病治疗剂，该治疗剂包括 IL-6 拮抗剂。

[0015] 本发明进一步提供了包含高剂量 IL-6 拮抗剂的药物组合物，以预防或降低 IL-6 相关疾病治疗中的变态反应。

[0016] IL-6 拮抗剂优选是抗 IL-6R 抗体。抗 IL-6R 抗体优选是抗 IL-6R 的单克隆抗体。优选，抗 IL-6R 抗体是抗人 IL-6R 的单克隆抗体。或者优选，抗 IL-6R 抗体是抗小鼠 IL-6R 的单克隆抗体。优选，抗 IL-6R 抗体是重组型抗体。优选，人抗 IL-6R 单克隆抗体是例如 PM-1 抗体。优选，小鼠抗 IL-6R 单克隆抗体是例如 MR16-1 抗体。进一步地，抗体可以是抗 IL-6R 的嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。特别优选抗 IL-6R 抗体是例如人源化的 PM-1 抗体。

[0017] 当 IL-6 拮抗剂，特别是抗 IL-6R 抗体与免疫抑制剂组合时，IL-6 拮抗剂，特别是抗 IL-6R 抗体的剂量，例如在静脉输注的情况下是 0.02-150mg/kg/4 周或显示出与其等同的血液抗 IL-6R 抗体浓度的剂量，优选 0.5-30mg/kg/4 周或显示出与其等同的血液抗 IL-6R 抗体浓度的剂量，更优选 2-8mg/kg/4 周或显示出与其等同的血液抗 IL-6R 抗体浓度的剂量。

[0018] 当高剂量给予 IL-6 拮抗剂，特别是抗 IL-6R 抗体时，IL-6 拮抗剂，特别是抗 IL-6R 抗体的剂量是，例如在静脉输注的情况下不低于 4mg/kg/4 周或显示出与其等同的血液抗 IL-6R 抗体浓度的剂量，优选 6-16mg/kg/4 周或显示出与其等同的血液抗 IL-6R 抗体浓度的剂量，更优选 6-10mg/kg/4 周或显示出与其等同的血液抗 IL-6R 抗体浓度的剂量。

[0019] 当 MTX 用作免疫抑制剂时，MTX 的剂量是，例如 1-100mg/ 个体 (body)/ 周或显示出与其等同的血液 MTX 浓度的剂量，优选 4-50mg/ 个体 / 周或显示出与其等同的血液 MTX 浓度的剂量，特别优选 10-25mg/ 个体 / 周或显示出与其等同的血液 MTX 浓度的剂量。

[0020] 显示出所述血药 ( 如 :抗 IL-6R 抗体 MTX) 浓度的剂量，是指产生等同疗效的剂量，即使血液浓度的转换随给药方法如静脉注射和皮下注射而变化时，只要疗效等同，该剂量就被认为是显示出所述血药 ( 如抗 IL-6R 抗体或 MTX) 浓度的剂量。

[0021] IL-6 相关疾病的例子包括，

[0022] 急慢性炎症和自身免疫疾病 :肾炎、肾小球膜增殖性肾炎 (mesangialproliferative nephritis)、Crohn 氏病、溃疡性结肠炎、胰腺炎、幼年型特发性关节炎或系统性幼年型特发性关节炎、血管炎、Kawasaki 氏病、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮 (systemic erythematosus)、银屑病、Sjogren 综合症、成人 Still 氏病 ;

[0023] 肿瘤疾病 :多发性骨髓瘤、Castleman 氏病、恶性淋巴瘤、肾癌 ;

[0024] 感染性疾病 :HIV 感染、EBV 感染 ;

[0025] 恶病质 (cachexia) :恶病质 ;

[0026] 其它 :浆细胞增多症，高免疫球蛋白血症，贫血等，优选类风湿性关节炎，浆细胞增多症，高免疫球蛋白血症，贫血，肾炎，恶病质，多发性骨髓瘤，Castleman 氏病，肾小球膜增殖性肾炎，系统性红斑狼疮，Crohn 氏病，胰腺炎，银屑病，幼年型特发性关节炎，或系统性幼

年型特发性关节炎。

[0027] 本发明的药物组合物可以口服或胃肠外以及全身或局部给药。例如，可以选择静脉注射，如滴注，肌肉注射，腹腔注射，皮下注射，栓剂，结肠注射，口服肠衣药等。给药方法可以根据患者年龄和状况适当选择。实际剂量的上下限受给药频率影响，例如：给药间隔长时每剂药的剂量增加，给药间隔短时每剂药的剂量减少。

[0028] 对于抗 IL-6 受体的抗体的优选剂量和给药方式，例如使血液中存在游离抗体的量是有效剂量。作为具体的例子，有分为一至几次给药的方法，例如，利用静脉注射，如滴注和皮下注射的方法，按照如下给药方案进行：2 次 / 周，1 次 / 周，1 次 /2 周，1 次 /4 周，1 次 /6 周，1 次 /8 周等。随着观察疾病情况和血液的实验数据的变化，给药方案可以进行调整，例如延长给药间隔从 2 次 / 周或 1 次 / 周到 1 次 /2 周，1 次 /3 周，1 次 /4 周，1 次 /6 周以及 1 次 /8 周。

[0029] 当与 MTX 组合给药时，例如在治疗类风湿性关节炎的情况下，典型地，抗 IL-6R 抗体的剂量高于 0.5mg/kg/ 周或者是显示出等同或更多抗风湿效果的剂量。例如，当 1 次 /4 周进行静脉给药时，剂量为 0.02-150mg/kg，优选 0.5-30mg/kg，更优选 2-8mg/kg。

[0030] 抗 IL-6R 抗体与免疫抑制剂可以同时给药或间隔一段时间给药。

[0031] 免疫抑制剂还包括抗风湿剂，肾上腺皮质激素剂等，并包括例如下列药物：

[0032] A. 免疫抑制剂，抗风湿剂，肾上腺皮质激素剂

[0033] 免疫抑制剂

[0034] 烷化剂

[0035] 环磷酰胺

[0036] 代谢拮抗剂

[0037] 硫唑嘌呤，甲氨蝶呤，咪唑立宾

[0038] T 细胞活性抑制剂

[0039] 环孢菌素，他克莫司

[0040] 抗风湿剂：

[0041] 羟氯喹，柳氮磺吡啶 (sulfasalazine)，来氟米特，依那西普，英夫利昔单抗 (infliximab)，阿达木单抗 (adalimumab)，D- 青霉胺，可口服金化合物，可注射金化合物 ( 肌肉注射 )，米诺环素，硫代苹果酸金钠，金诺芬，D- 青霉胺，氯苯扎利，布西拉明，阿克他利；

[0042] 肾上腺皮质激素剂：

[0043] 可的松，氢化可的松类

[0044] 醋酸可的松，氢化可的松，氢化可的松磷酸钠，氢化可的松琥珀酸钠，醋酸氟氢可的松

[0045] 泼尼松龙，泼尼松龙类

[0046] 泼尼松龙，泼尼松龙琥珀酸钠，泼尼松龙磷酸钠，醋酸卤泼尼松甲基泼尼松龙类

[0047] 甲基泼尼松龙，醋酸甲基泼尼松龙，甲基泼尼松龙琥珀酸钠曲安西龙类

[0048] 曲安西龙，醋酸曲安西龙，曲安西龙锕 (triamcinolone actinide) 地塞米松类

[0049] 地塞米松，醋酸地塞米松，地塞米松磷酸钠，地塞米松棕榈酸酯倍他米松类

[0050] 倍他米松 ( 倍他米松磷酸钠 )，倍他米松，倍他米松磷酸钠帕拉米松类

[0051] 醋酸帕拉米松

[0052] 免疫抑制剂的剂量，例如：在组合 MTX 治疗类风湿性关节炎时，例如在口服给药的情况下，为 1-100mg/ 个体 / 周，优选 4-50mg，更优选 7.5-25mg/ 个体。

[0053] 此外，抗 IL-6R 抗体的高剂量是指能预防或减少变态反应的剂量，该剂量等于或高于治疗 IL-6 相关疾病的最小有效剂量。例如，在治疗类风湿性关节炎且每 4 周进行静脉滴注的情况下，该剂量包括 4mg/kg 或更多，优选 6-16mg/kg，更优选 6-10mg/kg。

[0054] 上述的给药方法、给药间隔以及给药剂量是优选实例的举例。可以适当选择显示出相似疗效的给药方法、间隔和剂量。例如，可以通过测量血液中各种药物的浓度来选择与上述优选实例具有相似效果的给药方法、间隔和剂量。本发明包括可达到与上述实例具有等同血液浓度的给药方法、间隔和剂量。

## 具体实施方式

[0055] 用在本发明中的 IL-6 拮抗剂不需要考虑它的来源、类型、形式，只要它展示预防或治疗 IL-6 相关疾病的效果就可以。

[0056] IL-6 拮抗剂是抑制 IL-6 生物学活性的物质。IL-6 拮抗剂优选是具有抑制与 IL-6，IL-6R，或 gp130 的结合的效果的物质。IL-6 拮抗剂包括抗 IL-6 抗体、抗 IL-6R 抗体、抗 gp130 抗体、经修饰的 IL-6、经修饰的可溶性 IL-6R，或 IL-6 或 IL-6R 的部分肽，以及展示相似活性的低分子物质。

[0057] 用在本发明中的抗 IL-6 抗体可以用本领域已知的方法以单克隆或多克隆抗体的形式获得。就本发明中所用的抗 IL-6 抗体来说，优选来自哺乳动物的单克隆抗体。来自哺乳动物的单克隆抗体包括杂交瘤生产的抗体和通过基因工程技术用包含抗体基因的表达载体转化的宿主细胞生产的抗体。该抗体可通过与 IL-6 结合来抑制 IL-6 与 IL-6 受体的结合，从而阻断 IL-6 生物学活性信号传导进入细胞。

[0058] 这样的抗体包括 MH166(Matsuda，T.et al.，Eur.J.Immunol.，18：951-956，1988) 和 SK2(Sato，K.et al.，The 21st Proceedings of the JapaneseSociety for Immunology，21：166，1991)。

[0059] 产生抗 IL-6 抗体的杂交瘤可以基本按如下使用本领域已知的技术制备。即，杂交瘤可以根据标准免疫方法用 IL-6 作为致敏抗原进行免疫，然后将得到的免疫细胞用标准的细胞融合方法与本领域已知的亲本细胞进行融合，并用标准筛选方法筛选生产单克隆抗体的细胞而得到。

[0060] 具体地，抗 IL-6 抗体可以如下制备。例如，可以通过公开在 Eur.J.Biochem.，168：543-550，1987；J.Immunol.，140：1534-1541，1988 或者 Agr.Biol.Chem.，54：2685-2688，1990 的 IL-6 基因 / 氨基酸序列，获得用作致敏抗原以获得抗体的人 IL-6。

[0061] 将 IL-6 基因序列插入本领域已知的表达载体中，然后将其转化至合适的宿主细胞中，接着用本领域已知的方法从细胞或培养上清液中纯化目标 IL-6 蛋白，纯化的 IL-6 蛋白可以用作致敏抗原。同样，IL-6 与其它蛋白的融合蛋白也可以用作致敏抗原。

[0062] 用在本发明中的抗 IL-6 受体抗体可以通过本领域已知的方法以单克隆或多克隆抗体的形式获得。就用于本发明的抗 IL-6 受体抗体而言，优选来自哺乳动物的单克隆抗体。来自哺乳动物的单克隆抗体包括杂交瘤生产的抗体和通过基因工程技术用包含抗体基

因的表达载体转化宿主细胞而生产的抗体。该抗体可以通过与 IL-6 受体结合来抑制 IL-6 与 IL-6 受体的结合而阻断 IL-6 生物活性信号传导进入细胞。

[0063] 这样的抗体包括 MR16-1 抗体 (Tamura,T. et al.,Proc. Nat l. Acad. Sci. USA,90 :11924-11928,1993)、PM-1 抗体 (Hirata, Y. et al., J. Immunol.,143 :2900-2906,1989)、AUK-12-20 抗体、AUK64-7 抗体或 AUK146-15 抗体(国际专利申请公开 No. WO 92-19759)。其中,特别优选的抗体包括 PM-1 抗体。

[0064] 生产 PM-1 抗体的杂交瘤细胞系作为 PM-1,已经基于布达佩斯条约以保藏编号 FERM BP-2998 于 1989 年 7 月 12 日在国际专利生物保藏单位 (AIST TsukubaCentral 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki Pref.) 作出国际保藏。生产 MR16-1 抗体的杂交瘤细胞系作为大鼠 - 小鼠杂交瘤 MR16-1,已基于布达佩斯条约以保藏编号 FERM BP-5875 于 1997 年 3 月 13 日在国际专利生物保藏单位 (AIST Tsukuba Central 6,1-1, Higashil-chome, Tsukuba-shi, IbarakiPref.) 作出国际保藏。

[0065] 生产抗 IL-6 受体单克隆抗体的杂交瘤可以基本通过本领域已知的技术按如下制备。即,杂交瘤可以根据标准免疫方法用 IL-6 受体作为致敏抗原进行免疫,然后将得到的免疫细胞用标准的细胞融合方法与本领域已知的亲本细胞进行融合,用标准筛选方法筛选生产单克隆抗体的细胞而得到。

[0066] 具体地,抗 IL-6 受体抗体可以如下制备。例如,用作致敏抗原以获得抗体的人 IL-6 受体可以通过分别公开在欧洲专利申请公开 No. EP325474 和 JP-A-3-155795 的 IL-6 受体基因 / 氨基酸序列而获得。

[0067] IL-6 受体蛋白有两种类型,即,一种表达在细胞上,一种与细胞膜分离(可溶性 IL-6 受体)(Yasukawa, K. et al., J. Biochem., 108 :673-676)。可溶性 IL-6 受体基本上由 IL-6 受体的胞外区构成,它与膜结合 IL-6 受体的区别在于没有跨膜区或没有跨膜区及胞内区。只要被用作致敏抗原生产用于本发明的抗 IL-6 受体抗体,两种 IL-6 受体蛋白都可以使用。

[0068] 将 IL-6 受体的基因序列插入本领域已知的表达载体,转化其至合适的宿主细胞,接着用本领域已知的方法从细胞或培养上清液纯化目标 IL-6 受体蛋白,纯化的 IL-6 受体蛋白可以用作致敏抗原。同样,表达 IL-6 受体的细胞和 IL-6 受体与其它蛋白的融合蛋白也可以用作致敏抗原。

[0069] 质粒 pIBIBSF2R 包括编码人 IL-6 受体的 cDNA,包含该质粒的大肠杆菌 HB101-pIBIBSF2R 已基于布达佩斯条约以保藏号 FERM BP-2232 于 1989 年 1 月 9 日起在国际专利生物保藏单位 (AIST Tsukuba Central 6,1-1, Higashil-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki Pref.) 进行国际保藏。

[0070] 用在本发明中的抗 gp130 抗体可以通过本领域已知的方法以单克隆或多克隆抗体的形式获得。就用于本发明的抗 gp130 抗体来说,优选来自哺乳动物的单克隆抗体。来自哺乳动物的单克隆抗体包括杂交瘤生产的抗体和通过基因工程技术用包含抗体基因的表达载体转化宿主细胞而生产的抗体。该抗体可以通过与 gp130 结合来抑制 IL-6/IL-6 受体复合物与 gp130 的结合从而阻断 IL-6 的生物活性信号传导进入细胞。

[0071] 这样的抗体包括 AM64 抗体 (JP-A-3-219894)、4B11 抗体和 2H4 抗体 (US5571513)、B-S12 抗体以及 B-P8 抗体 (JP-A-8-291199)。

[0072] 生产抗 gp130 单克隆抗体的杂交瘤可以基本通过本领域已知的技术按如下制备。即，杂交瘤可以根据标准免疫方法用 gp130 作为致敏抗原进行免疫，将得到的免疫细胞用标准的细胞融合方法与本领域已知的亲本细胞进行融合，用标准筛选方法筛选生产单克隆抗体的细胞而得到。

[0073] 具体地，单克隆抗体可以如下制备。例如，用作致敏抗原以获得抗体的 gp130 可以通过使用公开在欧洲专利申请公开 No.EP 411946 的 gp130 基因 / 氨基酸序列而获得。

[0074] 将 gp130 的基因序列插入本领域已知的表达载体系统，转化其至合适的宿主细胞，接着用本领域已知的方法从细胞或培养上清液纯化目标 gp130 蛋白，纯化的 gp130 蛋白可以用作致敏抗原。同样，表达 gp130 的细胞和 gp130 蛋白与其它蛋白的融合蛋白也可以用作致敏抗原。

[0075] 用致敏抗原免疫的哺乳动物没有特别的限制，但优选在考虑与用于细胞融合的亲本细胞的相容性的情况下进行选择。一般来说，使用啮齿类动物如小鼠、大鼠和仓鼠。

[0076] 用致敏抗原免疫动物可以通过本领域已知的方法进行。作为常规方法，可以通过腹膜内或皮下给动物注射致敏抗原进行。特别是，优选致敏抗原适当地用 PBS（磷酸缓冲盐水）或盐水稀释和悬浮，其与适量的标准佐剂，例如弗氏完全佐剂混合，乳化，接着以间隔 4-21 天的方式几次给予哺乳动物。另外，可以在用致敏抗原免疫时使用合适的载体。

[0077] 动物按照上述方式免疫，然后确认所需抗体的血清水平是增加的。接着，从哺乳动物中取出免疫细胞用于细胞融合。优选地，用于细胞融合的免疫细胞特别包括脾细胞。

[0078] 就作为与上述免疫细胞融合的伙伴亲本细胞的哺乳动物骨髓瘤细胞来说，可以适当使用本领域已知的细胞系，例如：P3X63Ag8.653(Kearney, J.F.etal., J.Immunol., 123:1548-1550,1979)、P3X63Ag8U.1(Current Topics inMicrobiology and Immunology, 81:1-7,1978)、NS-1(Kohler, G.and Milstein, C., Eur.J.Immunol.,6:511-519,1976)、MOC-11(Margulies D.H.et al., Cell,8:405-415,1976), SP2/0(Shulman, M.et al., Nature,276:269-270,1978)、FO(de St.Groth,S.F.et al.,J.Immunol,Methods,35:1-21, 1980)、S194(Trowbridge, I.S.J.Exp.Med.,148:311-323,1978)、R210(Galfre,G.et al., Nature,277:131-133,1979)。

[0079] 上述免疫细胞与骨髓瘤细胞的细胞融合可以基本通过本领域已知的方法，例如：milstein 氏方法 (Kohler G.and Milstein C.,Methods Enzymol.,73:3-46,1981) 进行。

[0080] 更具体地，上述细胞融合可以例如在细胞融合促进剂存在时于标准营养培养基中进行。就细胞融合促进剂来说，例如：聚乙二醇 (PEG)，仙台病毒 (HVJ) 等都可以使用。可以根据需要进一步加入 / 使用辅助剂，例如：二甲亚砜以提高融合效率。

[0081] 免疫细胞与骨髓瘤细胞的应用比例优选为例如免疫细胞为骨髓瘤细胞的 1-10 倍。作为用于上述细胞融合的培养基，可以使用 RPMI 1640 培养基、适宜骨髓瘤细胞系生长的 MEM 培养基，以及可用于该类型细胞培养物的其他标准培养基，而且可以进一步与血清补充物，例如：胎牛血清 (FCS) 组合。

[0082] 为了细胞融合，可通过将上述免疫细胞与骨髓瘤细胞以给定量在上述培养基中彻底混合，加入 PEG 溶液，例如：加入在 37℃预热的标准浓度 30-60％ (w/v) 的平均分子量约 1000-6000 的 PEG 溶液，并混合，以形成目的融合细胞（杂交细胞瘤）。随后，可以通过重复相继地添加适宜培养基和离心除上清的操作而去除对杂交瘤生长不利的细胞融合剂等。

[0083] 杂交瘤可以通过在标准筛选培养基中，例如在 HAT 培养基（含次黄嘌呤，氨基蝶呤和胸腺嘧啶核苷的培养基）中培养而筛选。典型地，在 HAT 培养基中的培养持续几天至几周，足够的时间期限直至除了目的杂交瘤以外的其他细胞（非融合细胞）灭绝。然后采用标准极限稀释方法筛选和克隆生产目的抗体的杂交瘤。

[0084] 此外，除了通过用抗原免疫除人类以外的其它动物获得上述杂交瘤以外，也可以通过在体外用抗原蛋白或表达抗原的细胞致敏人淋巴细胞，然后将致敏 B 淋巴细胞与人骨髓瘤细胞，例如 U266 细胞（参见 JP-B-1-59878）融合而获得具有对期望抗原或表达该抗原的细胞的结合活性的所需人抗体。而且，也可以将抗原或抗原表达细胞给予含有人抗体基因所有组成部分的转基因动物，根据上述方法来获得所需人抗体（参见国际专利申请公开 Nos. WO 93/12227，WO92/03918，WO 94/02602，WO 94/25585，WO 96/34096，WO 96/33735）。

[0085] 以该方法制备的产生单克隆抗体的杂交瘤可以培养在标准培养基中，也可以长期贮存在液氮中。

[0086] 为了从杂交瘤获得单克隆抗体，可以使用以下方法：按标准方法培养杂交瘤，然后以培养上清液的形式获得单克隆抗体；或者将杂交瘤施用予相容的哺乳动物以增殖，然后以腹水形式获得单克隆抗体。前一方法适合获得高纯度抗体，后一方法适合大规模生产抗体。

[0087] 例如，可以用 JP-A-3-139293 公开的方法制备产生抗 IL-6 受体抗体的杂交瘤。所以实施如下方法：将产生 PM-1 抗体的杂交瘤腹膜内注射到 BALB/c 小鼠以获得腹水，然后从该腹水纯化 PM-1 抗体，其中产生 PM-1 抗体的杂交瘤基于布达佩斯条约以保藏号 FERM BP-2998 于 1989 年 7 月 12 日国际保藏在国际专利生物保藏单位（AIST Tsukuba Central 6，1-1，Higashil-chome，Tsukuba-shi，Ibaraki Pref.）。而且，可以实施如下方法：将此杂交瘤培养在合适的培养基中，例如：培养在 RPMI 1640 培养基、杂交瘤 SFM 培养基（GIBCO-BRL 提供）、或者含有 10％胎牛血清和 5％ BM-Condimed H1（Boehringer Mannheim 提供）的 PFHM-II 培养基（GIBCO-BRL 提供）中，然后从它的培养上清液纯化 PM-1 抗体。

[0088] 在本发明中，就单克隆抗体来说，可以用按如下方式制备的重组型抗体：从杂交瘤中克隆抗体基因，将该基因插入合适的载体，将其导入至宿主细胞以及采用基因工程技术（参见，例如，Borrebaeck，C.A.K. 和 Larrick，J.M.，Therapeutic Monoclonal Antibodies，Macmillan 出版社在英国出版，1990）。

[0089] 具体地，可以从产生目的抗体的细胞，例如杂交瘤分离编码抗体可变区（V）的 mRNA。为了分离 mRNA，可通过本领域已知的方法，例如胍超离心法（Chirgwin，J.M..et al.，Biochemistry，18：5294-5299，1979）、AGPC 法（Chomczynski，P.et al.，Anal.Biochem.，162：156-159，1987）制备总 RNA，然后使用 mRNA 纯化试剂盒（Pharmacia 提供）制备 mRNA。同样，mRNA 也可以通过 QuickPrepmRNA 纯化试剂盒（Pharmacia 提供）直接制备。

[0090] 可以从获得的 mRNA 用逆转录酶合成抗体 V 区的 cDNA。也可以使用 AMV 逆转录酶第一链 cDNA 合成试剂盒等合成 cDNA。同样，5′-Ampli FINDER RACE 试剂盒（Clontech 提供）和使用 PCR 的 5′-RACE 法（Frohman，M.A.et al.，Proc.Natl.Acad.Sci.USA，85：8998-9002，1988；Belyavsky A.et al.，NucleicAcids Res.，17：2919-2932，1989）也可以用于合成和扩增 cDNA。从所获的 PCR 产物纯化目的 DNA 片段，然后连接至载体 DNA。接着，将这种方法制备的重组载体导入至大肠杆菌，筛选菌落以制备所需重组载体。可以用本领

域已知的方法，例如脱氧法证实目的 DNA 的碱基序列。

[0091] 如果获得了编码目的抗体 V 区的 DNA，那么可以将该 DNA 与编码所需抗体的恒定区（C 区）的 DNA 连接，然后将其掺入表达载体中。或者，也可以将编码抗体 V 区的 DNA 掺入含有抗体 C 区的表达载体中。

[0092] 为了制备用于本发明的抗体，可以将抗体基因掺入表达载体以便在表达调控区，例如在下文中描述的增强子和启动子的调节下表达。接着，将该表达载体转化至宿主细胞以表达抗体。

[0093] 在本发明中，可以用人工修饰的基因重组抗体，例如：嵌合抗体、人源化抗体和人抗体以降低对人的同种异体抗原性。这些修饰抗体可以用已知方法制备。

[0094] 嵌合抗体可以通过待导入宿主进行生产的将上述获得的编码抗体 V 区的 DNA 与编码人抗体 C 区的 DNA 连接，然后掺入表达载体中而获得（参见欧洲专利申请公开 No.EP 125023，国际专利申请公开 No.WO92/19759）。利用这些已知方法，可以获得用在本发明中的嵌合抗体。

[0095] 例如，含有编码 PM-1 嵌合抗体 L 链和 H 链 V 区的 DNA 的质粒分别命名为 pPM-k3 和 pPM-h1，同时，含有这些质粒的大肠杆菌已基于布达佩斯条约于 1991 年 2 月 12 日分别以 NCIMB 40366、NCIMB 40362 国际保藏在国立工业和海洋微生物保藏有限公司（23 St.Machar Drive，Aberdeen AB2 1RY，苏格兰，英国）。

[0096] 人源化抗体也称重构的人抗体，它是非人哺乳动物例如小鼠的抗体的互补决定区（CDR）植入人抗体互补决定区的抗体，其常规基因重组方法也是已知的（参见欧洲专利申请公开 NO.EP 125023，国际专利申请公开 No.WO92/19759）。

[0097] 具体地，由在末端具有重叠部分的几个寡核苷酸通过 PCR 合成设计用于将小鼠抗体 CDR 与人类抗体构架区（FR）连接的 DNA 序列。所获 DNA 与编码人抗体 C 区的 DNA 连接，然后掺入表达载体，将该载体导入宿主细胞以产生人源化抗体（参见欧洲专利申请公开 EP 239400，国际专利申请公开 WO 92/19759）。

[0098] 就经由 CDR 连接的人抗体 FR 来说，选择使互补决定区形成良好抗原结合位点的 FR。抗体可变区的构架区氨基酸，如果需要，可以进行替代，以使重构的人抗体的互补决定区形成正确的抗原结合位点（Sato，K. et al.，Cancer Res.，53：851-856，1993）。

[0099] 人抗体 C 区可以用于嵌合抗体和人源化抗体。人抗体 C 区包括 Cγ，例如，Cγ1、Cγ2、Cγ3 或 Cγ4 都可以使用。可以修饰人抗体 C 区来提高抗体稳定性或其产量。

[0100] 嵌合抗体由源自非人哺乳动物的抗体的可变区和源自人抗体的 C 区构成。人源化抗体由源自非人哺乳动物抗体的互补决定区和源自人抗体的构架区和 C 区构成。因此这些抗体降低了在人体内的抗原性，从而可被用作本发明的抗体。

[0101] 用于本发明的人源化抗体的优选具体实例包括人源化 PM-1 抗体（参见国际专利申请公开 No.WO 92-19759）。

[0102] 同样，作为获得人抗体的方法，除了上述方法以外，利用人抗体文库通过淘选获得人抗体的技术也是已知的。例如，人抗体的可变区可以通过噬菌体展示方法作为单链抗体（scFv）表达在噬菌体表面，然后筛选结合抗原的噬菌体。分析筛选出的噬菌体的基因，可以确定编码结合抗原的人抗体的可变区的 DNA 序列。如果阐明了结合抗原的 scFv 的 DNA 序列，那么可以通过合适表达载体操作该序列以获得人抗体。这些方法已经是已知的且可以

引用 WO 92101047、WO92/20791、WO 93/06213、WO 93/11236、WO 93/19172、WO 95/01438 和 WO95/15388。

[0103] 上述构建的抗体基因可以用本领域已知的方法表达和获得。当使用哺乳动物细胞时，抗体基因可以由功能性地连接了常用启动子、要表达的抗体基因以及 3'下游 poly A 信号的 DNA 来表达，也可以由含有它们的载体来表达。例如：启动子/增强子可以包括人巨细胞病毒立即早期启动子/增强子。

[0104] 同样，对于能够用于本发明抗体的表达的其它启动子/增强子，可以使用反转录病毒、多瘤病毒、腺病毒、猿猴病毒 40(SV40) 的病毒启动子/增强子和源自哺乳动物细胞人延伸因子 1α(HEF1α) 的启动子/增强子。

[0105] 例如，可以根据 Mulligan 等的方法 (Mulligan, R.C.et al., Nature, 277:108-114, 1979) 在使用 SV40 启动子/增强子的情况下进行表达，或可以根据 Mizushima 等的方法 (Mizushima, S and Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18:5322, 1990) 在使用 HEF1α 启动子/增强子的情况下进行表达。

[0106] 对于大肠杆菌，可以通过功能性地连接常用启动子、抗原分泌信号序列和要表达的抗体基因来表达抗体基因。例如，启动子可以包括 lacZ 启动子和 araB 启动子。在使用 lacZ 启动子和 araB 启动子的情况下，可以分别采用 Ward 等的方法 (Ward, E.S.et al., Nature, 341:544-546, 1989; Ward, E.S.et al., FASEB J., 6:2422-2427, 1992) 和 Better 等的方法 (Better, M.et al., Science, 240:1041-1043, 1988)。

[0107] 作为抗体分泌信号序列，当在大肠杆菌周质中生产的情况下，可以使用 pelB 信号序列 (Lei, S.P.et al., Bacteriol., 169:4379-4383, 1987)。分离生产于周质中的抗体，接着进行适当的抗体结构重折叠以便使用抗体（参见，例如：WO 96/30394）。

[0108] 可以用源自 SV40、多瘤病毒、腺病毒、牛乳头瘤病毒 (BPV) 的复制起点。另外，为了在宿主细胞系统中扩增基因拷贝数，表达载体可以包括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该糖转移酶 (Ecogpt) 基因以及二氢叶酸还原酶 (dhfr) 基因等作为筛选标记。

[0109] 为了生产用于本发明的抗体，可以使用任选的生产系统。有制备抗体的体外和体内生产系统。体外生产系统包括使用真核细胞的生产系统和使用原核细胞的生产系统。

[0110] 在使用真核细胞的情况下，存在使用动物细胞、植物细胞或真菌细胞的生产系统。作为动物细胞已知 (1) 哺乳动物细胞，例如：CHO、COS、骨髓瘤细胞、BHK（幼仓鼠肾细胞）、HeLa、Vero 等，(2) 两栖动物细胞，例如：爪蟾卵母细胞，或者 (3) 昆虫细胞，例如：sf9、sf21、Tn5 等。作为植物细胞已知，源自烟草 (Nicotiana tabacum) 的细胞，它可以作为愈伤组织培养。作为真菌细胞已知酵母，例如酵母属 (Saccharomyces)，如酿酒酵母 (Sacchromycescerevisiae)，和丝状真菌，例如曲霉属 (Aspergillus)，如黑曲霉 (Aspergillusniger)。

[0111] 当使用原核细胞时，存在使用细菌细胞的生产系统。作为细菌细胞，已知大肠杆菌 (E.coli) 和枯草杆菌 (Bacillus sabtilis)。

[0112] 抗体可以通过将靶抗体基因经过转化导入这些细胞，然后体外培养转化的细胞而获得。培养可以根据本领域已知的方法进行。例如，可以用 DMEM、MEM、RPMI 1640 以及 IMDM 作为培养基，而且也可以与血清补充物，例如：胎牛血清 (FCS) 组合使用。抗体可以通过将

导入抗体基因的细胞转移至动物腹膜腔内而体内生产。

[0113] 另一方面，体内生产系统包括使用动物的生产系统和使用植物细胞的生产系统。当使用动物细胞的情况下，有使用哺乳动物和昆虫的生产系统。

[0114] 作为哺乳动物，可使用山羊，猪，绵羊，小鼠，牛及其它动物 (Vicki Glaser, Spectrum Biotechnology Applications, 1993)。同样，作为昆虫，可以使用蚕。当使用植物的情况下，例如，可以使用烟草。

[0115] 将抗体基因导入这些动物或植物，在动物或植物体内生产抗体，然后收集。例如，抗体基因可以通过插入编码天然产生在奶中的蛋白，例如山羊 β 酪蛋白的基因的中游，以融合基因形式制备。将包含有插入了抗体基因的融合基因的 DNA 片段注射至山羊胚胎，然后转移至雌性山羊。所需抗体可以从接受该胚胎的山羊生出的转基因山羊或其子代山羊的羊奶中获得。为了增加含所需抗体的奶的量，可以给转基因山羊使用合适的激素 (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology, 12 :699-702, 1994)。

[0116] 当使用蚕的情况下，用插入了靶抗体基因的杆状病毒感染蚕，然后从蚕体液获得所需抗体 (Maeda, S. et al., Nature, 315 :592-594, 1985)。进一步，当使用烟草的情况下，将靶抗体基因插入植物表达载体，例如 :pMON 530，然后将该载体导入细菌，例如 :根癌土壤杆菌。用这些细菌感染烟草，例如 Nicotiana tabacum，从该烟草的叶子得到所需抗体 (Julian, K.C., Ma, etal., Eur. J. Immunol., 24 :131-138, 1994)。

[0117] 在用如上所述体外或体内生产系统生产抗体时，编码抗体重链 (H 链 ) 或轻链 (L 链 ) 的 DNA 可以分开掺入表达载体，可将这些载体同时转化宿主细胞，或者将编码 H 链和 L 链的 DNA 掺入单个表达载体，可以用该载体转化宿主 ( 参见国际专利申请公开 No. WO 94-11523)。

[0118] 用在本发明中的抗体可以是抗体片段或其修饰物，只要抗体适合使用就可以。例如，抗体片段包括例如 :Fab, $F(ab')^2$, Fv 或者单链 Fv(scFv)，在 ScFv 中由合适接头连接 H 链和 L 链的 Fv。

[0119] 具体地，可以用酶，例如 :木瓜蛋白酶、胃蛋白酶处理抗体以产生抗体片段，或可以构建编码抗体片段的基因，将该基因导入表达载体，然后在合适宿主细胞中表达 ( 参见，例如 :Co, M.S. et al., J. Immunol., 152 :2968-2976, 1994 ;Better, M. & Horwitz, A.E., Methods in Enzymology, 178 :476-496, 1989 ;Plueckthun, A. & Skerra, A., methods in Enzymology, 178 :476-496, 1989 ;Lamoyi, E., Methods in Enzymology, 121 :652-663, 1989 ; Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology, 121 :663-66, 1989 ;Bird, R.E. et al., TIBTECH, 9 :132-137, 1991)。

[0120] 通过连接 H 链 V 区与 L 链 V 区获得 scFv。在该 scFv 中，H 链 V 区和 L 链 V 区优选通过接头，特别是肽接头连接 (Huston, J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 :5879-5883, 1988)。scFv 中 H 链 V 区和 L 链 V 区可以来自如上所述的任何抗体。对于连接 V 区的肽接头，可以使用例如由 12-19 个氨基酸残基构成的给定竟单链肽。

[0121] 以编码上述抗体的 H 链或 H 链的 V 区以及 L 链或 L 链的 V 区的 DNA 为模板，使用定义编码期望氨基酸序列的 DNA 部分的末端的引物，通过 PCR 方法扩增模板中编码期望氨基酸序列的 DNA 部分 ;然后进一步组合定义待与 H 和 L 链连接的肽接头部分两端的引物，扩增编码肽接头部分及所述两端的 DNA，由此获得编码 scFv 的 DNA。

[0122] 此外,一旦获得编码 scFv 的 DNA,可根据标准方法获得含有它的表达载体以及用该表达载体转化的宿主,然后可根据标准方法使用宿主获得 scFv。

[0123] 对这些抗体片段来说,它们的基因可以如同以上一样获得,并通过宿主表达和生产。本发明所说的“抗体”包括这些抗体片段。

[0124] 作为对抗体的修饰,也可以用与各种分子诸如聚乙二醇 (PEG) 结合的抗体。本发明所说的“抗体”包括这些抗体修饰物。要获得这样的抗体修饰物,可以通过对获得的抗体进行化学修饰。这些方法在本领域中已经建立。

[0125] 如上述生产和表达的抗体可以从细胞内和细胞外及宿主内和宿主外分离,并纯化成均质的。可以用亲和层析进行用于本发明的抗体的分离和纯化。用于亲和层析的柱子包括,例如 :蛋白 A 柱和蛋白 G 柱。用于蛋白 A 柱的载体包括 Hyper D、POROS、Sepharose F.F. 等。用于常规蛋白的其它分离 / 纯化方法都可以使用,对所用方法没有限制。

[0126] 例如,可以适当选择和组合上述亲和层析以外的层析、过滤、超滤、盐析以及透析等,以分离和纯化用于本发明的抗体。层析的例子包括 :离子交换层析、疏水层析、凝胶过滤等。这样的层析可以应用于 HPLC( 高效液相层析 )。另外,也可以使用反相 HPLC。

[0127] 可以通过测吸光度或通过 ELISA 测量上述所获的抗体浓度。即,当测吸光度时,用 PBS(-) 适当稀释抗体,接着测在 280mm 的吸光度,以 1.35OD = 1mg/ml 计算浓度。当使用 ELISA 时,可如下进行测量。即,用 0.1M 碳酸氢盐缓冲液 (pH 9.6) 将山羊抗人 IgG(TAG 公司提供 ) 稀释至 1μg/ml,加入 100ml 此 IgG 至 96 孔板中 (Nunc 公司提供 ),然后 4℃过夜温育使抗体固定。封闭之后,加入 100μl 适当稀释的本发明抗体或含抗体的样本,或者作为标准的人 IgG(Cappel 公司提供 ),然后室温温育 1 小时。

[0128] 洗涤之后,再加入 100μl 稀释 5000 倍的碱性磷酸酶标记的抗人 IgG(BioSource 公司提供),然后室温温育 1 小时。洗涤后,加入底物溶液,温育,接着用 Microplate Reader Model 3550 仪 (Bio-Rad 提供 ) 测量 405mm 的吸光度以计算靶抗体浓度。

[0129] 用于本发明中的经修饰的 IL-6 是具有 IL-6 受体结合活性但是不能传递 IL-6 生物活性的物质。即,虽然经修饰的 IL-6 可与 IL-6 竞争性地结合 IL-6 受体,但是由于它不能传递 IL-6 的生物学活性,所以它可以阻断 IL-6 的信号转导。

[0130] 可以通过替代 IL-6 氨基酸序列中的氨基酸残基引入变异来获得经修饰的 IL-6。作为经修饰的 IL-6 的来源的 IL-6 可以获自任何来源,但考虑到抗原性优选人 IL-6。

[0131] 具体地,IL-6 的修饰可以用本领域已知的分子建模程序,例如 WHATIF(Vriend et al.,Mol.Graphics,8 :52-56,1990) 预测 IL-6 氨基酸序列二级结构,进一步评价要替代的氨基酸残基对整个蛋白的影响而进行。在确定合适的将要替代的氨基酸残基之后,用含有编码人 IL-6 基因的碱基序列的载体作为模板,通过常规 PCR 法导入使氨基酸被替代的变异,而获得经修饰的 IL-6 的编码基因。通过将该编码基因掺入合适的所需载体中,然后再进行上文中记载的重组抗体表达、生产和纯化方法,可以获得经修饰的 IL-6。

[0132] 修饰的 IL-6 的具体例子公开在 Brakenhoff et al.,J.Biol.Chem.,269 :86-93,1994 和 Savino et al.,EMBO J.,13 :1357-1367,1994,WO 96/18648 和 WO 96/17869。

[0133] 用于本发明的 IL-6 的部分肽或 IL-6 受体的部分肽分别具有结合 IL-6 受体或 IL-6 的活性,并且是不传递 IL-6 的生物活性的物质。即,IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽分别通过结合和俘获 IL-6 受体或 IL-6 而特异性地抑制 IL-6 与 IL-6 受体的结合。结果,

由于它们不传递 IL-6 生物活性，所以它们可以阻断由 IL-6 引起的信号传导。

[0134] IL-6 的部分肽或 IL-6 受体的部分肽是由 IL-6 或 IL-6 受体的氨基酸序列中参与 IL-6 与 IL-6 受体结合的部分或全部氨基酸序列组成的肽。这样的肽通常由 10-80 个氨基酸残基组成，优选 20-50 个，更优选 20-40 个。IL-6 的部分肽或 IL-6 受体的部分肽可以通过确定 IL-6 或 IL-6 受体的氨基酸序列中参与和 IL-6 或 IL-6 受体结合的区域，然后用已知的常规方法，例如：基因工程技术或肽合成法合成其部分或全部氨基酸序列来制备。

[0135] 为了通过基因工程技术获得 IL-6 的部分肽或 IL-6 受体的部分肽，可以将编码所需肽的 DNA 序列插入至表达载体，然后再进行上文中记载的重组抗体表达、生产和纯化的方法即可。

[0136] 为了通过肽合成法制备 IL-6 的部分肽或 IL-6 受体的部分肽，可以用肽合成的典型方法，例如：固相合成法或液相合成法。

[0137] 具体地，可以根据 Zoku Iyakuhin，Kaihatu Vol.14 Peptide Gosei，(Ed.，Yajima，H.，Hirokawa Shoten，1991) 记载的方法进行合成。对于固相合成方法来说，例如，可以使用如下方法：通过将对应于将要合成的肽的 C 末端的氨基酸结合至不溶于有机溶剂的支持物上，然后交替地重复从氨基酸 C 末端至 N 末端方向顺序地缩合一个（氨基酸氨基酸中以合适的保护基团保护了 α－氨基基团及侧链官能基团）的反应，以及消除树脂上附着的氨基酸或肽的 α－氨基基团的保护基团的反应，而使肽链延伸。固相合成法根据所用的保护基团的类型可粗略地分为 Boc 法和 Fmoc 法。

[0138] 在靶肽以这种方法合成之后，再进行去保护反应和肽链从支持物上断裂下来的反应。在肽链的断裂反应中，典型地在 Boc 法和 Fmoc 法中茴香醚分别使用氟化氢或者三氟甲烷磺酸和 TFA。在 Boc 法中，上述保护的肽－树脂在茴香醚存在下用氟化氢处理，然后进行保护基团的去除和肽从支持物上的断裂分离以回收肽。将肽冷冻干燥产生粗制肽。另一方面，在 Fmoc 法中，例如：在 TFA 中，以上述相同的操作方法进行去保护反应和肽链从支持物分离的断裂反应。

[0139] 将获得的粗制肽用 HPLC 分离和纯化。在最佳的条件下用典型用来纯化蛋白的水－乙腈溶剂洗脱。收集并且冷冻干燥所获层析图中的对应于峰的级分。上述方法纯化得到的肽级分可以通过质谱分子量分析、氨基酸构成分析或氨基酸序列分析进行鉴定。

[0140] IL-6 和 IL-6 受体的部分肽的具体实例公开于 JP-A-2-188600，7-324097 和 8-311098，以及美国专利 5210075。

[0141] 本发明的药物组合物根据其给药方式可以含有药学上可接受的载体和添加剂。载体和添加剂的例子包括：水、药学上可接受的有机溶剂、胶原蛋白，聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧基乙烯基聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、精氨酸钠、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、琼脂糖、双甘油、丙二醇、聚乙二醇、凡士林、石蜡、十八烷醇、硬脂酸、人血清白蛋白 (HSA)、甘露醇、山梨醇、乳糖、作为药物添加剂的可接受的表面活性剂等。根据剂型，所用添加剂可以从上文适当选择或适当的组合选择，但并不局限于此。

[0142] 实施例

[0143] 本发明在下文通过实施例和参考实施例具体描述，但本发明并不局限于此。

[0144] 实施例 1：

[0145] MRA 是重组人源化的 IgG1 亚类抗人白介素 -6 受体的单克隆抗体，它可以抑制细胞因子白介素 -6(IL-6) 的功能。在日本和欧洲的早期研究中，MRA 显示了治疗类风湿性关节炎的前景，而且它有很好的耐受性。

[0146] 本实施例是确定 MRA 单独给药和与氨甲蝶呤组合给药治疗类风湿性关节炎时 MRA 的最佳剂量的 II 期大型试验。在尽管已用氨甲蝶呤治疗过规定的一段时期的活性类风湿性关节炎患者中，对 MRA 静脉重复给药（单独治疗和与氨甲蝶呤组合治疗）的潜在功效进行了评估，并且将该功效与氨甲蝶呤单独治疗进行了比较。评估了 MRA 的有效性、安全性及耐受性。

[0147] 方法：

[0148] 研究对象：入选了基于美国风湿病学会 (ACR) 的 1987 疾病分类而诊断出的为期至少 6 个月的类风湿性关节炎患者。患者必须患有活动性疾病，并且他们对以至少 12.5mg/ 周或 10mg/ 周剂量（在非耐受性情况下）施用至少 6 个月的 MTX 无充足应答或有疾病的突发。

[0149] 研究设计：通过中心随机法进行双盲、随机、平行组研究

[0150] 剂量和给药方式：七组：0mg/kg（安慰剂）+MTX、2mg/kg MRA+MTX、4mg/kgMRA+MTX、8mg/kg MRA+MTX、2mg/kg MRA+MTX 安慰剂、4mg/kg MRA+MTX 安慰剂和 8mg/kg MRA+MTX 安慰剂。MRA 或安慰剂通过静脉输注以 4 周为间隔进行给药。MTX 或 MTX 安慰剂通过口服，每周 1 次，10-25mg/ 周给药。

[0151] 研究方法：将指定剂量通过静脉输注以 4 周为间隔共给药 4 次，每隔 2 周直到 16 周评估功效和安全性，并在第 20 周随访观察。功效研究的第一终点 (primary endpoint) 为在第 16 周（最后给药之后 4 周）的 ACR 20 比率。第二终点 (secondary endpoint) 包括在第 16 周（最后给药之后 4 周）ACR 50 和 ACR 70 的比率。

[0152] ACR 改善标准：当在以下 7 项中，肿胀关节数和疼痛关节数改善 20％或更多而且在剩余 5 项的 3 项中观察到 20％或更大的改善时，这种病例被确定为 20％或更高的 ACR 改善标准。此外，50％和 70％改善的病例是指上述 20％改善的部分分别被改善了 50％和 70％的病例。

[0153] (1) 肿胀关节数

[0154] (2) 触痛关节数

[0155] (3) 患者对疼痛的评估

[0156] (4) 患者对疾病活动的总体性评估

[0157] (5) 医师对疾病活动的总体性评估

[0158] (6) 患者对生理功能的评估

[0159] (7)CRP 或 ESR

[0160] 表 1

[0161]

| | 2mg/kg MRA | 4mg/kg MRA | 8mg/kg MRA | MTX |
|---|---|---|---|---|
| ACR 20 | 30.8％ | 61.1％ | 62.7％ | 40.8％ |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| ACR 50 | 5.8% | 27.8% | 41.2% | 28.6% |
| ACR 70 | 1.9% | 5.6% | 15.7% | 16.3% |
| | 2mg/kg MRA+MTX | 4mg/kg MRA+MTX | 8mg/kg MRA+MTX | |
| ACR 20 | 64.0% | 63.3% | 73.5% | |
| ACR 50 | 32.0% | 36.7% | 53.1% | |
| ACR 70 | 14.0% | 12.2% | 36.7% | |

[0162] 与对照组相比，除了 MRA 单独给药的 2mg/kg 组以外，在所有组中都观察到统计学显著较高的 ACR 20 改善率。在 MRA 8mg/kg+MTX 组中，ACR50 和 70 改善率分别是 53.1%和 36.7%，统计学显著高于对照组的改善率，对照组的改善率分别是 28.6%和 16.3%。在 MRA 单独给药组中，在 ACR20 改善率中观察到统计学显著性的剂量依赖性。此外，对 ACR50 和 ACR70 改善率而言，在 MRA 单独给药和与 MTX 组合给药组中均观察到统计学显著的剂量依赖反应。

[0163] 肿胀关节计数减少(表 2)

[0164] 平均肿胀关节计数在所有治疗组中于基线都是相似的。

[0165] 随着所有七个治疗组的药物暴露持续时间的增加，平均肿胀关节计数从基线起累积减少。MRA 8mg/kg 组的肿胀关节计数的平均减少量与 MTX 组的减少相比具有统计学显著性 ($p = 0.010$)。在第 16 周，MRA 8mg/kg 组与 MTX 组的平均差异 (95% CI) 是 -2.31(-4.07，-0.55)。在 MRA 单独治疗组之间具有统计学显著性的线性剂量关系 ($p < 0.001$)。MRA 8mg/kg+MTX 组的肿胀关节计数的平均减少量与 MTX 组的减少相比，具有统计学显著性 ($p < 0.001$)。MRA 8mg/kg+MTX 组与 MTX 组的平均差异 (95% CI) 是 -3.62(-5.39,-1.84)。在 MRA 组合治疗组之间存在统计学显著性的线性剂量关系 ($p = 0.004$)。

[0166] 表 2

[0167]

| | 2mg/kg MRA | 4mg/kg MRA | 8mg/kg MRA | MTX |
|---|---|---|---|---|
| 基线：<br>N<br>平均值 ±SD | <br>52<br>11.6±4.6 | <br>54<br>11.1±4.4 | <br>51<br>12.2±5.2 | <br>49<br>12.7±4.2 |
| 与基线相比的变化：<br>第 16 周 N<br>平均值 ±SD | <br>42<br>-4.5±5.7 | <br>43<br>-5.8±4.1 | <br>43<br>-8.4±4.6 | <br>39<br>-5.7±6.1 |

| | 2mg/kg MRA+MTX | 4mg/kg MRA+MTX | 8mg/kg MRA+MTX | |
|---|---|---|---|---|
| 基线：<br>N<br>平均值 ±SD | <br>50<br>11.9±4.3 | <br>49<br>11.9±3.9 | <br>49<br>11.8±3.9 | |
| 与基线相比的变化：<br>第 16 周 N<br>平均值 ±SD | <br>46<br>-6.2±4.6 | <br>42<br>-6.8±5.4 | <br>44<br>-9.4±4.0 | |

[0168] 在 359 名入选的患者中，安全评估组、完全分析组及 PPS（每方案组，perprotocol set）分别是 359 人、354 人和 307 人。总共入选了 359 名患者，299 个完成了研究，60 个退出。在退出的患者中，33 个因为不良反应，1 个因为并发其它疾病，7 个因为不良反应，7 个因为使用了禁止伴随使用的药物，5 个因为知情同意 (informed consent) 的撤消，1 个因为错过了随访，22 个因为缺乏效果（包括多种原因）。

[0169] 在不能否认因果关系的严重不良反应中，报道有 5 例感染。即，报道在 2mg/kg MRA 组中有 1 个患者患脚脓肿和骨髓炎，在 8mg/kg MRA+MTX 组中有 1 个患者出现胸部感染和胸膜炎，以及有 1 个患者患败血病，在 8mg/kg MRA+MTX 组中有 1 个患者患败血病，以及在 8mg/kg MRA+MTX 组中有 1 个患者患关节感染。此外，还有 5 例作为不能否认因果关系的严重不良反应报道的过敏，即，报道在 2mg/kg MRA 组中有 4 个患者过敏，在 4mg/kg MRA 组中有 1 个患者过敏。所有这些过敏事件都发生在不与 MTX 组合的情况下第 3 次或第 4 次 MRA 给药后。

[0170] 就肝功实验室数据值而言，虽然作为 MRA 用药的结果，观察到 ALT 和 AST 水平升高，但是这些升高与在其它类风湿性关节炎患者中观察到的相当。在 MRA 组中观察到了脂质（总胆固醇，HDL 胆固醇和甘油三酯）相关实验室数据的增加。不过，致动脉硬化指数 (Atherogenic Index) 总体没有变化。

[0171] 在一些患者中发生了嗜中性粒细胞计数的轻微暂时减少。观察到疾病活动参数，即 CRP 和 ESR 的减少以及血红蛋白的升高以剂量依赖方式发生临床显著变化。

[0172] <u>输注反应</u>

[0173] 输注反应定义为所研究的药物施用 24 小时内发生的不良反应。每一治疗组中出现输注反应的患者的数量提示 MRA 的可能的反剂量反应 (inversedose-response)。

[0174] <u>抗 -MRA 抗体</u>

[0175] 检测了抗 -MRA 抗体的产生。在 8mg/kg 治疗组（单独治疗或与 MTX 组合治疗）中没有抗体产生。在 2 或 4mg/kg 治疗组中，MTX 组合治疗组比 MRA 单独治疗组出现较少的抗体产生事件。

[0176] 结果

[0177] 在 MA 单独治疗及 MRA 与氨甲蝶呤的组合治疗中，均观察到了明显的剂量反应。在 MRA 单独治疗和 MRA 与氨甲蝶呤组合治疗中均证实了 MRA 治疗类风湿性关节炎患者的有效性。此外，也在 MRA 单独治疗和 MRA 与氨甲蝶呤组合治疗中证实 MRA 的安全性。

[0178] 参考实施例 1. 可溶性人 IL-6 受体的制备

[0179] 可溶性 IL-6 受体是使用按照 Yamasaki 等人的方法 (Yamasaki, K. et al., Science, 241 : 825-828, 1988) 获得的含有编码 IL-6 受体的 cDNA 的质粒 pBSF2R.236 通过 PCR 法制备的。将质粒 pBSF2R.236 用限制性酶 Sph1 消化获得 IL-6 受体 cDNA，然后将该 cDNA 插入 mp18(Amersham 提供)。使用设计用来在 IL-6 受体的 cDNA 中导入终止密码子的合成寡聚引物通过体外突变系统 (Amersham 提供) 以 PCR 法将变异导入 IL-6 受体 cDNA。该操作在氨基酸 345 位置上导入终止密码子以获得编码可溶性 IL-6 受体的 cDNA。

[0180] 将可溶性 IL-6 受体 cDNA 与质粒 pSV(Pharmacia 提供) 连接，获得质粒 pSVL344 以便在 CHO 细胞中表达该 cDNA。将 HindIII-SalI 消化过的溶性 IL-6 受体 cDNA 插入含有 dhfr 的 cDNA 的质粒 pECEdhfr 中以获得 CHO 细胞表达质粒 pECEdhfr344。

[0181] 使用磷酸钙沉淀法 (Chen, C. et al., Mol. Cell Biol., 7 : 2745-2751, 1987)，将 10 μ g 的 pECEdhfr344 质粒转染到 dhfr-CHO 细胞系 DXB-11(Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77 : 4216-4220, 1980) 中。将转染的 CHO 细胞在含有 1mM 谷氨酰胺、10% 透析的 FCS、100U/ml 青霉素以及 100 μ g/ml 链霉素且不含核苷的 α MEM 选择培养基中培养 3 周。

[0182] 用极限稀释法筛选选定的 CHO 细胞，得到 CHO 细胞的单克隆。将该 CHO 克隆用浓度 20nM-200nM 的氨甲蝶呤扩增，以获得生产人可溶性 IL-6 受体的 CHO 细胞系 5E27。将 CHO 细胞系 5E27 在含有 5% FBS 的 Iscove 氏改良 Dulbecco 培养基 (IMDM, Gibco 提供) 中培养。收集培养上清液，用 ELISA 测量培养上清液中可溶性 IL-6 受体浓度。结果，证实培养上清液中存在可溶性 IL-6 受体。

[0183] 参考实施例 2. 抗人 IL-6 抗体的制备

[0184] 用 10 μ g 重组 IL-6(Hirano, T. et al., Immunol. Lett., 17 : 41, 1988) 及弗氏完全佐剂一起免疫 BALB/c 小鼠，每隔一周继续免疫，直到血清中检测到抗 IL-6 抗体。从局部淋巴结获得免疫细胞，用聚乙二醇 1500 将该免疫细胞与骨髓瘤细胞系 P3U1 融合。用 HAT 培养基按照 Oi 等的方法 (Selective Methodsin Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) 筛选杂交瘤，建立产生抗人 IL-6 抗体的杂交瘤。

[0185] 对产生抗人 IL-6 抗体的杂交瘤按如下方法进行 IL-6 结合分析。即，将柔韧的聚乙烯 96 孔微量板 (Dynatech Laboratories, Inc., Alexandra, VA 提供) 用 100 μ l 山羊抗小鼠 Ig(10 μ l/ml ; Cooper Biomedical Inc. 提供, Malvern, PA) 在 0.1M 碳酸氢盐 - 碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 中在 4℃包被过夜。接着，在室温下用 100 μ l 含 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 处理平板 2 小时。

[0186] 用 PBS 洗涤该平板，接着将 100 μ l 杂交瘤培养上清液加入每孔，在 4℃温育过夜。洗涤平板，接着将 $^{125}$I 标记的重组 IL-6 加入每孔至 2000cpm/0.5ng/ 孔，然后再洗涤平板，随后用 γ 计数器 (Beckman Gamma 9000, BeckmanInstruments, Fullerton, CA) 测量每孔的放射性。结果，在 IL-6 结合分析中 216 个杂交瘤克隆中有 32 个是阳性。在这些克隆中，最后获得稳定克隆 MH166.BSF2。由该杂交瘤产生的抗 IL-6 抗体 MH166 是 IgG1 κ 亚型。

[0187] 接着，用 IL-6 依赖性的小鼠杂交瘤克隆 MH60.BSF2 针对杂交瘤生长检测 MH166 抗体的中和活性。将 MH60.BSF2 细胞以 $1\times10^4$/200 μ l/ 孔分配，加入含 MH166 抗体的样品，接着培养 48 小时，再加入 0.5 μ Ci/ 孔 $^3$H 胸苷 (New EnglandNuclear, Bos ton, MA)。在另

外再培养 6 小时之后,将细胞放置在玻璃滤纸上,用自动收集仪(Labo Mash Science Co.,Tokyo,Japan)处理。兔抗 IL-6 抗体用作对照。

[0188] 结果,MH166 抗体以剂量依赖的方式抑制了由 IL-6 诱导的 MH60.BSF2 细胞对 $^{3}$H 胸苷的吸收。这表明 MH166 抗体中和了 IL-6 的活性。

[0189] 参考实施例 3. 抗人 IL-6 受体抗体的制备

[0190] 将按照 Hirano 等的方法(Hirano,Y.et al.,J.Immunol.,143 :2900-2906,1989)制备的抗 IL-6 受体抗体 MT18 与根据所附方案以 CNBr 激活的琼脂糖 4B(Pharmacia Fine Chemicals 提供 ;Piscataway,NJ)结合,以此纯化 IL-6 受体(Yamasaki,K.et al.,Science,241 :825-828,1988)。用 1mM 含 1%毛地黄皂苷(Wako Chemicals 公司提供),10mM 乙醇胺(pH 7.8)和 1.5M NaCl 的 1mm 对氨基苯基甲磺酰氟盐酸盐(Wako Chemicals 公司提供)(毛地黄皂苷缓冲液)将人骨髓瘤细胞系 U266 溶解,与结合在琼脂糖 4B 珠上的 MT18 抗体混合。接着,将小珠用毛地黄皂苷缓冲液洗涤 6 次,使之作为部分纯化的 IL-6 受体用于免疫。

[0191] 用从 $3\times10^{9}$ 个 U266 细胞获得的上述部分纯化的 IL-6 受体每 10 天 4 次对 BALB/c 小鼠进行免疫,接着用标准方法制备杂交瘤。用下列方法在来自生长阳性孔的杂交瘤上清液中进行 IL-6 受体结合活性检查。$5\times10^{7}$ 个 U266 细胞用 $^{35}$S- 甲硫氨酸(2.5mCi)标记,用上述毛地黄皂苷缓冲液溶解。将体积 0.04ml 的结合在琼脂糖 4B 珠上的 MT18 抗体与溶解的 U266 细胞混合,接着用毛地黄皂苷缓冲液洗涤 6 次,再用 0.25ml 毛地黄皂苷缓冲液(pH 3.4)洗脱 $^{35}$S- 甲硫氨酸标记的 IL-6 受体,用 0.025ml 的 1M Tris(pH 7.4)中和。

[0192] 将杂交瘤培养上清(0.05ml)与 0.01ml 蛋白 G 琼脂糖(Pharmacia 提供)混合。洗涤之后,将琼脂糖与 0.005ml 上述制备的 $^{35}$S- 甲硫氨酸标记的 IL-6 受体溶液温育。用 SDS-PAGE 分析免疫沉淀物,检测与 IL-6 受体反应的杂交瘤培养上清。从而,建立了阳性反应杂交瘤克隆 PM-1(FERM BP-2998)。杂交瘤 PM-1 产生的抗体是 IgGκ 亚型。

[0193] 用人骨髓瘤细胞系 U266 就杂交瘤 Pm-1 产生的抗体对 IL-6 与人 IL-6 受体结合的抑制活性进行了检测。从大肠杆菌制备人重组 IL-6(Hirano,T.et al.,Immunol.Lett.,17 :41-45,1988),并用 Bolton-Hunter 试剂(New EnglandNuclear,Boston,MA)进行 $^{125}$I 标记。

[0194] 将 U266 细胞以 $4\times10^{5}$ 与 70%(v/v)杂交瘤 PM-1 培养上清以及 14000cpm 的 $^{125}$I 标记的 IL-6 一起培养。将样品(70μl)铺在 400μl 的微离心聚乙烯管中的 300μl FCS 上,离心,测量细胞放射性。

[0195] 结果,杂交瘤 PM-1 产生的抗体显示可抑制 IL-6 与 IL-6 受体的结合。

[0196] 参考实施例 4. 抗小鼠 IL-6 受体抗体的制备

[0197] 通过 Saito,T.et al.,J.Immunol.,147 :168-173,1991 记载的方法制备抗小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体。

[0198] 将可产生小鼠可溶性 IL-6 受体的 CHO 细胞地含有 10% FCS 的 IMDM 培养基中培养,用 Affigel 10 凝胶(Biorad 提供)上固定了抗小鼠 IL-6 受体抗体 RS12(参见上文 Saito,T.et al.)的亲和柱,从培养上清纯化小鼠可溶性 IL-6 受体。

[0199] 将得到的小鼠可溶性 IL-6 受体(50μg)与弗氏完全佐剂混合,将其注射至 Wistar 大鼠腹腔。两周后,用弗氏不完全佐剂开始再次免疫。在第 45 天,取大鼠脾细胞,用 50% 的 PEG1500(Boehringer Mannheim 提供)按标准方法将 $2\times10^{8}$ 个细胞与 $1\times10^{7}$ 个小鼠骨

髓瘤 P3U1 细胞融合,接着在 HAT 培养基中筛选杂交瘤。

[0200] 将杂交瘤培养上清液加入至用兔抗大鼠 IgG 抗体 (Cappel 提供) 包被的平板中,然后与小鼠可溶性 IL-6 受体反应。接着,用兔抗小鼠 IL-6 受体抗体和碱性磷酸酶标记的绵羊抗兔 IgG 通过 ELISA 法筛选产生抗小鼠可溶性 IL-6 受体的抗体的杂交瘤。将确认产生该抗体的杂交瘤克隆亚克隆两次,获得杂交瘤单克隆。将该克隆命名为 MR16-1。

[0201] 通过使用 MH60.BSF2 细胞 (Matsuda, T. et al., J. Immunol., 18 :951-956, 1988) 对 $^3$H 胸苷的吸收,检测该杂交瘤产生的抗体对小鼠 IL-6 信号传导的中和活性。将 MH60.BSF2 细胞在 96 孔平板中制备成 $1\times10^4$ 细胞 /200μl/ 孔。在平板中加入 10pg/ml 的小鼠 IL-6 和 12.3-1000ng/ml 的 MR16-1 抗体或 RS12 抗体,接着在 5% $CO_2$,37℃下培养 44 小时,接着再加入 1μCi/ 孔的 $^3$H 胸苷。4 小时后,测定 $^3$H 胸苷的吸收。结果,MR16-1 抗体抑制了 MH60.BSF2 细胞对 $^3$H 胸苷的吸收。

[0202] 因此,杂交瘤 MR16-1(FERM BP-5875) 产生的抗体被证实可以抑制 IL-6 与 IL-6 受体的结合。