(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102387814 A
(43)申请公布日 2012.03.21

(21)申请号 201080010391.5

(22)申请日 2010.01.29

(30)优先权数据
61/148,106 2009.01.29 US
61/184,182 2009.06.04 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2011.08.29

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2010/022478 2010.01.29

(87)PCT申请的公布数据
WO2010/088444 EN 2010.08.05

(71)申请人 米迪缪尼有限公司
地址 美国马里兰州

(72)发明人 M·鲍恩 H·吴 W·达拉夸
P·基纳 B·加莱 A·科伊尔

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 韦东

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
C07K 16/24(2006.01)

权利要求书 5 页 说明书 97 页 附图 18 页

(54)发明名称

延长体内半衰期的人抗 IL-6 抗体及其在治疗肿瘤、自身免疫性疾病和炎症性疾病中的应用

(57)摘要

本发明提供了具有延长的体内半衰期的人抗 IL-6 抗体。本发明还涉及药物组合物、治疗组合物及使用与具有延长的体内半衰期的 IL-6 结合的治疗抗体治疗和预防 IL-6 介导的疾病和病症的方法，所述疾病和病症比如，但不局限于，炎症性疾病和病症、自身免疫性疾病和病症及肿瘤。

CN 102387814 A

1. 一种与 IL-6 特异性结合的分离的抗体，其中所述抗体包括可变区和人 IgG 恒定区，其相对于野生型人 IgG 恒定区具有一个或多个氨基酸取代，其中与具有所述可变区和野生型人 IgG 恒定区的抗体的半衰期相比，所述抗体具有延长的半衰期。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体，其中至少一个氨基酸取代选自 M252Y、M252F、M252W、M252T、S254T、T256S、T256R、T256Q、T256E、T256D、T256T、L309P、Q311S、H433R、H433K、H433S、H433I、H433P、H433Q、N434H、N434F、N434Y 和 N436H；或其组合，其中氨基酸残基根据 Kabat 中的 EU 索引进行编号。

3. 根据权利要求 2 所述的抗体，其中至少一个氨基酸取代选自 M252Y、S254T、T256E、H433K、N434F 和 N436H；或其组合，其中氨基酸残基根据 Kabat 中的 EU 索引进行编号。

4. 根据权利要求 1 所述的抗体，其中修饰的 IgG 恒定区包括 M252Y、S254T 和 T256E 氨基酸取代，其中氨基酸残基根据 Kabat 中的 EU 索引进行编号。

5. 根据权利要求 1 所述的抗体，其中修饰的 IgG 恒定区与野生型 IgG 恒定区相比具有更高的 FcRn 亲和性。

6. 根据权利要求 1 所述的抗体，其中人 IgG 恒定区是人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 恒定区。

7. 根据权利要求 1 所述的抗体，其中 IgG 是 IgG1。

8. 根据权利要求 1 所述的抗体，其中所述可变区包括：

(a)VH CDR1，其氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 序列一致或相对于 SEQ ID NO:1 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代；

(b)VH CDR2，其氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 序列一致或相对于 SEQ ID NO:2 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代；

(c)VH CDR3，其氨基酸序列与 SEQ ID NO:3 序列一致或相对于 SEQ ID NO:3 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代；

(d)VL CDR1，其氨基酸序列与 SEQ ID NO:4 序列一致或相对于 SEQ ID NO:4 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代；

(e)VL CDR2，其氨基酸序列与 SEQ ID NO:5 序列一致或相对于 SEQ ID NO:5 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代；以及

(f)VL CDR3，其氨基酸序列与 SEQ ID NO:6 序列一致或相对于 SEQ ID NO:6 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代。

9. 根据权利要求 8 所述的抗体，其中所述可变区包括：

(a) 具有 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列 VH CDR1；

(b) 具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列 VH CDR2；

(c) 具有 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列 VH CDR3；

(d) 具有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列 VL CDR1；

(e) 具有 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列 VL CDR2；以及

(f) 具有 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列 VL CDR3。

10. 根据权利要求 1 所述的抗体，其中所述可变区包括 VH 结构域和 VL 结构域，所述 VH 结构域包括三个 CDR，所述 VL 结构域包括三个 CDR；其中 VL 结构域的三个 CDR 包括：

(a) 包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的 VH CDR1；

(b) 包括 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的 VH CDR2 ;以及

(c) 包括 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列的 VH CDR3。

11. 根据权利要求 1 所述的抗体,其中所述可变区包括 VH 结构域和 VL 结构域,所述 VH 结构域包括三个 CDR,所述 VL 结构域包括三个 CDR ;其中 VL 结构域的三个 CDR 包括 :

(a) 包括 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列的 VL CDR1 ;

(b) 包括 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列的 VL CDR2 ;以及

(c) 包括 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的 VL CDR3。

12. 根据权利要求 1 所述的抗体,其中所述可变区包括具有与 SEQ ID NO :7 一致的氨基酸序列或者相对于 SEQ ID NO :7 包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸残基取代的 VH 结构域和具有与 SEQ ID NO :8 一致的氨基酸序列或者相对于 SEQ ID NO :8 包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸残基取代的 VL 结构域。

13. 根据权利要求 1 所述的抗体,其中所述可变区包括 SEQ ID NO :7 的 VH 结构域和 SEQ ID NO :8 的 VL 结构域。

14. 一种分离的核酸,其编码如权利要求 12 所述的 VH 结构域和 / 或域的氨基酸序列。

15. 根据权利要求 14 所述的核酸,其包括选自 SEQ ID NO :11、12、13 和 14 的核苷酸序列。

16. 一种包括如权利要求 14 所述核酸的载体。

17. 一种包括权利要求 16 所述的载体的分离的细胞。

18. 一种表达如权利要求 17 所述的抗体的分离的细胞系。

19. 一种药物组合物,包括在药学上可接受的载体中的如权利要求 1 所述的抗体。

20. 一种治疗和 / 或预防人类疼痛的方法,其包括向所需病人施用治疗有效量的抗 IL-6 抗体,其中所述抗 IL-6 抗体包括可变区,其包括 :

(a)VH CDR1,其氨基酸序列与 SEQ ID NO :1 序列一致或相对于 SEQ ID NO :1 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代 ;

(b)VH CDR2,其氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 序列一致或相对于 SEQ ID NO :2 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代 ;

(c)VH CDR3,其氨基酸序列与 SEQ ID NO :3 序列一致或相对于 SEQ ID NO :3 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代 ;

(d)VL CDR1,其氨基酸序列与 SEQ ID NO :4 序列一致或相对于 SEQ ID NO :4 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代 ;

(e)VL CDR2,其氨基酸序列与 SEQ ID NO :5 序列一致或相对于 SEQ ID NO :5 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代 ;以及

(f)VL CDR3,其氨基酸序列与 SEQ ID NO :6 序列一致或相对于 SEQ ID NO :6 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代。

21. 根据权利要求 20 所述的方法,其中所述可变区包括 :

(a) 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列 VH CDR1 ;

(b) 具有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列 VH CDR2 ;

(c) 具有 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列 VH CDR3 ;

(d) 具有 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列 VL CDR1 ;

(e) 具有 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列 VL CDR2 ;以及

(f) 具有 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列 VL CDR3。

22. 根据权利要求 20 所述的方法,所述可变区包括 VH 结构域和 VL 结构域,所述 VH 结构域包括三个 CDR,所述 VL 结构域包括三个 CDR ;其中 VH 结构域的三个 CDR 包括 :

(a) 包括 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的 VH CDR1 ;

(b) 包括 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的 VH CDR2 ;以及

(a) 包括 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列的 VH CDR3。

23. 根据权利要求 20 所述的方法,其中所述可变区包括 VH 结构域和 VL 结构域,所述 VH 结构域包括三个 CDR,所述 VL 结构域包括三个 CDR ;其中 VL 结构域的三个 CDR 包括 :

(a) 包括 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列的 VL CDR1 ;

(b) 包括 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列的 VL CDR2 ;以及

(a) 包括 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的 VL CDR3。

24. 根据权利要求 20 所述的方法,其中所述可变区包括具有与 SEQ ID NO :7 一致的氨基酸序列或者相对于 SEQ ID NO :7 包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸残基取代的 VH 结构域和具有与 SEQ ID NO :8 一致的氨基酸序列或者相对于 SEQ ID NO :8 包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸残基取代的 VL 结构域。在另一实施例中,可变区包括 SEQ ID NO :7 的 VH 结构域和 SEQ ID NO :8 的 VL 结构域。

25. 根据权利要求 20 所述的方法,其中所述可变区包括 SEQ ID NO :7 的 VH 结构域和 SEQ ID NO :8 的 VL 结构域。

26. 根据权利要求 20 所述的方法,其中所述抗体包括可变区和人 IgG 恒定区,其相对于野生型人 IgG 恒定区具有一个或多个氨基酸取代,其中与具有所述可变区和野生型人 IgG 恒定区的抗体的半衰期相比,所述抗体具有延长的半衰期。

27. 根据权利要求 26 所述的抗体,其中至少一个氨基酸取代选自 M252Y、M252F、M252W、M252T、S254T、T256S、T256R、T256Q、T256E、T256D、T256T、L309P、Q311S、H433R、H433K、H433S、H433I、H433P、H433Q、N434H、N434F、N434Y 和 N436H、或其组合,其中氨基酸残基根据 Kabat 中的 EU 索引进行编号。

28. 根据权利要求 27 所述的方法,其中至少一个氨基酸取代选自 M252Y、S254T、T256E、H433K、N434F 和 N436H、或其组合,其中氨基酸残基根据 Kabat 中的 EU 索引进行编号。

29. 根据权利要求 28 所述的抗体,其中修饰的 IgG 恒定区包括 M252Y、S254T 和 T256E 氨基酸取代,其中氨基酸残基根据 Kabat 中的 EU 索引进行编号。

30. 根据权利要求 26 所述的方法,其中修饰的 IgG 恒定区与野生型 IgG 恒定区相比具有更高的 FcRn 亲和性。

31. 根据权利要求 26 所述的方法,其中人 IgG 恒定区是人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 恒定区。

32. 根据权利要求 26 所述的方法,其中 IgG 是 IgG1。

33. 根据权利要求 20 所述的方法,其中所述疼痛与炎症和 / 或自身免疫性疾病有关,或由炎症和 / 或自身免疫性疾病引发。

34. 根据权利要求 33 所述的方法,其中所述炎症和 / 或自身免疫性疾病选自类风湿性关节炎、骨性关节炎,恶病质,慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、幼年特发性关节炎,哮喘、系统性

红斑狼疮、炎症性肠道疾病、克罗恩病，溃疡性结肠炎和动脉粥样硬化。

35. 根据权利要求 34 所述的方法，其中所述炎症和 / 或自身免疫性疾病是系统性红斑狼疮、骨关节炎或类风湿性关节炎。

36. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述疼痛与与升高的 IL-6 水平有关或由其引发。

37. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述疼痛与以下疾病有关或由其引发，所述疾病包括关节强硬性脊椎柱炎、炎性腰背部疼痛，神经病变，痛风，神经瘤，纤维肌痛，急性和 / 或慢性头痛，偏头痛，胰腺炎，脊神经受压，非恶性骨骼疼痛或癌症。

38. 根据权利要求 20 所述的方法，其中所述疼痛与伤口，医疗过程，手术，损伤或创伤有关或由其引发。

39. 根据权利要求 20 所述的方法，其中在接受伤口，医疗过程，手术损伤或创伤之前对患者施用所述抗体。

40. 根据权利要求 20 所述的方法，其中至少 90％血清中的游离 IL-6 被中和。

41. 根据权利要求 20 所述的方法，其中在靶组织中至少 90％的 IL-6 介导的信号转导被抑制。

42. 一种治疗或预防人类抑郁症的方法，其包括向所需病人施用治疗有效量的抗 IL-6 抗体，其中所述抗 IL-6 抗体包括可变区，其包括 ：

(a)VH CDR1，其氨基酸序列与 SEQ ID NO :1 序列一致或相对于 SEQ ID NO :1 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代 ；

(b)VH CDR2，其氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 序列一致或相对于 SEQ ID NO :2 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代 ；

(c)VH CDR3，其氨基酸序列与 SEQ ID NO :3 序列一致或相对于 SEQ ID NO :3 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代 ；

(d)VL CDR1，其氨基酸序列与 SEQ ID NO :4 序列一致或相对于 SEQ ID NO :4 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代 ；

(e)VL CDR2，其氨基酸序列与 SEQ ID NO :5 序列一致或相对于 SEQ ID NO :5 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代 ；以及

(f)VL CDR3，其氨基酸序列与 SEQ ID NO :6 序列一致或相对于 SEQ ID NO :6 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代。

43. 根据权利要求 42 所述的方法，其中所述可变区包括

(a) 具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列 VH CDR1 ；

(b) 具有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列 VH CDR2 ；

(c) 具有 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列 VH CDR3 ；

(d) 具有 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列 VL CDR1 ；

(e) 具有 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列 VL CDR2 ；以及

(f) 具有 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列 VL CDR3。

44. 根据权利要求 42 所述的方法，所述可变区包括 VH 结构域和 VL 结构域，所述 VH 结构域包括三个 CDR，所述 VL 结构域包括三个 CDR ；其中 VH 结构域的三个 CDR 包括 ：

(a) 包括 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的 VH CDR1 ；

(b) 包括 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的 VH CDR2 ;以及

(c) 包括 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列的 VH CDR3。

45. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述可变区包括 VH 结构域和 VL 结构域,所述 VH 结构域包括三个 CDR,所述 VL 结构域包括三个 CDR ;其中 VL 结构域的三个 CDR 包括 :

(a) 包括 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列的 VL CDR1 ;

(b) 包括 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列的 VL CDR2 ;以及

(c) 包括 SEQ ID NO :6 的氨基酸序列的 VL CDR3。

46. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述可变区包括具有与 SEQ ID NO :7 一致的氨基酸序列或者相对于 SEQ ID NO :7 包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸残基取代的 VH 结构域和具有与 SEQ ID NO :8 一致的氨基酸序列或者相对于 SEQ ID NO :8 包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸残基取代的 VL 结构域。在另一实施例中,可变区包括 SEQ ID NO :7 的 VH 结构域和 SEQ ID NO :8 的 VL 结构域。

47. 根据权利要求 46 所述的方法,其中所述可变区包括 SEQ ID NO :7 的 VH 结构域和 SEQ ID NO :8 的 VL 结构域。

48. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述抗体包括可变区和人 IgG 恒定区,其相对于野生型人 IgG 恒定区具有一个或多个氨基酸取代,其中与具有所述可变区和野生型人 IgG 恒定区的抗体的半衰期相比,所述抗体具有延长的半衰期。

49. 根据权利要求 48 所述的方法,其中至少一个氨基酸取代选自 M252Y、M252F、M252W、M252T、S254T、T256S、T256R、T256Q、T256E、T256D、T256T、L309P、Q311S、H433R、H433K、H433S、H433I、H433P、H433Q、N434H、N434F、N434Y 和 N436H、或其组合,其中氨基酸残基根据 Kabat 中的 EU 索引进行编号。

50. 根据权利要求 49 所述的方法,其中至少一个氨基酸取代选自 M252Y、S254T、T256E、H433K、N434F 和 N436H、或其组合,其中氨基酸残基根据 Kabat 中的 EU 索引进行编号。

51. 根据权利要求 49 所述的方法,其中修饰的 IgG 恒定区包括 M252Y、S254T 和 T256E 氨基酸取代,其中氨基酸残基根据 Kabat 中的 EU 索引进行编号。

52. 根据权利要求 48 所述的方法,其中修饰的 IgG 恒定区与野生型 IgG 恒定区相比具有更高的 FcRn 亲和性。

53. 根据权利要求 48 所述的方法,其中人 IgG 恒定区是人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 恒定区。

54. 根据权利要求 48 所述的方法,其中 IgG 是 IgG1。

55. 根据权利要求 42 所述的方法,其中至少 90％血清中的游离 IL-6 被中和。

56. 根据权利要求 42 所述的方法,其中在大脑中至少 90％的 IL-6 介导的信号转导被抑制。

57. 根据权利要求 42 所述的方法,其中抑郁症是重度抑郁症。

58. 根据权利要求 42 所述的方法,其中所述抗体与抗抑郁剂组合施用。

延长体内半衰期的人抗 IL-6 抗体及其在治疗肿瘤、自身免疫性疾病和炎症性疾病中的应用

[0001] 优先权声明

[0002] 本发明要求 2009 年 1 月 29 日递交的申请号为 61/148,106 的美国申请和 2009 年 6 月 4 日递交的申请号为 61/184,182 美国申请的优先权，它们的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及抑制 IL-6 生物学效应的抗 IL-6 抗体分子，其具有延长的体内半衰期。抗 IL-6 抗体在治疗与 IL-6 相关的疾病中十分有用，所述疾病包括炎症性疾病、自身免疫性疾病、肿瘤和抑郁症。

技术背景

[0004] 白介素 6(IL-6) 是由多种细胞类型产生的 26kDa 多效细胞促炎因子，其包括刺激成纤维细胞、单核细胞核内皮细胞，它们构成了体内 IL-6 的主要来源。细胞例如 T 细胞、B 细胞、巨噬细胞、角质细胞、成骨细胞和其他几种细胞在刺激时能够产生 IL-6。IL-6 同样也在肿瘤细胞系和肿瘤细胞中表达，所述肿瘤细胞是例如来自肺癌、前列腺癌、骨髓瘤、肾上腺样瘤和心脏粘液瘤的细胞 (Kishimoto, T., (1989)Blood 74 :1-10 ;Smith P.C. 等，(2001) Cytokine and Growth factor Reviews 12 :33-40)。在非炎症条件下，IL-6 从脂肪组织中分泌 (Wallenius 等，(2002)Nat.Med.8 :75)。

[0005] 为启动细胞信号转导，IL-6 以低亲和性与跨膜受体、IL-6 受体 α (也被称为 IL-6Rα 、IL-6Ra、IL-6R、gp80 或 CD126) 结合形成“IL-6:IL-6Ra”复合物。该复合物与 gp130 信号受体结合，IL-6Rα 与 gp130 共同形成高亲和性 IL-6 结合位点，并诱导形成由 IL-6、IL-6Ra 和 gp130 的各两个复制体组成的六聚物 (Somers,W.，等 (1997)1.9EMBO J.16 : 989-997)。该 IL-6Ra 的跨膜和细胞质结构域不需要信号转导，因为 IL-6Ra 也作为一种可溶性分泌形式存在 (sIL-6R 或 sIL-6Ra)。该可溶性受体通过 IL-6Ra 信息的差别剪切或蛋白酶降解脱落的方式产生。sIL-6R 能够与 IL-6 形成配体 - 受体复合物“IL-6:sIL-6Ra”。该复合物可以与 gp130 在细胞上结合，从而在 gp130 阳性细胞内启动细胞信号转导，即使那些细胞不表达 IL-6Ra。因此，sIL-6R 具有潜力拓宽对 IL-6 应答的细胞指令表，并被认为在 IL-6- 介导炎症中起重要作用 (Jones, S.A 等，(2001)FASEB J.15 :43-58)。

[0006] 已经阐明了人 IL-6 配体的晶体结构 ((Somers, W.，等 (1997)1.9EMBO J.16 : 989-997)。也已经解析了人 IL-6 的胞外结构域的晶体结构 (Varghese 等，(2002)PNAS USA 99 :15959-15964) 和 IL-6/IL-6R/gp130 复合物的六聚物结构 (Boulanger 等 (2003) Science 300 :2101-2104)。与诱变发生的研究相结合的这些结构已经识别出在 IL-6 表面上的三个位点，其参与与各种受体元件复合的 IL-6 的功能活性。位点 1 残基参与 IL-6 与 IL-6Ra 之间的相互作用。位点 2 残基参与 IL-6 与 gp130 细胞因子结合区域之间的相互作用。IL-6 的位点 3 中的残基参与六聚物复合物内的第二 gp130 的免疫球蛋白样结构域的相

互作用。在IL-6与六聚物IL-6/IL-6R/gp130复合物内IL-6的第二分子相互作用的位置上也已经识别出在IL-6上的第四个位点(Menziani等(1997)Proteins:Structure Function and Genetics 29,528)。

[0007] 已经分离出了许多抗IL-6配体单克隆抗体。进行的图谱研究显示它们结合于不同的结合位点,如上所述,在人IL-6的表面(Brakenhoff等,(1990)J.Immunol.145:561-568;Wijdenes等,(1991)Mol Immunol.28:1183-1191;Brakenhoff等,(1994)JBC 269:86;Kalai等,(1996)Eur JBiochem 238 714-723;Kalai等,(1997)Blood 89:1319-1333)。

[0008] 作为主要细胞因子的IL-6的增加与各种疾病表征有联系。已经示出了IL-6的循环水平在诸如类风湿性关节炎、Castleman病、青少年特发性关节炎和克罗恩氏病等疾病中增加了(Nishimoto N,和Kishimoto T.(2004)Curr Op in Pharmacology 4:386-391)。因为该IL-6与驱动这些炎症表征中的病理学有联系。此外,已经示出了由IL-6激发的各种肿瘤类型,其包括黑素瘤、肾细胞癌、卡波西氏肉瘤、卵巢癌、淋巴瘤、白血病、多发性骨髓瘤和前列腺癌(Keller E.T.等,(1996)Front Biosci.1:340-57)。另外,已经在几种癌症中报道了增加的IL-6的循环水平。在一些癌症表征中,将增加的IL-6水平用作该疾病的预后指示物。

[0009] 由于IL-6在各种鼠的、嵌合的、人源化的和人体疾病中的作用,已经将抗人IL-6单细胞系抗体研发成潜在的治疗方法(比如US5856135、WO2004/020633、US20060257407A1、US7291721)。已经将嵌合的人-鼠抗IL-6抗体cCLB8(指CNTO328)用于治疗患有多发性骨髓瘤的患者(van Zaanen等,(1998)Brit.Journal.Haematology 102:783),观察到大多数患者的病症稳定。

[0010] 通过使用人源化的抗IL-6Ra抗体托西珠单抗(也指hPM-1、MRA和Actemra)进一步突显了其在癌症和炎症疾病中抑制IL-6信号转导的积极作用。此为鼠的抗IL6Ra抗体PM-1的人源化版本。使用该抗体对患者的治疗已经证实在很多疾病中有效果,其包括类风湿性关节炎、青少年特发性关节炎、克罗恩氏病、骨髓增生性疾病、Castleman病和系统性红斑狼疮(SLE)(Mihara等,(2005)Expert Opinion on Biological Therapy.5:683-90)。

[0011] 在基于抗体的治疗方法中的一个关键问题是,在循环中的免疫球蛋白的持久性。免疫球蛋白清除的比率直接影响免疫球蛋白的数量和剂量频率。增加的剂量和剂量频率可能在受体内产生副作用,还可能增加医疗费用。鉴于基于抗IL-6抗体的治疗方法在制药方面的重要性,有需要研发具有增加的体内半衰期的修饰的高亲和性人抗IL-6抗体。

[0012] 发明概述

[0013] 本发明涉及高亲和性人抗IL-6抗体,其特异性结合人IL-6并具有延长的体内半衰期。在一实施例中,本文中描述的抗IL-6抗体的体内半衰期是10天至40天。在一具体实施例中,本文中描述的抗IL-6抗体的体内半衰期是25天至35天。在一实施例中,本文中描述的抗IL-6抗体包括PCT申请号为WO 2008/065378的专利中描述的抗IL-6抗体VH和/或VL结构域。在一实施例中,本发明的抗IL-6抗体包括人IgG恒定区,其相对于野生型人IgG恒定区具有一个或多个氨基酸取代。在一具体实施例中,本发明的抗IL-6抗体包括具有M252Y、S254T和T256E氨基酸取代的人IgG恒定区,其中根据Kabat中的EU索引给氨基酸残基进行编号。在另一实施例中,本发明的抗IL-6抗体包括SEQ ID NO:9的序列的

重链和 SEQ ID NO :10 序列的轻链。

[0014] 本发明还涉及编码人抗 IL-6 抗体的核酸，包括所述核酸的载体，包括所述载体的细胞以及制造具有延长半衰期的人抗 IL-6 抗体的方法，其中所述人抗 IL-6 抗体具有延长的半衰期。

[0015] 在另一方面，本发明提供一种分离的核苷酸，其包括根据本发明的编码人抗 IL-6 抗体的序列，所述抗 IL-6 抗体具有延长的半衰期，以及制备具有延长的半衰期的人抗 IL-6 抗体的方法，其包括在一定条件下，使所述核酸表达以产生所述人抗 IL-6 抗体并使其再生。

[0016] 在另一方面，提供了含有或转化本发明核酸的宿主细胞。

[0017] 本发明的另一些方面提供了包括本发明的抗 IL-6 抗体的组合物，及其在结合、抑制和 / 或中和 IL-6 方法中的使用，包括通过治疗人体或动物体的治疗方法。在一实施例中，本发明的组合物是无菌的液体制剂。在一具体实施例中，本发明的组合物包括至少 100mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，本发明的组合物是冻干制剂。在另一实施例中，本发明的制剂是药物制剂。

[0018] 根据本发明的抗体可用于治疗方法或诊断方法，例如人体或动物体（例如，在人患者内）的疾病或病症的治疗方法（可包括预防治疗），其包括对所述患者施用有效量的本发明的结合元件。根据本发明的能治疗的症患包括如本文在其它地方详细讨论的 IL-6 在其中发挥作用的任何症患。

[0019] 本发明同样包括有所需患者类患者的血清中，中和 IL-6 活性的方法，其包括对人类患者施用有效量的本发明的抗 IL-6 抗体。本发明还提供了预防、处理、治疗或改善炎症疾病或病症、自身免疫性疾病或病症、增殖性疾病、与 IL-6 异常表达和 / 或活性相关或以其为特征的疾病或病症、或其一个或多个症状的方法。所述方法包括对需要的受体施用预防或治疗有效量的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0020] 本发明的一方面涉及分离的修饰抗体，其与 IL-6 特异性结合，其中所述修饰抗体包括可变区和人 IgG 恒定区，其相对于野生型人 IgG 恒定区具有一个或多个氨基酸取代，其中，与包括所述可变区和野生型人 IgG 恒定区的亲本抗体的半衰期相比，所述抗体具有增加的半衰期。在本发明这一方面的一个实施例中，修饰抗体的半衰期长于野生型抗体的半衰期至少 2 倍、至少 3 倍、至少 4 倍、至少 5 倍、至少 10 倍或至少 20 倍。在另一实施例中，修饰抗体的半衰期长于野生型抗体的半衰期 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍或 20 倍。在另一实施例中，修饰抗体的半衰期长于野生型抗体的半衰期 2 倍至 3 倍、2 倍至 5 倍、2 倍至 10 倍、3 倍至 5 倍、或 3 倍至 10 倍。在还一实施例中，修饰抗体的半衰期是至少 10 天、至少 15 天、至少 20 天、至少 25 天、至少 26 天、至少 27 天、至少 28 天、至少 29 天、至少 30 天、至少 35 天、至少 40 天、至少 45 天或至少 50 天。在还一实施例中，修饰抗体的半衰期是 10 天、15 天、20 天、25 天、26 天、27 天、28 天、29 天，30 天、35 天、40 天、45 天 50 天。在还一实施例中，修饰抗体的半衰期是 10 天至 20 天、10 天至 30 天、10 天至 40 天、10 天至 50 天、20 天至 30 天、20 天至 40 天、20 天至 50 天、25 天至 30 天、25 天至 40 天、25 天至 50 天、30 天至 40 天、30 天至 50 天或 40 天至 50 天。在还一实施例中，修饰抗体的半衰期是在哺乳动物体内测定的半衰期。在另一实施例中，修饰抗体的半衰期是在非人灵长动物内测定的半衰期。在另一实施例中，修饰抗体的半衰期是在人体内测定的半衰期。

[0021] 本发明的另一方面涉及分离的修饰抗体，其与 IL-6 特异性结合，其中修饰抗体包括人 IgG 恒定区其相对于野生型人 IgG 恒定区具有一个或多个氨基酸取代，其中与包括野生型人 IgG 恒定区的野生型抗体的清除率相比，所述抗体具有降低的清除率。在本发明该方面的一实施例中，修饰抗体的清除率低于野生型抗体的清除率至少 2 倍、至少 3 倍、至少 4 倍、至少 5 倍、至少 10 倍或至少 20 倍。在另一实施例中，修饰抗体的清除率低于野生型抗体的清除率 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍或 20 倍。在还一实施例中，修饰抗体的清除率低于野生型抗体的清除率 2 倍至 3 倍、2 倍至 5 倍、2 倍至 10 倍、3 倍至 5 倍、或 3 倍至 10 倍。在另一实施例中，修饰抗体的清除率是至多 1mL/kg/ 天、至多 2mL/kg/ 天、至多 3mL/kg/ 天、至多 4mL/kg/ 天、至多 5mL/kg/ 天、至多 7mL/kg/ 天、至多 10mL/kg/ 天、至多 15mL/kg/ 天或至多 20mL/kg/ 天。在另一实施例中，修饰抗体的清除率是 1mL/kg/ 天、2mL/kg/ 天、3mL/kg/ 天、4mL/kg/ 天、5mL/kg/ 天、7mL/kg/ 天、10mL/kg/ 天、15mL/kg/ 天或 20mL/kg/ 天。在还一实施例中，修饰抗体的清除率是 1mL/kg/ 天至 2mL/kg/ 天、1mL/kg/ 天至 3mL/kg/ 天、1mL/kg/ 天至 5mL/kg/ 天、1mL/kg/ 天至 10mL/kg/ 天、1mL/kg/ 天至 15mL/kg/ 天、2mL/kg/ 天至 5mL/kg/ 天、2mL/kg/ 天至 10mL/kg/ 天、3mL/kg/ 天至 5mL/kg/ 天、3mL/kg/ 天至 10mL/kg/ 天或 5mL/kg/ 天至 10mL/kg/ 天。在还一实施例中，修饰抗体的清除率是哺乳动物中测定的清除率。在另一实施例中，修饰抗体的清除率实在非人类的灵长动物中测定的。在另一实施例中，修饰抗体的清除率在人体中测定。在还一实施例中，氨基酸取代选自 :M252Y、M252F、M252W、M252T、S254T、T256S、T256R、T256Q、T256E、T256D、T256T、L309P、Q311S、H433R、H433K、H433S、H433I、H433P、H433Q、N434H、N434F、N434 和 N436H，其中根据 Kabat 中的 EU 索引给氨基酸残基进行编号。在另一实施例中，氨基酸取代的至少一种选自 :M252Y、S254T、T256E、H433K、N434F 和 N436H，其中根据 Kabat 中的 EU 索引给氨基酸残基进行编号。在还一实施例中，修饰 IgG 恒定区包括 M252Y、S254T 和 T256E 氨基酸取代，其中根据 Kabat 中的 EU 索引给氨基酸残基进行编号。在还一实施例中，修饰 IgG 恒定区与野生型 IgG 恒定区相比对 FcRn 有更高的亲和性。在另一实施例中，人 IgG 恒定区是人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 恒定区。在还一实施例中，IgG 是 IgG1。

[0022] 本发明的另一方面涉及上述修饰抗体，其中可变区包括 :具有与 SEQ ID NO :1 一致的氨基酸序列或者相对于 SEQ ID NO :1 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代的 VH CDR1 ;具有与 SEQ ID NO :2 一致的氨基酸序列或者相对于 SEQ ID NO :2 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代的 VHCDR2 ;具有与 SEQ ID NO :3 一致的氨基酸序列或者相对于 SEQ ID NO :3 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代的 VH CDR3 ;具有与 SEQ ID NO :4 一致的氨基酸序列或者相对于 SEQ ID NO :4 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代的 VL CDR1 ;具有与 SEQ ID NO :5 一致的氨基酸序列或者相对于 SEQ ID NO :5 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代的 VL CDR2 ;和具有与 SEQ ID NO :6 一致的氨基酸序列或者相对于 SEQ ID NO :6 包括 1、2 或 3 个氨基酸残基取代的 VL CDR3。在一实施例中，权利要求 1 至 26 项中任一项所述的修饰抗体，其中可变区包括 :具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的 VH CDR1 ;具有 SEQ ID NO :2 的氨基酸序列的 VH CDR2 ;具有 SEQ ID NO :3 的氨基酸序列的 VH CDR3 ;具有 SEQ ID NO :4 的氨基酸序列的 VL CDR1 ;具有 SEQ ID NO :5 的氨基酸序列的 VL CDR2 ;具有 SEQ IDNO :6 的氨基酸序列的 VL CDR3。在另一实施例中，可变区包含包括 3 个 CDR 的 VH 结构域和包括 3 个 CDR 的 VL 结构域，其中 VH 结构域 3 个 CDR 包括 :具有 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列的 VH CDR1 ;具有 SEQ

ID NO:2 的氨基酸序列的 VH CDR2;和具有 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列的 VH CDR3。在另一实施例中,可变区包含包括 3 个 CDR 的 VH 结构域和包括 3 个 CDR 的 VL 结构域,其中 VL 结构域 3 个 CDR 包括:具有 SEQ ID NO:4 的氨基酸序列的 VL CDR1;具有 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列的 VL CDR2;具有 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列的 VL CDR3。在还一实施例中,可变区包括具有与 SEQ ID NO:7 一致的氨基酸序列或者相对于 SEQ ID NO:7 包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸残基取代的 VH 结构域和具有与 SEQ ID NO:8 一致的氨基酸序列或者相对于 SEQ ID NO:8 包括 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸残基取代的 VL 结构域。在另一实施例中,可变区包括 SEQ ID NO:7 的 VH 结构域和 SEQ ID NO:8 的 VL 结构域。

[0023] 本发明的另一方面涉及编码上述修饰抗体的氨基酸序列的核酸。在一实施例中,核酸包括选自 SEQ ID NO:11-14 的核苷酸序列。

[0024] 本发明的另一方面涉及包括上述核酸的载体。

[0025] 本发明的另一方面涉及包括上述载体的分离的细胞。

[0026] 本发明的另一方面涉及表达上述修饰抗体的分离的细胞。

[0027] 本发明的另一方面涉及一种制备修饰抗体的方法,其包括在足以制备抗体的条件下培养上述分离的细胞并从培养物中回收抗体。

[0028] 本发明的另一方面涉及包括上述修饰抗体的药物组合物。

[0029] 本发明的另一方面涉及一种中和所需患者的血清中的 90%的游离 IL-6 的方法,其包括施用有效量的上述修饰抗体。

[0030] 本发明的另一方面涉及一种抑制所需患者的血清中的 90%的 IL-6 介导的信号转导的方法,其包括对人体施用有效量的上述修饰抗体。

[0031] 本发明的另一方面涉及一种中和所需患者的滑液中的 90%的游离 IL-6 的方法,其包括对人体施用有效量的上述修饰抗体。

[0032] 本发明的另一方面涉及一种抑制所需患者的滑液中的 90%的 IL-6 介导的信号转导的方法,其包括对人体施用有效量的上述修饰抗体。

[0033] 本发明的另一方面涉及一种降低人体中滑膜细胞生长的方法,其包括对所需患者施用治疗有效量的上述抗体。

[0034] 本发明的另一方面涉及一种降低人体中滑膜炎症的方法,其包括对所需患者施用治疗有效量的上述抗体。

[0035] 本发明的另一方面涉及一种治疗人类自身免疫性疾病或病症的方法,其包括对所需患者施用治疗有效量的上述抗体。

[0036] 本发明的另一方面涉及一种治疗人类恶性肿瘤的方法,其包括对所需患者施用治疗有效量的上述抗体。

[0037] 本发明的另一方面涉及一种治疗人类炎症免疫疾病或病症的方法,其包括对所需患者施用治疗有效量的上述抗体。

[0038] 本发明的另一方面涉及治疗人类系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎或炎症性的方法,其包括对所需患者施用治疗有效量的上述抗体。在一实施例中,根据权利要求 40 至 49 中任一项所述的方法,其中治疗上有效的量包括约 0.1 至 5mg/kg、约 0.1 至 2mg/kg、约 0.1 至 1mg/kg、约 0.3 至 2mg/kg、约 0.3 至 1mg/kg、约 0.5 至 2mg/kg 或约 0.5 至 1mg/kg 的单次剂量或分剂量的修饰抗体。在另一实施例中,治疗上有效的量包括约 20 至 500mg、约 20 至

200mg、约 20 至 100mg、约 50 至 500mg、约 50 至 200mg 或约 50 至 100mg 的单次剂量或分剂量的修饰抗体。在还一实施例中，治疗有效量的修饰抗体给药频率为每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每八周一次或每十二周一次。在还一实施例中，治疗有效量的修饰抗体静脉给药或者皮下注射给药。在另一实施例中，病人在施用至少一次维持剂量的修饰抗体之前，给药一次单次负荷剂量的修饰抗体。在还一实施例中，负荷剂量包括约 0.1 至 5mg/kg、约 0.1 至 2mg/kg、约 0.1 至 1mg/kg、约 0.3 至 2mg/kg、约 0.3 至 1mg/kg、约 0.5 至 2mg/kg、或约 0.5 至 1mg/kg 的单次剂量或分剂量的修饰抗体。在还一实施例中，负荷剂量包括约 20 至 500mg、约 20 至 200mg、约 20 至 100mg、约 50 至 500mg、约 50 至 200mg、或约 50 至 100mg 的单次剂量或分剂量的修饰抗体。在还一实施例中，维持剂量包括约 0.1 至 5mg/kg、约 0.1 至 2mg/kg、约 0.1 至 1mg/kg、约 0.3 至 2mg/kg、约 0.3 至 1mg/kg、约 0.5 至 2mg/kg、或约 0.5 至 1mg/kg 的单次剂量或分剂量的修饰抗体。在还一实施例中，维持剂量包括约 20 至 500mg、约 20 至 200mg、约 20 至 100mg、约 50 至 500mg、约 50 至 200mg、或约 50 至 100mg 的单次剂量或分剂量的修饰抗体。在另一实施例中，在负荷剂量给药之后，维持剂量的给药频率为一周、两周、三周、四周、八周、或十二周。在还一实施例中，至少对病人施用两次维持剂量并且维持剂量的给药频率为每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每八周一次或每十二周一次。在还一实施例中，修饰抗体的负荷剂量静脉给药或者皮下注射给药。在另一实施例中，维持剂量静脉给药或者皮下注射给药。在另一实施例中，治疗有效量的修饰抗体连同第二治疗剂一起给药。

[0039] 本发明的另一方面涉及包括上述抗体的无菌稳定的水性制剂。在根据本发明的一方面的一个实施例中，抗体没有经过冷冻干燥。在另一实施例中，抗体经过冷冻干燥。在另一实施例中，所述修饰抗体的浓度是至少约 5mg/ml、至少约 10mg/ml、至少约 15mg/ml、至少约 20mg/ml、至少约 50mg/ml、至少约 100mg/ml、至少约 120mg/ml、至少约 150mg/ml、至少约 160mg/ml、至少约 180mg/ml、至少约 200mg/ml、至少约 250mg/ml、或至少约 300mg/ml。在另一实施例中，该制剂还包括至少约一种缓冲组分。在另一实施例中，该制剂还包括至少一种赋形剂。在还一实施例中，缓冲组分选自组氨酸、柠檬酸、磷酸盐、甘氨酸和醋酸。在还一实施例中，缓冲组分的浓度为约 1mM 至约 200mM、约 1mM 至约 50mM 或约 5mM 至约 20mM。在还一实施例中，缓冲组分的浓度为约 10mM、约 15mM、约 20mM 或约 25mM。在另一实施例中，赋形剂是糖类。在还一实施例中，所述糖类是二糖。在还一实施例中，所述二糖是海藻糖或蔗糖。在另一实施例中，二糖的浓度为约 1％至约 40％、约 2％至约 20％、或约 2％至约 10％。在还一实施例中，二糖的浓度为约约 2％、约 4％或约 8％。在还一实施例中，赋形剂是盐类。在还一实施例中，所述盐类是氯化钠。在另一实施例中，氯化钠的浓度为约 50mM 至约 200mM。在另一实施例中，氯化钠的浓度为约 70mM、约 75mM、约 80mM、约 100mM、约 120mM、或约 150mM。在另一实施例中，赋形剂是表面活性剂。在另一实施例中，表面活性剂是多山醇酯。在还一实施例中，所述多山醇酯是多山醇酯 20 或多山醇酯 80。在还一实施例中，表面活性剂的浓度为约 0.001％至约 2％。在另一实施例中，表面活性剂的浓度为约 0.01％、约 0.02％、约 0.04％或约 0.08％。在还一实施例中，赋形剂是氨基酸。在还一实施例中，氨基酸选自甘氨酸、组氨酸或精氨酸。在还一实施例中，氨基酸的浓度为约 10mM 至约 400mM。在还一实施例中，氨基酸的浓度为约 25mM、约 50mM、约 100mM、约 150mM、约 200mM、约 250mM、约 300mM、约 350mM、或约 400mM。在还一实施例中，该制剂的 pH 值为约 5.5 至约 6.5。在还一

实施例中，所述制剂的 pH 值为约 6.0。在还一实施例中，该制剂是等渗的。在另一实施例中，该制剂保存在 40℃下至少约 4 周是稳定的。在还一实施例中，该制剂保存在 5℃下至少约 3 个月是稳定。在另一实施例中，该制剂保存在 5℃下至少约 12 个月是稳定。在还一实施例中，将所述制剂保存在 40℃下至少约 4 周时，抗体丧失至多 20％的 IL-6 结合活性。在还一实施例中，将所述制剂保存在 5℃下至少约 3 个月时，抗体丧失至多 20％的 IL-6 结合活性。在还一实施例中，将所述制剂保存在 5℃下至少约 12 个月时，抗体丧失至多 20％的 IL-6 结合活性。在还一实施例中，在所述制剂保存在 40℃下至少约 4 周时，抗体丧失至多 10％的 IL-6 结合活性。在另一实施例中，根据权利要求 64 至 93 中任一项所述的制剂，其中在所述制剂保存在 5℃下至少约 3 个月时，所述抗体丧失至多 10％的 IL-6 结合活性。在另一实施例中，根据权利要求 64 至 93 中任一项所述的制剂，其中在所述制剂保存在 5℃下至少约 12 个月时，所述抗体丧失至多 10％的 IL-6 结合活性。在另一实施例中，抗体是易聚集或断裂。在另一实施例中，保存在 40℃下至少约 4 周时，通过高效体积排阻色谱测定少于约 2％的所述抗体形成聚集体。在另一实施例中，保存在 5℃下至少约 3 个月时，通过高效体积排阻色谱测定少于约 2％的所述抗体形成聚集体。在另一实施例中，保存在 5℃下至少约 12 个月时，通过高效体积排阻色谱测定少于约 2％的所述抗体形成聚集体。在另一实施例中，保存在 40℃下至少约 4 周时，通过尺寸排阻层析测定少于约 2％的所述抗体断裂。在另一实施例中，保存在 5℃下至少约 3 个月时，通过尺寸排阻层析测定少于约 2％的所述抗体断裂。在另一实施例中，保存在 5℃下至少约 12 个月时，通过尺寸排阻层析测定少于约 2％的所述抗体断裂。在另一实施例中，制剂是可注射的制剂。在另一实施例中，制剂适用于静脉给药，皮下给药或肌肉给药。在另一实施例中，制剂适用于气溶胶给药。

[0040] 本发明的另一方面涉及一种适用于对人体肠胃外给药的药物的单位剂型，其包括在一合适容器中的任何一种上述抗体制剂。在一实施例中，抗体制剂进行静脉给药、皮下给药或肌肉给药。

[0041] 本发明的另一方面涉及一种适用于对人体进行气溶胶给药的药物的单位剂型，其包括任何一种上述抗体制剂。在根据本发明的一方面的一个实施例中，鼻内给药抗体制剂。

[0042] 本发明的另一方面涉及含有上述制剂的任一种的密闭容器。

[0043] 本发明的另一方面涉及含有上述制剂的任一种的预充注射器。

[0044] 本发明的另一方面涉及包括上述制剂的任一种的试剂盒。

[0045] 将在下文对本发明的这些方面和其他方面进行详细描述。

[0046] 术语

[0047] 在此说明以方便理解的是，本文中所使用的“和 / 或”是用于具体的公开两个具体特征或成分中的一个，连同或不连同另一个。例如“A 和 / 或 B”应被认为是 (i)A，(ii)B 和 (iii)A 与 B 之一的具体公开，就像每个被单独列出一样。

[0048] IL-6 和 IL-6 受体

[0049] IL-6 是白介素 6。IL-6 在本文中也称为“抗原”。

[0050] 人 IL-6 的全长氨基酸序列是 SEQ ID NO :15。在体内将该序列切开以去除 N 端前导肽，从而产生成熟的 IL-6。成熟的人 IL-6 具有 SEQ ID NO :16 的氨基酸序列。成熟序列代表体内循环 IL-6，其是如本文所述的治疗和体内诊断应用的靶抗原。因此，在本文中除非另有说明，IL-6 指的是正常的成人 IL-6。

[0051] IL-6 可以与一个可检测的标签偶联，例如 HIS FLAG，例如如本文所述适用于试验中。例如，使用与 HIS FLAG 序列偶联的 IL-6 的融合蛋白。

[0052] IL-6 受体，IL-6Ra 是白介素 6 的受体。IL-6Ra 也被称为 IL-6Rα、IL-6Ra、IL-6R 和 CD126。在体内 IL-6Ra 以跨膜形式和可溶形式存在。除非本文另有说明，否则提到的 IL-6Ra 可以是跨膜 IL-6Ra 和 / 或可溶性 IL-6Ra。

[0053] 除非另有说明，本文中的 IL-6 受体指的是正常的人 IL-6 受体。人类可溶性 IL-6Ra(sIL-6Ra，sIL-6R) 的氨基酸序列是 SEQ ID NO :17。人类跨膜 IL-6Ra 的氨基酸序列是 SEQ ID NO :18。

[0054] IL-6 结合 IL-6Ra 从而形成 IL-6:IL-6Ra 复合物。复合物可以是可溶性的（具有 sIL-6Ra)，也可以是与膜结合的（具有跨膜 IL-6Ra)。当 IL-6Ra 是可溶性的形式，复合物被定义为 IL-6:sIL-6Ra。除非本文中另有说明，所指的 IL-6:IL-6Ra 可能包括 IL-6 与跨膜 IL-6Ra 或可溶性 IL-6Ra 的复合物。

[0055] gp130

[0056] gp130 是 IL-6:IL-6Ra 复合物的受体。在 Hibi 等人 Cell 63 :1149-1157(1990) 中报道了 gp130 的克隆与特征。人 gp130 的序列测定为 SEQ ID NO :19。

[0057] 结合元件

[0058] 此处描述了一对互相结合的分子的一个元件。该结合对的元件可以自然衍生或全部或部分合成产生。结合对之一的元件在其表面具有一个区域，或者空腔，其与分子对的另一个元件结合并从而与其特定的空间和极性构成互补。结合对的典型例子是抗原 - 抗体、生物素 - 亲和素、激素 - 激素受体、受体 - 配体、酶 - 底物。本发明涉及抗原 - 抗体型反应。

[0059] 结合元件通常包括具有抗原结合位点的分子。例如，结合元件可以是抗体分子或包括抗原结合位点的非抗体蛋白质。

[0060] 可以通过 CDR 在如人纤连蛋白或细胞色素 B 等的非抗体蛋白支架上的排列 (Haan&Maggos(2004)BioCentury，12(5) :A1-A6 ;Koide 等，(1998)Journal of Molecular Biology，284 :1141-1151 ;Nygren 等，(1997)Curr.Op.Structural Biology，7 :463-469)，或通过使位于蛋白骨架内的环的氨基酸残基随机化或者突变，使抗原结合位点与所需靶标特异性结合。Nygren 等人对蛋白质中新结合位点进行工程化的骨架详细评述 (Nygren 等，(1997)Curr.Op.Structural Biology，7 :463-469)。在 WO/0034784 中公开了用于抗体模拟物的蛋白骨架，其中发明人描述了包括具有至少一个随机环的 III 型纤连蛋白域的蛋白质（抗体模拟物）。可以向其中移植一个或多个 CDR，例如一组 HCDR，其可以由免疫球蛋白基因超家族的任何结构域元件提供。骨架可以是人类或非人类的蛋白质。非抗体蛋白骨架的一个优点在于其可以在骨架分子内提供抗原结合位点，其小于至少一些抗体分子和 / 或比一些抗体分子易于制造。结合元件的小尺寸可以赋予有用的生理特性，例如进入细胞的能力，穿透渗入到组织或到达位于其他结构内的靶标的能力，或在靶抗原的蛋白质腔内结合的能力。Wess 评述了在非抗体蛋白骨架内的抗原结合位点的用途 (Wess，L.(2004)In : BioCentury，The Bernstein Report on BioBusiness，12(42)，A1-A7)。典型的蛋白质具有一个稳定的骨架和一个或多个可变环，其中环的氨基酸序列特异性地或随机地突变以产生结合靶抗原的抗原结合位点。这样的蛋白质包括来自金黄色葡萄球菌的蛋白质 A 的 IgG 结合域、转铁蛋白、四连接素、纤连蛋白（例如第十纤连蛋白 III 型域）、脂笼蛋白以及伽马

结晶和其他 Affilin™ 骨架 (Scil 蛋白)。其他方法的例子包括基于环蛋白(具有分子内二硫键的小蛋白)合成的“微体”,微生物蛋白 (Versabodies™, Amunix) 和锚蛋白重复蛋白 (DARPins, Molecular Partners)。

[0061] 除了抗体序列和/或抗原结合位点,根据本发明的结合元件可以包括其他氨基酸,例如形成肽或者多肽的氨基酸,例如折叠域,或除了结合抗原外赋予分子其他的功能特性。本发明的结合元件可以载有一可检测的标记,或可以与毒素或靶基团或酶(例如通过肽键或连接子)偶联。例如,结合元件可以包括催化位点(例如在酶结构域中)以及抗原结合位点,其中,抗原结合位点与抗原结合,并因此使催化位点与抗原靶定。催化位点可以抑制抗原的生物学功能,例如通过分裂。

[0062] 虽然,如所述,CDR 能够被非抗体骨架承载,载有本发明的 CDR 或一组 CDR 的结构通常是抗体重链或轻链序列或其基本上的一部分,其中 CDR 或一组 CDR 位于对应于自然产生的 VH 和 VL 抗体可变区的一个位置,所述抗体可变区由重新排序的免疫球蛋白基因编码。免疫球蛋白可变区的结构和定位可以参照 Kabat 等 (Kabat, E.A. 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest.4th Edition.US Department of Health and Human Services.(1987)) 及其更新的内容确定。获得许多学术和商业在线资源可以查询该数据库。例如,参见 Martin, A.C.R.(Accessing the Kabat antibody Sequence Database by Computer PROTEINS :Structure,Function and Genetics,25(1996),130-133) 和联合在线资源,目前其世界范围的网址为 bioinf.org.uk/abs/simkab.html。

[0063] 通过 CDR 区或 CDR,它的目的在于表明如 Kabat 等定义的免疫球蛋白的轻链和重链的高变区 (Kabat, E.A. 等, (1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition.US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington 或稍后版本)或 Chothia 和 Lesk(J.Mol.Biol.,196 :901-917(1987)。抗体通常包括 3 个重链 CDR 和 3 个轻链 CDR。本文使用的术语 CDR 或 CDRs 为了表明,根据情况,这些区域中的一个或几个,或甚至这些区域的整体,所述区域包括大多数的氨基酸残基,其与通过亲和性与识别的抗原或表位结合的抗体有关。

[0064] 在六个短的 CDR 序列中,重链的第三 CDR(HCDR3) 具有更大的尺寸变化(更大的多样性主要是由于对编码其基因的排列机制)。它也可以只有 2 个氨基酸,尽管已知最长的尺寸为 26 个氨基酸。CDR 的长度根据可适应特定基本框架的长度而改变。就其功能而言,HCDR3 起到部分地决定抗体特异性的作用 (Segal 等, (1974)PNAS,71 :4298-4302 ;Amit 等, (1986)Science,233 :747-753 ;Chothia 等, (1987)J.Mol.Biol.,196 :901-917 ;Chothia 等, (1989)Nature,342 :877-883 ;Caton 等, (1990)J.Immunol.,144 :1965-1968 ;Sharon 等, (1990)PNAS,87 :4814-4817 ;Sharon 等, (1990)J.Immunol.,144 :4863-4869 ;Kabat 等, (1991)J.Immunol.,147 :1709-1719 ;Holliger & Hudson, Nature Biotechnology 23(9) : 1126-1136 2005)。

[0065] HCDR1 可以是 5 个氨基酸长,由 Kabat 残基 31-35 组成。

[0066] HCDR2 可以是 17 个氨基酸长,由 Kabat 残基 50-65 组成。

[0067] HCDR3 可以是 11 个或 12 个氨基酸长,由 Kabat 残基 95-102 组成,非必要的包括 Kabat 残基 100D。

[0068] LCDR1 可以是 11 个氨基酸长,由 Kabat 残基 24-34 组成。

[0069] LCDR2 可以是 7 个氨基酸长，由 Kabat 残基 50-56 组成。

[0070] LCDR3 可以是 8 个或 9 个氨基酸长，由 Kabat 残基 89-97 组成，非必要的包括 Kabat 残基 95。

[0071] 抗体分子

[0072] 这描述了自然产生的或者部分或全部合成产生的免疫球蛋白。该术语也涵盖任何包括抗体抗原结合位点的多肽或蛋白。可以理解的是本发明并不涉及自然形式的的抗体，也就是说抗体并不是处于其自然环境中，但是他们能够被分离或者通过纯化从自然产生的抗体中获得，或者通过基因重组获得，或者通过化学合成获得，并且如下文所述，抗体可以具有非自然的氨基酸。由抗体抗原结合位点组成的抗体片段包括，但不局限于，如 Fab、Fab'、Fab' -SH、scFv、Fv、dAb 和 Fd 分子。多种其他各种抗体分子，包括设计一个或多个抗体的抗原结合位点，例如包括 Fab2、Fab3、双抗体、三抗体、四抗体和微型抗体。在 Holliger 和 Hudson 中描述了抗体分子及其构建方法与使用方法 (Nature Biotechnology 23(9) : 1126-1136(2005))。

[0073] 可能采取单克隆抗体和其他抗体使用 DNA 重组技术生产另一抗体或结合靶抗原的嵌合抗体分子。这种技术可能涉及引入编码免疫球蛋白可变区的 DNA，或者抗体恒定区的 CDR，或者不同的免疫球蛋白的恒定区和构架区。详见，如，EP-A-184187、GB2188638A 或 EP-A-239400，以及随后的大量文献。杂交瘤细胞或产生抗体的其他细胞可受到基因突变或其他变化，这可以改变或可以不改变产生的抗体的结合特异性。

[0074] 由于抗体可以在许多方面进行修饰，术语“抗体分子”应解释为包括任何结合元件或者具有特异性和 / 或结合抗原的抗体抗原结合位点的物质。因此，这个术语涵盖了抗体片段及其衍生物，包括任何具有抗体抗原结合位点的多肽，不论是自然产生或全部或部分合成。因此，包括抗体抗原结合位点、或与其他多肽（如来自另一个物种或属于另一个抗体类或子类）融合的等效物的嵌合分子包括在内。在 EP-A-0120694 和 EP-A-0125023，以及随后的大量文献中介绍了嵌合抗体的克隆和表达。

[0075] 抗体工程技术可进一步使人们有可能对人和人源化的抗体进行分离。例如，人类杂交瘤可如 Kontermann & Dubel(Kontermann, R & Dubel, S, Antibody Engineering, Springer-Verlag New York, LLC ;2001 年, ISBN :3540413545) 中所述制备。噬菌体展示，另一个已确定的产生结合元件的技术已在许多出版物中被详细介绍，如 Kontermann & Dubel(Antibody Engineering, Springer-Verlag New York, LLC ;2001 年, ISBN : 3540413545) 和 WO92/01047（下文将进一步讨论），美国专利 US5969108、US5565332、US5733743、US5858657、US5871907、US5872215、US5885793、US5962255、US6140471、US6172197、US6225447、US6291650、US6492160、US6521404。

[0076] 转基因小鼠可用于分离人类抗体，所述小鼠如其中鼠抗体基因失活并被人类抗体基因功能上地取代，而留下小鼠免疫系统的完整的其他组件的小鼠 (Mendez, M. 等 . (1997) Nature Genet, 15(2) :146-156)。人源化的抗体可应用本领域的已知技术来生产，例如 WO91/09967、US 5,585,089、EP592106、US 565,332 和 WO93/17105 的公开报道。此外，WO2004/006955 描述了基于从人类抗体基因选择可变区框架序列的人源化抗体的方法，其通过比较非人类抗体的可变区 CDR 序列的标准 CDR 结构类型与人类抗体序列库中相应的 CDR 序列的标准 CDR 结构类型，如生殖细胞抗体基因片段。人类抗体的可变区具有与

非人类 CDR 类似的标准 CDR 结构类型，形成人类抗体序列的元件子集，从中选择人类框架序列。该子集元件可根据人类和非人类 CDR 序列的氨基酸相似性进行进一步的排名。在 WO2004/006955 中的方法，选择最高排名的人类序列为构建嵌合抗体提供框架序列，使用选定的子集元件人类框架在功能上取代人类 CDR 序列与非人类 CDR 序列，从而提供了具有高亲和性和低免疫原性的人源化抗体，并无需比对非人类和人类抗体的框架序列。根据公开的方法制作嵌合抗体。

[0077] 可通过合成的寡核苷酸基因表达并在合适的表达载体上组装构建合成抗体分子，例如，由 Knappik 等人阐述的方法 (Knappik 等，(2000)J.Mol.Biol.296,57-86) 或 Krebs 等，(Krebs 等，(2001)J.Immunological Methods 254 67-84)。

[0078] 已证明整体抗体的片段可以行使结合抗原的功能。结合片段的例子是 :(i)VL，VH，CL 和 CH1 结构域组成的 Fab 片段 ;(ii)VH 和 CH1 结构域组成的 FD 片段 ;(iii) 单一的抗体的 VL 和 VH 结构域组成的抗体片段 ;(iv)dAb 片段 (Ward，E.S. 等，(1989)Nature 341,544-546 ;McCafferty 等 (1990)Nature,348,552-554 ;Holt 等 (2003)Trends in Biotechnology 21,484-490)，其由一个 VH 或 VL 结构域组成 ;(v) 分离的 CDR 区 ;(vi)F(ab′)2 片段，包括两个相连的 Fab 片段的二价片段 ;(vii) 单链 Fv 分子 (scFv)，其中通过连接肽使 VH 和 VL 结构域相连，所述连接肽使两个结构域相连形成一个抗原结合位点 (Bird 等，(1988)Science,242,423-426 ;Huston 等，(1988)PNAS USA,85,5879-5883) ;(viii) 双特异性单链抗体二聚体 (PCT/US92/09965) 及 (ix)“双抗体”，通过基因融合构建多价或多特异性片段 (WO94/13804 ;Holliger，P. 等，(1993)PNAS USA 90 6444-6448)。抗体、单链抗体或双链抗体分子通过二硫键连接 VH 和 VL 结构域维持稳定 (Reiter，Y. 等，(1996) Nature Biotech,14,1239-1245)。微型抗体包括连接到 CH3 结构域的单链抗体 (Hu,S. 等，(1996)Cancer Res.,56,3055-3061)。结合片段的另一个例子是 Fab’，与 Fab 片段不同的是重链 CH1 结构域的羧基末端加入少量残基，包括一个或多个抗体绞链区的半胱氨酸和 Fab′ -SH，因此 Fab′ 片段，其中半胱氨酸残基的恒定区承载一个游离的巯基组。

[0079] Qui 等 (Qui 等 (2007 年)Nat.Biotechnol.25 :921-929) 描述了只含有两个通过框架区连接的 CDR 的抗体分子。VH 或 VL 结构域的 CDR3 连接到其他结构域的 CDR1 或 CDR2 环。通过 FR 区域，选定 CDR1 或 CDR2 的 C 端与 CDR3 的 N 端相连接。Qui 等选择具有最少疏水性基团的 FR 区。测试抗体的最佳组合为通过 VH FR2 连接 VL CDR1 与 VH CDR3(VHCDR1-VHFR2-VLCDR3)。在分子量大约 3kDa，这些抗体分子提供改进的组织渗透方面的优势与完整免疫球蛋白 (约 150kDa 的) 或单链抗体 (约 28kDa) 相比较 (Qui 等，(2007) Nat.Biotechnol.25 :921-929)。

[0080] 本发明的抗体片段可从亲本抗体分子或任何抗体分子的 2、3、4、5、7、8、10、14、16、17、18、19、21、22 和 23 获得，通过如酶消化的方法，例如通过胃蛋白酶或木瓜蛋白酶和 / 或通过化学还原使二硫键断裂。另一种方式，本发明包括的抗体片段可以通过领域内被人所熟知的基因重组技术或其他肽合成的手段获得，例如，自动多肽合成仪，如由美国应用生物系统公司提供等，或通过核酸的合成和表达获得。

[0081] 根据本发明的功能性抗体片段包括任何半衰期通过化学修饰提高的功能片段，尤其是聚乙二醇化，通过融合白蛋白或其片段来并入脂质体。

[0082] dAb(结构域抗体) 是小的单体的抗原结合的抗体片段，即抗体重链或轻链的可变

区域 (Holt 等 (2003)Trends in Biotechnology 21,484-490)。VHdAb 在骆驼科动物 (例如骆驼、美洲驼) 中自然存在,且可通过靶抗原免疫骆驼科动物,分离抗原特异性的 B 细胞并直接从个体 B 细胞克隆 dAb 基因产生。dAb 也可由细胞培养产生。dAb 的小尺寸、可溶性和温度稳定性使其尤其是生理学上可用的且适合于选择和亲和性成熟。正在研发用于治疗用途的骆驼科动物 VH dAb,其称为“纳米抗体 TM”。本发明的结合元件可能是 dAb,其包括基本上如本文所述的 VH 或 VL 结构域,或包括一组基本上如本文所述的 CDR 的 VH 或 VL 结构域。

[0083] 双特异性或双功能抗体形成第二代单克隆抗体,两个不同的可变区结合在同一分子上 (Holliger 和 Bohlen(1999)Cancer & Metastasis Rev.18 :411-419)。已证明由于他们补充新效应物功能或在肿瘤细胞表面靶向几种分子的能力,双特异性或双功能抗体可用于诊断领域和治疗领域。凡使用的双特异性抗体,这些可是传统的双特异性抗体,可由多种方式制造 (Holliger,P. 和 Winter G.(1993)Curr.Op.Biotech.4,446-449),例如化学制备或来自于混合杂交瘤,或可能是任何的上述双特异性抗体片段。这些抗体可通过化学方法 (Glennie M J 等,(1987)J.Immunol.139,2367-2375 ;Repp R. 等,(1995)J.Hematother.4 :415-21) 或体细胞方法 (Staerz U.D. 和 Bevan M.J.(1986)PNAS USA 83 :1453-7 ;Suresh M.R. 等,(1986)Method Enzymol.121 :210-228) 获得,但优选地还可通过基因工程技术获得,其允许异源二聚化作用形成并因此促进抗体的纯化过程 (Merchand 等,(1998)Nature Biotech.16 :677-681)。双特异性抗体的实施例包括 BiTE™ 技术的那些,其中可以使用具有不同特异性的两个抗体的结合域并通过短的可弯曲多肽直接连接。短的可弯曲多肽在短的单链多肽上使两个抗体结合。构建双抗体和 scFv 不需要 Fc 区域,只使用可变区,潜在地降低了抗个体遗传型翻译的效果。

[0084] 可将双特异性抗体构建为完整 IgG、双特异性 Fab′ 2、Fab′ PEG、双抗体或双特异性 scFv。此外,使用本领域已知的常规方法连接两个双特异性抗体以形成四价抗体。

[0085] 与双特异性整体抗体相反,双特异性双抗体,也可能是特别有用的,因为其很容易被构建并在大肠杆菌中表达。使用噬菌体展示库 (WO94/13804) 可以很容易地选择适当结合特异性的双抗体 (和许多其他多肽,如抗体片段)。如果双抗体的一个臂保持不变,例如,具有对 IL-6 的特异性,然后可构建另一变化的臂和选择的适当特异性的抗体的库。可通过其他工程方法构建双特异性整体抗体,如 Ridgeway 等所述 (Ridgeway,J.B.B. 等 (1996) Protein Eng.,9,616-621)。

[0086] 可以使用各种本领域获得抗 IL-6 的抗体的方法。抗体可以是单克隆抗体,特别是人类、小鼠、嵌合或人源化来源,其可以通过本领域技术人员已知的标准方法获得。

[0087] 一般来说,单克隆抗体或其功能片段的制备,尤其是鼠源的,可能涉及在特定描述手册中的“抗体”技术 (Harlow 和 Lan, antibody :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., pp.726,1988) 或者涉及 Köhler 和 Milstein 描述的从杂交瘤中的制备技术 (Köhler and Milstein(1975)Nature,256 :495-497)。

[0088] 单克隆抗体可以例如从免疫的抗 IL-6 的动物的 B 细胞,或含有被所述单克隆抗体识别的表位的片段中获得。本文描述了包括这些的合适的片段和肽或多肽,并可以用于免疫动物以产生抗 IL-6 的抗体。所述 IL-6,或其片段之一,尤其地能够根据通常的工作方法,

通过以包含在编码 IL-6 或其片段的 cDNA 序列中的核酸序列起始，通过包含在 IL-6 和 / 或其片段的肽序列的氨基酸序列起始的基因重组制造。

[0089] 单克隆抗体可以例如在亲和柱上进行纯化，其中 IL-6 或者其含有被所述单克隆抗体识别的表位的片段被预先固定。更特别地，单克隆抗体可以通过关于蛋白 A 和 / 或 G 的色谱纯化，接下来进行或不进行旨在清除残留蛋白质污染物及 DNA 和 LPS 的离子交换色谱，本身接下来进行或不进行琼脂糖凝胶排阻色谱，其用于去除由于二聚体或其他多聚体存在导致的潜在的聚集体。在一实施例中，这些技术可以整体同时或连续使用。

[0090] 抗原结合位点

[0091] 这描述了与靶抗原的全部或部分结合并与其互补的分子的部分。在抗体分子中，其被称作抗体抗原结合位点，并且包括与靶抗原的全部或部分结合并与其互补的抗体部分。当抗原较大时，抗体可以仅结合抗原的特定部分，该部分被称为表位。抗体抗原结合位点可以由一个或多个抗体可变区提供。抗体抗原结合位点包括抗体轻链可变区 (VL) 和抗体重链可变区 (VH)。

[0092] WO 2006/072620 描述了在结构 (非 -CDR) 环中的抗原结合位点的工程化，所述环在免疫球蛋白结构域 β 折叠之间延伸。抗原结合位点可以被设计在从 CDR 自然区位分离的抗体分子的区域中，例如在 VH 或 VL 结构域的构架区，或者在抗体恒定区例如 CH1 和 / 或 CH3。设计在结构域中的抗原结合位点可以额外地，或取代地形成 VH 和 VL 结构域的 CDR 组的抗原结合位点。其中在抗体分子中存在多个抗原结合位点，它们可以结合相同的抗原 (IL-6)，从而增加结合元件的化合价。可取代地，多个抗原结合位点可以结合不同的抗原 (IL-6 和一个或多个其他抗原)，其可以用于增加效应物功能，延长半衰期或者改进体内抗体分子的递送。

[0093] 分离的

[0094] 这指本发明的结合元件或编码该结合元件的核酸一般与本发明一致所处的状态。因此，根据本发明的结合元件、VH 和 / 或 VL 结构域以及编码的核酸分子和载体可以以分离的和 / 或纯化的形式提供，例如来自自然环境，基本上是纯的，或同源形式的，或者，如果是核酸，其是游离的，或基本上是游离的核酸或者原始的基因，而不是编码具有所需功能的多肽的序列。分离的元件和分离的核酸没有或基本没有其自然相关的物质，如在其自然环境中，或通过体外或体内实施的重组 DNA 技术制备时的制备环境 (如细胞培养) 中发现的其它多肽或核酸。元件和核酸可以利用稀释剂或辅剂制成，并且出于实际目的可以仍然是分离的一例如，如果在免疫试验中用于涂覆微滴定板，元件通常与凝胶或者其它载体混合，或者当用于诊断或治疗时元件与药物可接受的载体或稀释剂混合。结合元件可以自然地或通过异源真核细胞系统 (如 CHO 或 NSO(ECACC85110503)) 被糖基化，或者其可以是未糖基化的 (例如，如果通过在原核细胞中表达产生)。

[0095] 包括抗 IL-6 抗体分子的异构体制剂也构成了本发明的部分。例如这种制剂可以是具有全长重链和缺乏 C 末端赖氨酸的重链的抗体的混合物，其具有不同程度的糖基化和 / 或具有衍生的氨基酸，例如 N- 末端谷氨酸的环化作用形成焦谷氨酸残基。

[0096] 正如本文所使用的，短语“基本上列出”指的是本文中描述的结合元件的 VH 或 VL 结构域的相关 CDR，其可以与本文中列出的序列的特异性区域一致或高度相似。如本文所述，短语“高度相似”与一个或多个可变区的特异性区域相关，设想在 CDR 和 / 或 VH 或 VL 结

构域中，可以有 1 到约 5，例如从 1 到 4，包括 1 到 3、或 1、或 2、或 3、或 4 个氨基酸取代。

附图说明

[0097] 图 1 抗体 18E，但不是包括 YTE 表位的抗体 18Fc 区。在酶联免疫吸附测定 (ELISA) 中，使用抗 YTE 捕获抗体检测位于 Fc 区中的 YTE 表位的存在。其示出了抗体 18 和抗体 18E 的 ELISA 滴定曲线。

[0098] 图 2 被抗体 18 结合的 IL-6，使用 ELISA 法监测抗体 18E、IL-6 抗体 A(AB A) 和 IL-6 抗体 B(AB B)。将源自大肠杆菌的重组 IL-6 用作捕获剂。抗体 18 和抗体 18E 示出了基本上相同的 IL-6 结合活性。检测到抗体 18 和抗体 18E 的 EC_{50} 分别为 6.1pM 和 6.5pM。

[0099] 图 3 抗体 18 和抗体 18E 在抑制 IL-6 诱导的 TF-1 细胞增殖方面具有基本上相同的效率。测定抗体 18、抗体 18E、IL-6 抗体 A(AB A) 和 IL-6 抗体 B(AB B) 的 IC_{50} 值。示出了抗体浓度函数的最大抑制曲线百分比。检测到抗体 18 和抗体 18E 的 IC_{50} 分别为 4.5pM 和 5.2pM。

[0100] 图 4 抗体 18 和抗体 18E 在抑制内源性 IL-6 诱导的 VEGF 从人类滑膜成纤维细胞中的释放方面具有基本上相同的效率。测定抗体 18、抗体 18E、IL-6 抗体 A(AB A) 和 IL-6 抗体 B(AB B) 的 IC_{50} 值。示出了抗体浓度函数的最大抑制曲线百分比。检测到抗体 18 和抗体 18E 的 IC_{50} 分别为 1.3pM 和 1.2pM。

[0101] 图 5 抗体 18 和抗体 18E 的药代动力学特征。对猕猴皮下给药或静脉注射 5mg/kg 的单剂量的抗体 18 或抗体 18E。在施用抗体后接着检测血浆抗体水平，以时间函数示出。静脉和皮下给药后，抗体 18 的半衰期分别大约为 8.5 天和 9.1 天。静脉和皮下给药后，抗体 18E 的半衰期分别大约为 28.4 天和 28.8 天。

[0102] 图 6 抗体 18 和抗体 18E 的药代动力学和药效学的特征。对猕猴皮下给药 5mg/kg 的抗体 18 或抗体 18E。在施用抗体后接着检测血浆抗体水平，以时间函数示出。静脉和皮下给药后，抗体 18 的半衰期分别大约为 8.5 天和 9.1 天。静脉和皮下给药后，抗体 18E 的半衰期分别大约为 28.4 天和 28.8 天。符号表示实验的 PK 和 PD 数据，虚线是同时适用于 PK 和 PD 数据的 PKPD 模型。估计的抗体 18 和抗体 18E 的半衰期分别为 9.1 天和 28.8 天。估计的抗体 18 和抗体 18E 的清除率分别为 13.1ml/ 天 /kg 和 2.8ml/ 天 /kg。

[0103] 图 7 在皮下给药不同剂量的抗体 18E 后，在 RA 患者血浆中游离的 IL-6 水平的模拟实验。该模拟实验预测在每 8 周皮下给药 100mg 的抗体 18E，或每 4 周皮下给药 50mg 的抗体 18E 后，应该能达到持续抑制至少 90％ IL-6 介导的信号转导。预测每 12 周皮下给药 100mg 的抗体 18E 不能达到持续抑制至少 90％ IL-6 介导的信号转导。

[0104] 图 8 在皮下给药不同剂量的抗体 18E 后，在 RA 患者血浆中游离的 IL-6 水平的模拟实验。该模拟实验预测在施用单独负荷剂量的 200mg 的抗体 18E，每 8 周施用维持剂量的 100mg 抗体 18E 时，应该能达到持续抑制至少 90％ IL-6 介导的信号转导。该模拟实验还预测每 8 周皮下给药 500mg 的抗体 18E 不能达到持续抑制至少 90％ IL-6 介导的信号转导。

[0105] 图 9 在皮下给药不同剂量的抗体 18 或抗体 18E 后，在 RA 患者血浆中游离的 IL-6 水平的模拟实验。该模拟实验表明，在皮下给药单独负荷剂量的 100mg 的抗体 18E，接着每月施用维持剂量的 50mg 的抗体 18E 时，应该能达到持续抑制至少 90％ IL-6 介导的信号转导。该模拟实验还预测，每两周皮下给药 100mg 剂量的抗体 18，而不是每月皮下给药 100mg

剂量的抗体 18 能达到持续抑制至少 90％ IL-6 介导的信号转导。

[0106] 图 10 在皮下给药不同剂量的抗体 18 或抗体 18E 后，在 RA 患者血浆中游离的 IL-6 水平的模拟实验。该模拟实验表明，在皮下给药单独负荷剂量的 200mg 的抗体 18E，接着每 4 周或每 8 周施用维持剂量的 100mg 的抗体 18E 时，应该能达到持续抑制至少 90％ IL-6 介导的信号转导。该模拟实验还预测每 4 周或每 8 周给药 100mg 的抗体 18 不能达到持续抑制至少 90％ IL-6 介导的信号转导。

[0107] 图 11 示出了在小鼠 FCA 尾模型中 46℃时 mAab406 对热过敏性的影响。

[0108] 图 12 示出了在小鼠 FCA 尾模型中 mAab406 对机械压力过敏性的影响。

[0109] 图 13. 示出了在小鼠 FCA24 小时模型中 mAab406 对热过敏性的影响。

[0110] 图 14. 示出了在小鼠 FCA48 小时模型中 mAb406 对热过敏性的剂量依赖型影响。

[0111] 图 15. 示出了在小鼠 FCA24 小时模型中 mAb406 对机械压力过敏性的剂量依赖型影响。

[0112] 图 16. 示出了在小鼠 FCA48 小时模型中 mAb406 对机械压力过敏性的剂量依赖型影响。

[0113] 图 17. 示出了在 48 小时在小鼠 FCA 尾模型中，小分子甲氧萘丙酸对热过敏性的影响。

[0114] 图 18. 示出了在 48 小时在小鼠 FCA 尾模型中，小分子甲氧萘丙酸对机械压力过敏性的影响。

[0115] 发明详述

[0116] 本发明涉及产生具有延长的体内半衰期的抗 IL-6 抗体的方法。使用本发明的方法，抗 IL-6 亲本抗体可能被修饰为产生具有延长的体内半衰期的抗 IL-6 抗体。为了实现本发明的方法，可以使用任何与人 IL-6 抗原特异性结合的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，在 PCT 公开号为 WO 2008/065378 的专利中公开的抗 IL-6 抗体可被修饰或为了实现本发明的方法使用。在一具体实施例中，在 PCT 公开号为 WO 2008/065378 中所指定的抗体 18（以下称为抗体 18 或 Ab18）可被修饰或为了实现本发明的方法使用。

[0117] 本发明提供了具有延长的体内半衰期的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，本文中所描述的抗 IL-6 抗体具有延长的体内半衰期，其长于具有相同的可变区和野生型恒定区的抗体的半衰期。在一具体实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体具有长于抗体 18 的延长的体内半衰期。

[0118] 本发明提供了具有延长的体内半衰期的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期是在哺乳动物体内测定的半衰期。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期是在非人灵长动物内测定的半衰期（例如，但不限于食蟹猴或猕猴）。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期是在人受试者中测定的半衰期。

[0119] 在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期长于具有相同的可变区和野生型恒定区的抗体的半衰期的至少 2 倍、至少 3 倍、至少 4 倍、至少 5 倍、至少 10 倍或至少 20 倍。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期长于具有相同的可变区和野生型恒定区的抗体的半衰期的 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍或 20 倍。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期长于具有相同的可变区和野生型恒定区的抗体的半衰期的 2 倍至 3 倍、2 倍至 5 倍、2 倍至 10 倍、3 倍至 5 倍或 3 倍至 10 倍。

[0120] 在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期长于具有相同的可变区和野生型恒定区的抗体的半衰期至少约 2 倍、至少约 3 倍、至少约 4 倍、至少约 5 倍、至少约 10 倍或至少约 20 倍。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期长于具有相同的可变区和野生型恒定区的抗体的半衰期约 2 倍、约 3 倍、约 4 倍、约 5 倍、约 10 倍或约 20 倍。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期长于具有相同的可变区和野生型恒定区的抗体的半衰期约 2 倍至约 3 倍、约 2 倍至约 5 倍、约 2 倍至约 10 倍、约 3 倍至约 5 倍、或约 3 倍至约 10 倍。

[0121] 在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期是至少 10 天、至少 15 天、至少 20 天、至少 25 天、至少 26 天、至少 27 天、至少 28 天、至少 29 天、至少 30 天、至少 35 天、至少 40 天、至少 45 天或至少 50 天。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期是 10 天、15 天、20 天、25 天、28 天、29 天、30 天、35 天、40 天、45 天或 50 天。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期是 10 天至 20 天、10 天至 30 天、10 天至 40 天、10 天至 50 天、20 天至 30 天、20 天至 40 天、20 天至 50 天、25 天至 30 天、25 天至 40 天、25 天至 50 天、30 天至 40 天、30 天至 50 天或 40 天至 50 天。

[0122] 在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期是至少约 10 天、至少约 15 天、至少约 20 天、至少约 25 天、至少约 26 天、至少约 27 天、至少约 28 天、至少约 29 天、至少约 30 天、至少约 35 天、至少约 40 天、至少约 45 天或至少约 50 天。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期是约 10 天、约 15 天、约 20 天、约 25 天、约 28 天、约 29 天、约 30 天、约 35 天、约 40 天、约 45 天或约 50 天。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期是约 10 天至约 20 天、约 10 天至约 30 天、约 10 天至约 40 天、10 天至约 50 天、约 20 天至约 30 天、约 20 天至约 40 天、约 20 天至约 50 天、约 25 天至约 30 天、约 25 天至约 40 天、约 25 天至约 50 天、约 30 天至约 40 天、约 30 天至约 50 天或约 40 天至约 50 天。

[0123] 本发明还提供具有降低的清除率的抗 IL-6 抗体。应将本文中所使用的术语清除理解为反映从血浆体积中，药物，即抗 IL-6 抗体每单位时间被彻底清除。在一实施例中，本文中描述的抗 IL-6 抗体相比于亲本抗 IL-6 抗体具有降低的清除率。在一具体实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体相比于抗体 18 具有降低的清除率。

[0124] 本发明提供了具有降低的清除率的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期是在哺乳动物体内测定的半衰期。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期是在非人灵长动物内测定的半衰期（例如，但不限于食蟹猴或猕猴）。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的半衰期是在人体中测定的半衰期。

[0125] 在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的清除率低于具有相同的可变区和野生型恒定区的抗体的半衰期的至少 2 倍、至少 3 倍、至少 4 倍、至少 5 倍、至少 10 倍或至少 20 倍。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的清除率低于具有相同的可变区和野生型恒定区的抗体的半衰期 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍或 20 倍。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的清除率低于具有相同的可变区和野生型恒定区的抗体的半衰期的 2 倍至 3 倍、2 倍至 5 倍、2 倍至 10 倍、3 倍至 5 倍、或 3 倍至 10 倍。

[0126] 在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的清除率具有相同的可变区和野生型恒定区的抗体的半衰期的至少约 2 倍、至少约 3 倍、至少约 4 倍、至少约 5 倍、至少约 10 倍或至少约 20 倍。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的清除率具有相同的可变区和野生型

恒定区的抗体的半衰期的约 2 倍、约 3 倍、约 4 倍、约 5 倍、约 10 倍或约 20 倍。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的清除率具有相同的可变区和野生型恒定区的抗体的半衰期的约 2 倍至约 3 倍、约 2 倍至约 5 倍、约 2 倍至约 10 倍、约 3 倍至约 5 倍、或约 3 倍至约 10 倍。

[0127] 在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的清除率是至多 1mL/kg/ 天、至多 2mL/kg/ 天、至多 3mL/kg/ 天、至多 4mL/kg/ 天、至多 5mL/kg/ 天、至多 7mL/kg/ 天、至多 10mL/kg/ 天、至多 15mL/kg/ 天或至多 20mL/kg/ 天。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的清除率是 1mL/kg/ 天、2mL/kg/ 天、3mL/kg/ 天、4mL/kg/ 天、5mL/kg/ 天、7mL/kg/ 天、10mL/kg/ 天、15mL/kg/ 天或 20mL/kg/ 天。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的清除率是 1mL/kg/ 天至 2mL/kg/ 天、1mL/kg/ 天至 3mL/kg/ 天、1mL/kg/ 天至 5mL/kg/ 天、1mL/kg/ 天至 10mL/kg/ 天、1mL/kg/ 天至 15mL/kg/ 天、2mL/kg/ 天至 5mL/kg/ 天、2mL/kg/ 天至 10mL/kg/ 天、3mL/kg/ 天至 5mL/kg/ 天、3mL/kg/ 天至 10mL/kg/ 天或 5mL/kg/ 天至 10mL/kg/ 天。

[0128] 在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的清除率是至多约 1mL/kg/ 天、至多约 2mL/kg/ 天、至多约 3mL/kg/ 天、至多约 4mL/kg/ 天、至多约 5mL/kg/ 天、至多约 7mL/kg/ 天、至多约 10mL/kg/ 天、至多约 15mL/kg/ 天或至多约 20mL/kg/ 天。另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的清除率是约 1mL/kg/ 天、约 2mL/kg/ 天、约 3mL/kg/ 天、约 4mL/kg/ 天、约 5mL/kg/ 天、约 7mL/kg/ 天、约 10mL/kg/ 天、约 15mL/kg/ 天或约 20mL/kg/ 天。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体的清除率是约 1mL/kg/ 天至约 2mL/kg/ 天、约 1mL/kg/ 天至约 3mL/kg/ 天、约 1mL/kg/ 天至约 5mL/kg/ 天、约 1mL/kg/ 天至约 10mL/kg/ 天、约 1mL/kg/ 天至约 15mL/kg/ 天、约 2mL/kg/ 天至约 5mL/kg/ 天、约 2mL/kg/ 天至约 10mL/kg/ 天、约 3mL/kg/ 天至约 5mL/kg/ 天、约 3mL/kg/ 天至约 10mL/kg/ 天或约 5mL/kg/ 天至约 10mL/kg/ 天。

[0129] 在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括变体 Fc 区。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括变体 Fc 区，其具有对 Fc 配体蛋白改变的亲和力。在一具体实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括变体 Fc 区，其具有对 FcRn 改变的亲和力。在一具体实施例中，FcRn 可以是鼠、人或灵长类（例如猕猴）的 FcRn 蛋白。

[0130] 在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括变体 Fc 区，具有对 Fc 配体蛋白增加的亲和力。在一具体实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括变体 Fc 区，具有对 FcRn 增加的亲和力。在一具体实施例中，FcRn 可以是鼠、人或灵长类（例如猕猴）的 FcRn 蛋白。

[0131] 在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括变体 Fc 区，其对 Fc 配体蛋白的结合亲和力取决于 pH 值。在一具体实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括变体 Fc 区，其对 FcRn 的结合亲和力取决于 pH 值。在一具体实施例中，FcRn 可以是鼠、人或灵长类（例如猕猴）的 FcRn 蛋白。

[0132] 在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括相对于野生型人 IgG 恒定区的具有一个或多个氨基酸取代的人 IgG 恒定区。在不同的实施列中，人 IgG 恒定区可以是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 恒定区。在一具体实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括相对于野生型人 IgG 恒定区的具有一个或多个氨基酸取代的人 IgG1 恒定区。

[0133] 在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括人 IgG 恒定区，其具有一个或多个选自下组的氨基酸取代 :M252Y、M252F、M252W、M252T、S254T、T256S、T256R、T256Q、T256E、T256D、T256T、L309P、Q311S、H433R、H433K、H433S、H433I、H433P、H433Q、N434H、N434F、N434Y 和

N436H，其中根据 Kabat 中的 EU 索引给氨基酸残基进行编号。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括人 IgG 恒定区，其具有一个或多个选自下组的氨基酸取代：M252Y、S254T、T256E、H433K、N434F 和 N436H，其中根据 Kabat 中的 EU 索引给氨基酸残基进行编号。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括人 IgG 恒定区，其具有一个或多个选自下组的氨基酸取代：M252Y、S254T 和 T256E，其中根据 Kabat 中的 EU 索引给氨基酸残基进行编号。在一具体实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括人 IgG 恒定区，其包括 M252Y、S254T 和 T256E 氨基酸取代，其中根据 Kabat 中的 EU 索引给氨基酸残基进行编号。在不同的实施列中，人 IgG 恒定区可以是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 恒定区。在一具体实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括人 IgG1 恒定区，其包括 M252Y、S254T 和 T256E 氨基酸取代，其中根据 Kabat 中的 EU 索引给氨基酸残基进行编号。

[0134] 在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括抗体 18 的 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个或者全部 6 个 CDR（参见公开号为 WO 2008/065378 的 PCT 专利）。

[0135] 根据 Kabat 限定的抗体 18 的重链可变区 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：1、SEQ ID NO：2 和 SEQ ID NO：3。根据 Kabat 限定的抗体 18 的轻链可变区 CDR1、CDR2 和 CDR3 的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：4、SEQ ID NO：5 和 SEQ ID NO：6。

[0136] Kabat 编号基于 Kabat 等人的开创性工作 (1991)。免疫目标蛋白的序列，公开号 91-3242，被美国国立卫生研究院，国家技术信息服务公布于第三卷中（下文称“Kabat”）。Kabat 提供了来自多种抗体亚型的免疫球蛋白链的多序列比对。根据单独的编号系统 (Kabat 编号系统）给比对的序列进行编号。从 1991 年公开后，Kabat 序列已经更新并且可以获得其电子序列数据库（最新的下载版本为 1997）。根据 Kabat，通过与 Kabat 参考序列进行比对后，可以给任何免疫球蛋白进行编号。因此，Kabat 编号系统为免疫球蛋白链编号提供了统一的方法。除非另有说明，本文中所描述的所有免疫球蛋白氨基酸序列都根据 Kabat 编号系统进行编号。同样地，本文提到的所有氨基酸位置根据 Kabat 编号系统进行编号。

[0137] 在某些实施例中，本文中描述的抗 IL-6 抗体可包括重链可变区 VH，其包括至少一个 CDR，所述 CDR 具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO：1，SEQ ID NO：2 和 SEQ ID NO：3。在特定实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体可包括 VH 域，其具有 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列。

[0138] 在某些实施例中，本文中描述的抗 IL-6 抗体可包括轻链可变区 VL，其包括至少一个 CDR，所述 CDR 具有选自下组的氨基酸序列：SEQ ID NO：4，SEQ ID NO：5 和 SEQ ID NO：6。在特定实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体可包括 VL 域，其具有 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列。

[0139] 在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括具有 SEQ ID NO：8 的氨基酸序列的 VL 结构域，还包括具有 SEQ ID NO：7 的氨基酸序列 VH 域。

[0140] 本发明包含与人 IL-6 结合的抗体，其包括 VH 结构域的衍生物，VHCDR1、VH CDR2、VH CDR3，VL 结构域，VL CDR1、VL CDR2 或 VL CDR3，其可与人 IL-6 结合。本领域技术人员已知的标准技术可以用于在核苷酸序列中引入突变（例如增加，缺失和 / 或取代），所述核苷酸序列编码抗体，包括例如，位点定向诱变和 PCR 导致的诱变，其能够常规地用于产生氨基酸取代。在一实施例中，相比于抗体 18 抗 IL-6 抗体的原始 VH 和 / 或 VL CDR 衍生物，VH 和 / 或 VL CDR 衍生物，可包括少于 25 个氨基酸取代、少于 20 个氨基酸取代、少于 15 个氨基酸取代、少于 10 个氨基酸取代、少于 5 个氨基酸取代、少于 4 个氨基酸取代、少于 3 个氨

基酸取代、少于 2 个氨基酸取代或 1 个氨基酸取代。在另一实施例中，VH 和 / 或 VL CDR 衍生物可包括保守的氨基酸取代（例如上文），其发生在一个或多个预测的非必要氨基酸残基中（也就是，在抗体与人 IL-6 特异性结合中不起关键作用的氨基酸残基）。可以在 VH 和 / 或 VL CDR 编码序列中全部或部分随机引入突变，例如包括饱和诱变，由此产生的突变体对其生物活性进行筛选，以鉴定出保持活性的突变体。诱变后，表达编码的抗体并且测定抗体的活性。

[0141] 本发明还包括与人 IL-6 结合的抗体，所述抗体或抗体片段包括一个或多个 CDR，其中所述 CDR 包括与抗体 18 的一个或多个 CDR 氨基酸序列具有至少 45％、至少 50％、至少 55％、至少 60％、至少 65％、至少 70％、至少 75％、至少 80％、至少 85％、至少 90％、至少 95％或至少 99％相同的氨基酸序列。两个氨基酸序列的相同百分比可以通过本领域任何已知的方法确定，包括但不局限于 BLAST 蛋白检索。

[0142] 本发明还包括与人 IL-6 结合的抗体，所述抗体或抗体片段包括 VH 和 / 或 VL 结构域，其中所述 VH 和 / 或 VL 结构域包括与抗体 18 的一个或多个 CDR 氨基酸序列具有至少 45％、至少 50％、至少 55％、至少 60％、至少 65％、至少 70％、至少 75％、至少 80％、至少 85％、至少 90％、至少 95％或至少 99％相同的氨基酸序列。两个氨基酸序列的相同百分比可以通过本领域任何已知的方法确定，包括但不局限于 BLAST 蛋白检索。

[0143] 在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体可与人 IL-6 结合，相比于抗体 18，其具有亲和性。

[0144] 在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体与抗体 18 一样，与 IL-6 的相同表位特异性结合。

[0145] 在一实施例中，与 IL-6 结合时，抗 IL-6 抗体特异性地与抗体 18 竞争。使用本领域已知的结合试验进行竞争试验，例如，但不局限于 ELISA 试验或放射免疫法。

[0146] 本发明还提供了由编码具有延长的体内半衰期的抗 IL-6 抗体的核苷酸序列组成的多核苷酸。本发明还包含多核苷酸，其在本文中限定的严格或低严格杂交条件下与编码具有延长的体内半衰期的抗 IL-6 抗体的多核苷酸杂交。

[0147] 在一实施例中，本发明的多核苷酸编码具有延长的体内半衰期的抗 IL-6 抗体，在此处包括优化的多核苷酸序列。在一具体实施例中，本发明的编码抗 IL-6 抗体的 VH 结构域的多核苷酸，在此处包括 SEQ ID NO :11 的核苷酸序列。在一具体实施例中，本发明的编码抗 IL-6 抗体的 VL 结构域的多核苷酸，在此处包括 SEQ ID NO :12 的核苷酸序列。在一具体实施例中，本发明的编码抗 IL-6 抗体的重链的多核苷酸，在此处包括 SEQ ID NO :13 的核苷酸序列。在一具体实施例中，本发明的编码抗 IL-6 抗体的轻链的多核苷酸，在此处包括 SEQ ID NO :14 的核苷酸序列。

[0148] 本发明的另一实施例是载体，其包括编码具有延长的体内半衰期的抗 IL-6 抗体的多核苷酸。

[0149] 在一实施例中，本发明的载体包括编码具有延长的体内半衰期的抗 IL-6 抗体的一个或多个核苷酸序列，其中所述核苷酸序列是优化的核苷酸序列。在一具体实施例中，本发明的载体包括 SEQ ID NO :11-14 的核苷酸序列中的任意一个。在另一具体实施例中，本发明的载体包括编码具有延长的体内半衰期的抗 IL-6 抗体的一个或多个核苷酸序列，其中所述核苷酸序列选自 SEQ ID NO :11-14。

[0150] 本发明还涉及分离的包括载体的细胞，其中所述载体包括编码具有延长的体内半衰期的抗 IL-6 抗体的一个或多个核苷酸序列。在一具体实施例中，本发明的分离的细胞包括选自 SEQ ID NO：11-14 的多核苷酸序列的多核苷酸。

[0151] 本发明的抗 IL-6 抗体包括 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 人类同型抗体。

[0152] 本发明还涉及包括抗 IL-6 抗体的药物组合物，所述抗体包括 SEQ ID NO：1-10 的氨基酸序列中的任意一种。

[0153] 本文中描述的抗 IL-6 抗体与人 IL-6 抗原可具有高亲和力。例如，本文中描述的抗体可具有至少 $2X10^5M^{-1}s^{-1}$、至少 $5X10^5M^{-1}s^{-1}$、至少 $10^6M^{-1}s^{-1}$、至少 $5X10^6M^{-1}s^{-1}$、至少 $10^7M^{-1}s^{-1}$、至少 $5X10^7M^{-1}s^{-1}$、或至少 $10^8M^{-1}s^{-1}$ 的结合速率常数或 k_{on} 速率（抗体 (Ab)+ 抗原 (Ag) k_{on} → Ab-Ag）。

[0154] 在另一实施例中，抗 IL-6 抗体可具有少于 $5x10^{-1}s^{-1}$、少于 $10^{-1}s^{-1}$、少于 $5x10^{-2}s^{-1}$、少于 $10^{-2}s^{-1}$、少于 $5x10^{-3}s^{-1}$、少于 $10^{-3}s^{-1}$、少于 $5x10^{-4}s^{-1}$，或少于 $10^{-4}s^{-1}$ 的 k_{off} 速率（(Ab-Ag) k_{off} →抗体 (Ab)+ 抗原 (Ag)）。在另一实施例中，本发明的抗体具有少于 $5x10^{-5}s^{-1}$、少于 $10^{-5}s^{-1}$、少于 $5x10^{-6}s^{-1}$、少于 $10^{-6}s^{-1}$、少于 $5x10^{-7}$s 1、少于 $10^{-7}s^{-1}$、少于 $5x10^{-8}s^{-1}$、少于 $10^{-8}s^{-1}$、少于 $5x10^{-9}s^{-1}$、少于 $10^{-9}s^{-1}$ 或少于 $10^{-1}0s^{-1}$ 的 k_{off}。

[0155] 在另一实施例中，抗 IL-6 抗体可具有至少 10^2M^{-1}、至少 $5X10^2M^{-1}$、至少 10^3M^{-1}、至少 $5X10^3M^{-1}$、至少 10^4M^{-1}、至少 $5X10^4M^{-1}$、至少 10^5M^{-1}、至少 $5X10^5M^{-1}$、至少 10^6M^{-1}、至少 $5X10^6M^{-1}$、至少 10^7M^{-1}、至少 $5X10^7M^{-1}$、至少 10^8M^{-1}、至少 $5X10^8M^{-1}$、至少 10^9M^{-1}、至少 $5X10^9M^{-1}$、至少 $10^{10}M^{-1}$、至少 $5X10^{10}M^{-1}$、至少 $10^{11}M^{-1}$、至少 $5X10^{11}M^{-1}$、至少 $10^{12}M^{-1}$、至少 $5X10^{12}M^{-1}$、至少 $10^{13}M^{-1}$、至少 $5X10^{13}M^{-1}$、至少 $10^{14}M^{-1}$、至少 $5X10^{14}M^{-1}$、至少 $10^{15}M^{-1}$、或至少 $5X10^{15}M^{-1}$ 的亲和常数或 Ka(k_{on}/k_{off}）。在还一实施例中，抗 IL-6 抗体可具有少于 $5x10^{-2}M$、少于 $10^{-2}M$、少于 $5x10^{-3}M$、少于 $10^{-3}M$、少于 $5x10^{-4}M$、少于 $10^{-4}M$、少于 $5x10^{-5}M$、少于 $10^{-5}M$、少于 $5x10^{-6}M$、少于 $10^{-6}M$、少于 $5x10^{-7}M$、少于 $10^{-7}M$、少于 $5x10^{-8}M$、少于 $10^{-8}M$、少于 $5x10^{-9}M$、少于 $10^{-9}M$、少于 $5x10^{-10}M$、少于 $10^{-10}M$、少于 $5x10^{-11}M$、少于 $10^{-11}M$、少于 $5x10^{-12}M$、少于 $10^{-12}M$、少于 $5x10^{-13}M$、少于 $10^{-12}M$、少于 $5x10^{-14}M$、少于 $10^{-14}M$、少于 $5x10^{-15}5M$、或少于 $10^{-15}M$ 的解离常数或 Kd(k_{off}/k_{on}）。

[0156] 用于根据本文描述的方法的抗体可与 IL-6 免疫特异性地结合并可具有少于 3000pM、少于 2500pM、少于 2000pM、少于 1500pM、少于 1000pM、少于 750pM、少于 500pM、少于 250pM、少于 200pM、少于 150pM、少于 100pM、少于 75pM 的解离常数，该解离常数使用本发明描述的方法或本领域任何已知一种方法（例如 BIAcore 试验，ELISA)(Biacore International AB，Uppsala，Sweden) 测定。在一具体实施例中，用于根据本文描述的方法的抗体可与人 IL-6 抗原免疫特异性地结合并可具有 25 至 3400pM、25 至 3000pM、25 至 2500pM、25 至 2000pM、25 至 1500pM、25 至 1000pM、25 至 750pM、25 至 500pM、25 至 250pM、25 至 100pM、25 至 75pM、25 至 50pM 的解离常数 (kd)，该解离常数使用本发明描述的方法或本领域任何已知一种方法（例如 BIAcore 试验，ELISA)(Biacore International AB，Uppsala，Sweden) 测定。在另一实施例中，用于根据本文描述的方法的抗 IL-6 抗体可与 IL-6 免疫特异性地结合并可具有 500pM、100pM、75pM 或 50pM 的解离常数 (kd)，该解离常数使用本发明描述的方法或本领域任何已知一种方法（例如 BIAcore 试验，ELISA) 测定。

[0157] 本发明还提供了由编码具有延长的体内半衰期的抗 IL-6 抗体的核酸序列组成的多核苷酸。本发明还包含多核苷酸，其在本文中限定的严格或低严格杂交条件下与编码具

有延长的体内半衰期的抗 IL-6 抗体的多核苷酸杂交。

[0158] 严格杂交条件包括，但不局限于，在 6X 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 中，在约 45℃下，与滤器结合的DNA杂交，然后在0.2X SSC/0.1％ SDS中，在约50-65℃下洗涤一次或多次。高度严格杂交条件，例如为在 6X 氯化钠 / 柠檬酸钠 (SSC) 中，在约 45℃下，与滤器结合的 DNA 杂交，然后在 0.2X SSC/0.1％ SDS 中，在约 60℃下洗涤一次或多次，或者本领域技术人员已知的任何其他严格杂交条件（参见例如 Ausubel，F.M. 等，eds.1989 Current Protocols in Molecular Biology，vol.1，Green Publishing Associates，Inc. 和 John Wiley and Sons，Inc.，NY，pages 6.3.1 至 6.3.6 和 2.10.3）。

[0159] 抗体可以是获得的，并且通过本领域已知的方法测定多核苷酸的核苷酸序列。例如，如果抗体的核苷酸序列已知，那么编码该抗体的多核苷酸可以从化学合成的寡聚核苷酸中聚集（如 Kutmeier 等，BioTechniques 17 :242(1994) 中所描述），简言之，其涉及包括编码该抗体的序列部分的寡聚核苷酸的重叠、这些寡聚核苷酸的退火和连接、以及通过 PCR 将连接的寡聚核苷酸扩增的合成方法。

[0160] 编码抗体的多核苷酸同样可以是来自合适的来源的核苷酸产生的。如果不能克隆含有编码特定抗体的核苷酸，但是该抗体分子的序列已知，那么编码免疫球蛋白的核苷酸可以化学合成或者从合适的来源（例如，从任何表达抗体的组织或细胞分离的抗体 cDNA 文库、或者 cDNA 文库、或者核酸、优选多聚腺苷酸 RNA，所述组织或细胞例如是选择表达抗体的杂交瘤细胞）获得，通过使用合成的引物进行 PCR 扩增，所述合成引物与序列的 3′ 端和 5′ 端杂交，或者通过使用特异于需识别的特定的基因序列的寡聚核苷酸探针克隆，例如，来自编码抗体的 cDNA 文库中的 cDNA 克隆。然后可以使用任何本领域已知的方法，将通过 PCR 产生的扩增的核苷酸克隆到可复制的克隆载体中。

[0161] IL-6 与许多疾病与病症相关。这些疾病和病症包括，但不局限于，炎症、疼痛和癌症。本发明的抗 IL-6 抗体，优选能够，例如中和 IL-6，降低体内 IL-6 水平，并对抗 IL-6 信号转导。因此，本发明的抗 IL-6 抗体，优选能够作为治疗这些病症或疾病的药物。

[0162] 本发明还提供了能够有效地中和受试者内的 IL-6 活性的抗体，其具有延长半衰期。不被特定的作用机制约束，本发明的抗 IL-6 抗体可以通过与 IL-6 结合而将其中和，从而阻止 IL-6 参与对于 IL-6 介导的信号转导所必须的蛋白质间的相互作用。在一实施例中，本发明的抗体能够降低游离的（也就是没有与抗 IL-6 抗体结合的）IL-6 的血清浓度。在生物流体（例如血浆）中游离的 IL-6 水平可以通过使用定量生物测定进行测定，例如，但不局限于 Papadopoulos 等人描述的 Jurnal of Clinical Laboratory Analysis 9 : 234-37(1995) 的生物测定。简言之，生物测定测量 IL-6 诱导的特定杂交瘤细胞（例如，B9 杂交瘤细胞）的增殖。可以通过双抗原夹心法测定游离的 IL-6 浓度。简言之，在血清中游离的 IL-6 可以被抗 IL-6 捕获抗体所捕获。该捕获抗体仅与缺乏抗体 18E 的 IL-6 和可溶性 IL-6 受体结合。使用检测抗体检测捕获的 IL-6，所述检测抗体不与捕获抗体竞争，并且也没有用钌或 HRP 标记。测量的电化学发光或比色信号与血清中游离的 IL-6 的浓度成正比。基于标准曲线计算血清中游离的 IL-6 的浓度。

[0163] 在一实施例中，本发明的抗体能够降低游离的（也就是没有被抗 IL-6 抗体结合的）IL-6 的血清浓度。施用有效剂量的本发明的抗 IL-6 抗体可以达到降低至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、

至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％游离的 IL-6 的血清浓度。有效剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。游离 IL-6 水平的降低可持续至少约 1 天、至少约 2 天、至少约 3 天、至少约 4 天、至少约 5 天、至少约 6 天、至少约 7 天、至少约 10 天、至少约 15 天、或至少约 20 天。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0164] 在另一实施例中，施用有效剂量的本发明的抗 IL-6 抗体可以达到持续的降低至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％游离的 IL-6 的血清浓度。在一实施例中，多于一次剂量的每次剂量包括相同量的抗 IL-6 抗体。有效剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，在初始负荷剂量之后施用维持剂量。初始负荷剂量可以包括多于维持剂量的抗 IL-6 抗体 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍或 10 倍。在一实施例中，分离剂量的时间间隔是固定的。抗 IL-6 抗体剂量可以每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每八周一次或每十二周一次进行给药。在一具体实施例中，每 4 周施用一次 50mg 剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，达到持续降低至少 90％游离的 IL-6 的血清浓度。在一具体实施例中，每 8 周施用一次 100mg 剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，达到持续降低至少 90％游离的 IL-6 的血清浓度。在一具体实施例中，每 12 周施用一次 200mg 剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，达到持续降低至少 90％游离的 IL-6 的血清浓度。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0165] 在一实施例中，本发明的抗体能够中和受试者内的血清。施用有效剂量的本发明的抗 IL-6 抗体可以达到中和至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的 IL-6 的。有效剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。血清 IL-6 的中和可持续至少约 1 天、至少约 2 天、至少约 3 天、至少约 4 天、至少约 5 天、至少约 6 天、至少约 7 天、至少约 10 天、至少约 15 天、或至少约 20 天。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0166] 在另一实施例中，施用多于一次剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，可以达到持续中和至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％血清 IL-6。在一实施例中，多于一次剂量的每次剂量包括相同量的抗 IL-6 抗体。有效剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，在初始负荷剂量之后施用维持剂量。初始负荷剂量可以包括多于维持剂量的抗 IL-6 抗体 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍或 10 倍。在一实施例中，分离剂量的时间间隔是固定的。抗 IL-6 抗体剂量可以每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每八周一次或每十二周一次进行给药。在一具体实施例中，每 4 周施用一次 50mg 剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，达到持续中和至少 90％的血清 IL-6。在一具体实施例中，每 8 周施用一次 100mg 剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，达到持续中和至少 90％的血清 IL-6。在一具体实施例中，每 12 周施用一次 200mg 剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，达到持续中和至少 90％的

血清 IL-6。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0167] 在一实施例中，本发明的抗体能够抑制受试者内 IL-6 介导的信号转导。施用有效剂量的本发明的抗 IL-6 抗体可以达到抑制至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％受试者内 IL-6 介导的信号转导。有效剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。受试者内 IL-6 介导的信号转导的抑制作用持续至少约 1 天、至少约 2 天、至少约 3 天、至少约 4 天、至少约 5 天、至少约 6 天、至少约 7 天、至少约 10 天、至少约 15 天或至少约 20 天。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0168] 在另一实施例中，施用多于一次剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，可以达到持续抑制至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％受试者内 IL-6 介导的信号转导在一实施例中，多于一次剂量的每次剂量包括相同量的抗 IL-6 抗体。有效剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，在初始负荷剂量之后施用维持剂量。初始负荷剂量可以包括多于维持剂量的抗 IL-6 抗体 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍或 10 倍。在一实施例中，分离剂量的时间间隔是固定的。抗 IL-6 抗体剂量可以每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每八周一次或每十二周一次进行给药。在一具体实施例中，每 4 周施用一次 50mg 剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，达到持续抑制至少 90％的受试者内 IL-6 介导的信号转导。在一具体实施例中，每 8 周施用一次 100mg 剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，达到持续抑制至少 90％的受试者内 IL-6 介导的信号转导。在一具体实施例中，每 12 周施用一次 200mg 剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，达到持续抑制至少 90％的受试者内 IL-6 介导的信号转导。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0169] 在一实施例中，本发明的抗体能够降低受试者内滑膜细胞的生长速度。施用有效剂量的本发明的抗 IL-6 抗体可以达到降低至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％受试者内滑膜细胞的生长速度。有效剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。受试者内滑膜细胞的生长速度的降低可持续至少约 1 天、至少约 2 天、至少约 3 天、至少约 4 天、至少约 5 天、至少约 6 天、至少约 7 天、至少约 10 天、至少约 15 天、或至少约 20 天。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0170] 在另一实施例中，施用多于一次剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，可以达到持续降低至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％受试者内滑膜细胞的生长速度。在一实施例中，多于一次剂量的每次剂量包括相同量的抗 IL-6 抗体。有效剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，在初始负荷剂量之后施用维持剂量。

初始负荷剂量可以包括多于维持剂量的抗 IL-6 抗体 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍或 10 倍。在一实施例中，分离剂量的时间间隔是固定的。抗 IL-6 抗体剂量可以每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每八周一次或每十二周一次进行给药。在一具体实施例中，每 4 周施用一次 50mg 剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，达到持续降低至少 90％的受试者内滑膜细胞的生长速度。在一具体实施例中，每 8 周施用一次 100mg 剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，达到持续降低至少 90％的受试者内滑膜细胞的生长速度。在一具体实施例中，每 12 周施用一次 200mg 剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，达到持续降低至少 90％的受试者内滑膜细胞的生长速度。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0171] 在一实施例中，本发明的抗体能够降低受试者内的滑膜炎症。施用有效剂量的本发明的抗 IL-6 抗体可以达到降低至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％受试者内的滑膜炎症。有效剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。受试者内的滑膜炎症的降低可持续至少约 1 天、至少约 2 天、至少约 3 天、至少约 4 天、至少约 5 天、至少约 6 天、至少约 7 天、至少约 10 天、至少约 15 天、或至少约 20 天。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0172] 在另一实施例中，施用多于一次剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，可以达到持续降低至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％受试者内的滑膜炎症。在一实施例中，多于一次剂量的每次剂量包括相同量的抗 IL-6 抗体。有效剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，在初始负荷剂量之后施用维持剂量。初始负荷剂量可以包括多于维持剂量的抗 IL-6 抗体 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍或 10 倍。在一实施例中，分离剂量的时间间隔是固定的。抗 IL-6 抗体剂量可以每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每八周一次或每十二周一次进行给药。在一具体实施例中，每 4 周施用一次 50mg 剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，达到持续降低至少 90％的受试者内滑膜炎症。在一具体实施例中，每 8 周施用一次 100mg 剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，达到持续降低至少 90％的受试者内滑膜炎症。在一具体实施例中，每 12 周施用一次 200mg 剂量的本发明的抗 IL-6 抗体，达到持续降低至少 90％的受试者内滑膜炎症。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0173] 本发明还提供降低游离 IL-6 的血清浓度、中和受试者内血清 IL-6、抑制受试者内 IL-6 介导的信号转导、降低受试者内滑膜细胞生长速度、并降低受试者内滑膜炎症的方法。

[0174] 在一实施例中，降低受试者内游离（也就是没有与抗 IL-6 抗体结合的）IL-6 的血清浓度的方法包括施用有效剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用有效剂量的抗 IL-6 抗体可以达到降低至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％游离 IL-6 的血清浓度。有效剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、

150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。游离 IL-6 水平的降低可持续至少约 1 天、至少约 2 天、至少约 3 天、至少约 4 天、至少约 5 天、至少约 6 天、至少约 7 天、至少约 10 天、至少约 15 天、或至少约 20 天。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。在一具体实施例中，降低受试者内至少约 90％的游离 IL-6 的血清浓度的方法包括施用有效剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体，所述有效剂量为 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg，其中持续至少约 1 天、至少约 2 天、至少约 3 天、至少约 4 天、至少约 5 天、至少约 6 天、至少约 7 天、至少约 10 天、至少约 15 天、或至少约 20 天降低至少 90％游离 IL-6 的血清浓度。

[0175] 在一实施例中，降低受试者内游离 IL-6 的血清浓度的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以降低至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的游离 IL-6 的血清浓度。在一实施例中，维持受试者内降低的游离 IL-6 的血清浓度的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以维持至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％降低的游离 IL-6 的血清浓度。在一实施例中，达到持续降低受试者内游离 IL-6 的血清浓度的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以达到持续降低至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％游离 IL-6 的血清浓度。在一实施例中，多于一次剂量的每次剂量包括相同量的抗 IL-6 抗体。单剂量可包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，在初始负荷剂量之后施用维持剂量。初始负荷剂量可以包括多于维持剂量的抗 IL-6 抗体 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍或 10 倍。在一实施例中，分离剂量的时间间隔是固定的。抗 IL-6 抗体剂量可以每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每八周一次或每十二周一次进行给药。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0176] 在一具体实施例中，降低受试者内至少约 90％的游离 IL-6 的血清浓度的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，降低受试者内至少约 90％的游离 IL-6 的血清浓度的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，降低受试者内游离 IL-6 的血清浓度至少约 90％的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持受试者内游离 IL-6 的血清浓度至少降低 90％的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持受试者内游离 IL-6 的血清浓度至少降低 90％的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持受试者内游离 IL-6 的血清浓度至少降低 90％的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内游离 IL-6 的血清浓度持续降低至少 90％的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内游离 IL-6 的血清浓度持续降低至少 90％的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗

体。在一具体实施例中，达到受试者内游离 IL-6 的血清浓度持续降低至少 90％的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0177] 在一具体实施例中，降低受试者内至少约 90％的游离 IL-6 的血清浓度的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，降低受试者内至少约 90％的游离 IL-6 的血清浓度的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，降低受试者内至少约 90％的游离 IL-6 的血清浓度的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持受试者内游离 IL-6 的血清浓度降低至少 90％的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持受试者内游离 IL-6 的血清浓度降低至少 90％的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持受试者内游离 IL-6 的血清浓度降低至少 90％的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内游离 IL-6 的血清浓度持续降低至少 90％的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内游离 IL-6 的血清浓度持续降低至少 90％的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内游离 IL-6 的血清浓度持续降低至少 90％的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0178] 在一实施例中，中和受试者内血清 IL-6 的方法包括施用有效剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用有效剂量的抗 IL-6 抗体可以达到中和至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的血清 IL-6。有效剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。血清 IL-6 的中和可持续至少约 1 天、至少约 2 天、至少约 3 天、至少约 4 天、至少约 5 天、至少约 6 天、至少约 7 天、至少约 10 天、至少约 15 天或至少约 20 天。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。在一具体实施例中，中和受试者内至少约 90％的血清 IL-6 的方法包括施用有效剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体，所述有效剂量为 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg，其中持续至少约 1 天、至少约 2 天、至少约 3 天、至少约 4 天、至少约 5 天、至少约 6 天、至少约 7 天、至少约 10 天、至少约 15 天或至少约 20 天中和至少 90％的血清 IL-6。

[0179] 在一实施例中，中和受试者内血清 IL-6 的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以中和至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的血清 IL-6。在一实施例中，维持受试者内血清 IL-6 中和的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗

体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以中和至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的血清 IL-6。在一实施例中，达到持续中和受试者内血清 IL-6 的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以达到中和降低至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的血清 IL-6。在一实施例中，多于一次剂量的每次剂量包括相同量的抗 IL-6 抗体。单剂量可包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，在初始负荷剂量之后施用维持剂量。初始负荷剂量可以包括多于维持剂量的抗 IL-6 抗体 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍或 10 倍。在一实施例中，分离剂量的时间间隔是固定的。抗 IL-6 抗体剂量可以每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每八周一次或每十二周一次进行给药。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0180] 在一具体实施例中，中和受试者内至少约 90％的血清 IL-6 的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，中和受试者内至少约 90％的血清 IL-6 的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，中和受试者内至少约 90％的血清 IL-6 的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持至少 90％中和受试者内血清 IL-6 的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持至少 90％中和受试者内血清 IL-6 的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持至少 90％中和受试者内血清 IL-6 的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内血清 IL-6 持续的至少 90％中和的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内血清 IL-6 持续的至少 90％中和的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内血清 IL-6 持续的至少 90％中和的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0181] 在一具体实施例中，中和受试者内至少约 90％的血清 IL-6 的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，中和受试者内至少约 90％的血清 IL-6 的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，中和受试者内至少约 90％的血清 IL-6 的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持至少 90％中和受试者内血清 IL-6 的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持至少 90％中和受试者内血清 IL-6 的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持至少 90％中和受试者内血清 IL-6 的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内血清 IL-6 持续的至少 90％中和的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和

(b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内血清 IL-6 持续的至少 90％中和的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内血清 IL-6 持续的至少 90％中和的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0182] 在一实施例中，中和受试者内 IL-6 的方法包括施用有效剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用有效剂量的抗 IL-6 抗体可以达到中和至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的 IL-6。有效剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。IL-6 的中和可持续至少约 1 天、至少约 2 天、至少约 3 天、至少约 4 天、至少约 5 天、至少约 6 天、至少约 7 天、至少约 10 天、至少约 15 天、或至少约 20 天。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。在一具体实施例中，中和受试者内至少约 90％的 IL-6 的方法包括施用有效剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体，所述有效剂量为 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg，其中持续至少约 1 天、至少约 2 天、至少约 3 天、至少约 4 天、至少约 5 天、至少约 6 天、至少约 7 天、至少约 10 天、至少约 15 天、或至少约 20 天中和至少 90％的 IL-6。

[0183] 在一实施例中，中和受试者内 IL-6 的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以中和至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的 IL-6。在一实施例中，维持受试者内 IL-6 中和的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以中和至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的 IL-6。在一实施例中，达到持续中和受试者内血清 IL-6 的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以达到中和降低至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的 IL-6。在一实施例中，多于一次剂量的每次剂量包括相同量的抗 IL-6 抗体。单剂量可包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，在初始负荷剂量之后施用维持剂量。初始负荷剂量可以包括多于维持剂量的抗 IL-6 抗体 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍或 10 倍。在一实施例中，分离剂量的时间间隔是固定的。抗 IL-6 抗体剂量可以每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每八周一次或每十二周一次进行给药。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0184] 在一具体实施例中，中和受试者内至少约 90％的 IL-6 的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，中和受试者内至少约 90％的 IL-6 的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，中和受试者内至少约 90％

的 IL-6 的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持至少 90％中和受试者内 IL-6 的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持至少 90％中和受试者内 IL-6 的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持至少 90％中和受试者内 IL-6 的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内 IL-6 持续的至少 90％中和的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内 IL-6 持续的至少 90％中和的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内 IL-6 持续的至少 90％中和的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0185] 在一具体实施例中，中和受试者内至少约 90％的 IL-6 的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，中和受试者内至少约 90％的 IL-6 的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，中和受试者内至少约 90％的 IL-6 的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持至少 90％中和受试者内 IL-6 的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持至少 90％中和受试者内 IL-6 的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持至少 90％中和受试者内 IL-6 的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内 IL-6 持续的至少 90％中和的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内 IL-6 持续的至少 90％中和的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内血清 IL-6 持续的至少 90％中和的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0186] 在一实施例中，抑制受试者内 IL-6 介导的信号转导的方法包括施用有效剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用有效剂量的抗 IL-6 抗体可以达到抑制至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的 IL-6 介导的信号转导。有效剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。IL-6 介导的信号转导的抑制可持续至少约 1 天、至少约 2 天、至少约 3 天、至少约 4 天、至少约 5 天、至少约 6 天、至少约 7 天、至少约 10 天、至少约 15 天、或至少约 20 天。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。在一具体实施例中，抑制受试者内至少约 90％的 IL-6 介导的信号转导的方法包括施用有效剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体，所述有效剂量为 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg，其中持续至少约 1 天、至少约 2 天、至少约 3 天、至少约 4 天、

至少约 5 天、至少约 6 天、至少约 7 天、至少约 10 天、至少约 15 天、或至少约 20 天。

[0187] 在一实施例中，抑制受试者内 IL-6 介导的信号转导的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以抑制至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的 IL-6 介导的信号转导。在一实施例中，维持抑制受试者内 IL-6 介导的信号转导的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以抑制至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的 IL-6 介导的信号转导。在一实施例中，达到持续抑制受试者内 IL-6 介导的信号转导的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以达到抑制至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的 IL-6 介导的信号转导。在一实施例中，多于一次剂量的每次剂量包括相同量的抗 IL-6 抗体。单剂量可包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，在初始负荷剂量之后施用维持剂量。初始负荷剂量可以包括多于维持剂量的抗 IL-6 抗体 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍或 10 倍。在一实施例中，分离剂量的时间间隔是固定的。抗 IL-6 抗体剂量可以每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每八周一次或每十二周一次进行给药。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0188] 在一具体实施例中，抑制受试者内至少约 90％的 IL-6 介导的信号转导的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，抑制受试者内至少约 90％的 IL-6 介导的信号转导的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，抑制受试者内至少约 90％的 IL-6 介导的信号转导的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持至少 90％抑制受试者内 IL-6 介导的信号转导的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持至少 90％抑制受试者内 IL-6 介导的信号转导的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持至少 90％抑制受试者内 IL-6 介导的信号转导的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内 IL-6 介导信号转导持续的至少 90％抑制的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内 IL-6 介导信号转导持续的至少 90％抑制的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内 IL-6 介导信号转导持续的至少 90％抑制的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0189] 在一具体实施例中，抑制受试者内至少约 90％的 IL-6 介导的信号转导的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，抑制受试者内至少约 90％的 IL-6 介导的信号转导的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实

施例中，抑制受试者内至少约 90％的 IL-6 介导的信号转导的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持抑制至少 90％受试者内 IL-6 介导的信号转导的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持抑制至少 90％受试者内 IL-6 介导的信号转导的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持抑制至少 90％受试者内 IL-6 介导的信号转导的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内 IL-6 介导的信号转导持续的至少 90％抑制的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内 IL-6 介导的信号转导持续的至少 90％抑制的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内 IL-6 介导的信号转导持续的至少 90％抑制的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0190] 在一实施例中，降低受试者内滑膜细胞生长速度的方法包括施用有效剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用抗 IL-6 抗体有效剂量的可以达到至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％降低的滑膜细胞生长速度。有效剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。滑膜细胞生长速度的降低可持续至少约 1 天、至少约 2 天、至少约 3 天、至少约 4 天、至少约 5 天、至少约 6 天、至少约 7 天、至少约 10 天、至少约 15 天或至少约 20 天。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。在一具体实施例中，降低受试者内滑膜细胞生长速度至少约 90％方法包括施用有效剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体，所述有效剂量为 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg，其中持续至少约 1 天、至少约 2 天、至少约 3 天、至少约 4 天、至少约 5 天、至少约 6 天、至少约 7 天、至少约 10 天、至少约 15 天或至少约 20 天。

[0191] 在一实施例中，降低受试者内滑膜细胞生长速度的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的降低受试者内滑膜细胞生长速度。在一实施例中，维持降低受试者内滑膜细胞生长速度的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以抑制至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的降低受试者内滑膜细胞生长速度。在一实施例中，达到持续降低受试者内滑膜细胞生长速度的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以达到至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的降低受试者内滑膜细胞

生长速度的方法。在一实施例中，多于一次剂量的每次剂量包括相同量的抗 IL-6 抗体。单剂量可包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，在初始负荷剂量之后施用维持剂量。初始负荷剂量可以包括多于维持剂量的抗 IL-6 抗体 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍或 10 倍。在一实施例中，分离剂量的时间间隔是固定的。抗 IL-6 抗体剂量可以每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每八周一次或每十二周一次进行给药。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0192] 在一具体实施例中，降低受试者内的细胞滑膜生长速度至少约 90％的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，降低受试者内的细胞滑膜生长速度至少约 90％的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，降低受体内的细胞滑膜生长速度至少约 90％的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持受体内细胞滑膜生长速度降低至少 90％的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持受试者内细胞滑膜生长速度降低至少 90％的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持受试者内细胞滑膜生长速度降低至少 90％的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内细胞滑膜生长速度持续的至少 90％降低的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内细胞滑膜生长速度持续的至少 90％降低的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内细胞滑膜生长速度持续的至少 90％降低的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0193] 在一具体实施例中，降低受试者内的细胞滑膜生长速度至少约 90％的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，降低受试者内的细胞滑膜生长速度至少约 90％的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，降低受试者内的细胞滑膜生长速度至少约 90％的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持受试者内细胞滑膜生长速度降低至少 90％的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持受试者内细胞滑膜生长速度降低至少 90％的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中维持受试者内细胞滑膜生长速度降低至少 90％的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内细胞滑膜生长速度持续的至少 90％降低的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内细胞滑膜生长速度持续的至少 90％降低的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内细胞滑膜生长速度持续的至少 90％降低的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。可

以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0194] 在一实施例中，降低受试者内滑膜细胞生长速度的方法包括施用有效剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用抗 IL-6 抗体有效剂量的可以达到至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％降低的滑膜细胞生长速度。有效剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。滑膜细胞生长速度的降低可持续至少约 1 天、至少约 2 天、至少约 3 天、至少约 4 天、至少约 5 天、至少约 6 天、至少约 7 天、至少约 10 天、至少约 15 天、或至少约 20 天。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。在一具体实施例中，降低受试者内滑膜细胞生长速度至少约 90％方法包括施用有效剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体，所述有效剂量为 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg，其中持续至少约 1 天、至少约 2 天、至少约 3 天、至少约 4 天、至少约 5 天、至少约 6 天、至少约 7 天、至少约 10 天、至少约 15 天、或至少约 20 天。

[0195] 在一实施例中，降低受试者内滑膜细胞生长速度的方法的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的降低受试者内滑膜细胞生长速度。在一实施例中，维持降低受试者内滑膜细胞生长速度的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以抑制至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的降低受试者内滑膜细胞生长速度。在一实施例中，达到持续降低受试者内滑膜细胞生长速度的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。施用多于一次剂量的抗 IL-6 抗体可以达到至少约 20％、至少约 30％、至少约 40％、至少约 50％、至少约 60％、至少约 70％、至少约 80％、至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 99％或至少约 100％的降低受试者内滑膜细胞生长速度的方法。在一实施例中，多于一次剂量的每次剂量包括相同量的抗 IL-6 抗体。单剂量可包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，在初始负荷剂量之后施用维持剂量。初始负荷剂量可以包括多于维持剂量的抗 IL-6 抗体 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍或 10 倍。在一实施例中，分离剂量的时间间隔是固定的。抗 IL-6 抗体剂量可以每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每八周一次或每十二周一次进行给药。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0196] 在一具体实施例中，降低受试者内的滑膜炎症至少约 90％的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，降低受试者内的滑膜炎症至少约 90％的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，降低受试者内的滑膜炎症至少约 90％的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持受试者内滑膜炎症降低至少 90％的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一

具体实施例中，维持受试者内滑膜炎症降低至少 90％的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持受试者内滑膜炎症降低至少 90％的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内滑膜炎症持续的至少 90％降低的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内滑膜炎症持续的至少 90％降低的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内滑膜炎症持续的至少 90％降低的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0197] 在一具体实施例中，降低受试者内的滑膜炎症至少约 90％的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，降低受试者内的滑膜炎症至少约 90％的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，降低受试者内的滑膜炎症至少约 90％的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持受试者内滑膜炎症降低至少 90％的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，维持受试者内滑膜炎症降低至少 90％的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中维持受试者内滑膜炎症降低至少 90％的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内滑膜炎症持续的至少 90％降低的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内滑膜炎症持续的至少 90％降低的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，达到受试者内滑膜炎症持续的至少 90％降低的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。可以通过本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。受试者可以是人类或非人的灵长类动物。

[0198] 本发明的另一些方面提供了包括本发明结合元件的组合物及其用于结合、抑制和 / 或中和 IL-6 的方法，包括通过治疗人类或动物体的治疗方法。

[0199] 根据本发明的结合元件可以用于治疗或诊断方法，例如人或动物体（例如人类患者）中疾病或病症的治疗方法（其可包括预防法），其包括给所述患者施用有效量的本发明的结合元件。根据本发明的治疗条件包括如本文其他地方详细讨论的任何 IL-6 在其中起作用的条件。

[0200] 在一实施例中，治疗所需患者的方法包括施用有效剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎、幼年性慢性关节炎、全身性青年关节炎，血清阴性脊柱关节病（包括关节强硬性脊椎柱炎、牛皮癣关节炎和莱特尔氏病）、牛皮癣或 SLE 的方法包括施用治疗上有效剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎的方法包括施用有效剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，治疗人体内炎症性肠道疾病或 SLE 的方法包括施用有效剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，治疗上的有效剂量可包括 1mg、

5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，治疗上的有效剂量可包括约 0.1 至 5mg/kg、约 0.1 至 2mg/kg、约 0.1 至 1mg/kg、约 0.3 至 2mg/kg、约 0.3 至 1mg/kg、约 0.5 至 2mg/kg、或约 0.5 至 1mg/kg 抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，治疗上的有效剂量可包括约 20 至 500mg、约 20 至 200mg、约 20 至 100mg、约 50 至 500mg、约 50 至 200mg、或约 50 至 100mg 抗 IL 至 6 抗体。可以使用本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。在一具体实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎、炎症性肠道疾病或 SLE 的方法包括施用 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎、炎症性肠道疾病或 SLE 的方法包括施用约 0.1 至 5mg/kg、约 0.1 至 2mg/kg、约 0.1 至 1mg/kg、约 0.3 至 2mg/kg、约 0.3 至 1mg/kg、约 0.5 至 2mg/kg、或约 0.5 至 1mg/kg 的具有延长的半衰期的抗 IL 至 6 抗体。在一具体实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎、炎症性肠道疾病或 SLE 的方法包括施用约 20 至 500mg、约 20 至 200mg、约 20 至 100mg、约 50 至 500mg、约 50 至 200mg、或约 50 至 100mg 具有延长的半衰期的抗 IL 至 6 抗体。

[0201] 在一实施例中，治疗所需患者的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎、幼年性慢性关节炎、全身性青年关节炎，血清阴性脊柱关节病（包括关节强硬性脊椎柱炎、牛皮癣关节炎和莱特尔氏病）、牛皮癣或 SLE 的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎的方法包括施用多于一次剂量的具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，多于一次剂量的每次剂量包括相同量的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，单剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，单剂量可以包括约 0.1 至 5mg/kg、约 0.1 至 2mg/kg、约 0.1 至 1mg/kg、约 0.3 至 2mg/kg、约 0.3 至 1mg/kg、约 0.5 至 2mg/kg、或约 0.5 至 1mg/kg 的抗 IL 至 6 抗体。在另一实施例中，单剂量可以包括约 20 至 500mg、约 20 至 200mg、约 20 至 100mg、约 50 至 500mg、约 50 至 200mg、或约 50 至 100mg 的抗 IL 至 6 抗体。在一实施例中，多于一次剂量的每次剂量包括相同量的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，在初始负荷剂量之后施用维持剂量。初始负荷剂量可以包括多于维持剂量的抗 IL-6 抗体 2 倍、3 倍、4 倍、5 倍或 10 倍。在一实施例中，负荷剂量可以包括 1mg、5mg、10mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、400mg 或 500mg 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，负荷剂量可以包括约 0.1 至 5mg/kg、约 0.1 至 2mg/kg、约 0.1 至 1mg/kg、约 0.3 至 2mg/kg、约 0.3 至 1mg/kg、约 0.5 至 2mg/kg、或约 0.5 至 1mg/kg 的抗 IL 至 6 抗体。在另一实施例中，负荷剂量可以包括约 20 至 500mg、约 20 至 200mg、约 20 至 100mg、约 50 至 500mg、约 50 至 200mg、或约 50 至 100mg 抗 IL 至 6 抗体。在一实施例中，分离剂量给药的时间间隔是固定的。抗 IL-6 抗体剂量可以每周一次、每两周一次、每三周一次、每四周一次、每八周一次、每十二周一次、每十六周一次或每六个月一次进行给药。可以使用本领域已知的任何方法施用抗 IL-6 抗体，例如但不局限于，通过皮下注射或静脉注射。

[0202] 在一实施例中，治疗所需病人的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，治疗所需病人的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一实施例

中，治疗所需病人的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，治疗所需病人的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，治疗所需病人的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，治疗所需病人的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。

[0203] 在一实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎、幼年性慢性关节炎、全身性青年关节炎，血清阴性脊柱关节病（包括关节强硬性脊椎柱炎、牛皮癣关节炎和莱特尔氏病）、牛皮癣或 SLE 的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎、幼年性慢性关节炎、全身性青年关节炎、血清阴性脊柱关节病（包括关节强硬性脊椎柱炎、牛皮癣关节炎和莱特尔氏病）、牛皮癣或 SLE 的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎、幼年性慢性关节炎、全身性青年关节炎，血清阴性脊柱关节病（包括关节强硬性脊椎柱炎、牛皮癣关节炎和莱特尔氏病）、牛皮癣或 SLE 的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎、幼年性慢性关节炎、全身性青年关节炎、血清阴性脊柱关节病（包括关节强硬性脊椎柱炎、牛皮癣关节炎和莱特尔氏病）、牛皮癣或 SLE 的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎、幼年性慢性关节炎、全身性青年关节炎、血清阴性脊柱关节病（包括关节强硬性脊椎柱炎、牛皮癣关节炎和莱特尔氏病）、牛皮癣或 SLE 的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎、幼年性慢性关节炎、全身性青年关节炎，血清阴性脊柱关节病（包括关节强硬性脊椎柱炎、牛皮癣关节炎和莱特尔氏病）、牛皮癣或 SLE 的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。

[0204] 在一实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎、炎症性肠道疾病或 SLE 的方法包括每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎、炎症性肠道疾病或 SLE 的方法包括每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎、炎症性肠道疾病或 SLE 的方法包括每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎、炎症性肠道疾病或 SLE 的方法包括 (a) 施用 100mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 4 周施用 50mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎、炎症性肠道疾病或 SLE 的方法包括 (a) 施用 200mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 8 周施用 100mg 剂量的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，治疗人体内类风湿性关节炎、炎症性肠道疾病或 SLE 的方法包括 (a) 施用 400mg 负荷剂量的抗 IL-6 抗体和 (b) 每 12 周施用 200mg 剂量的抗 IL-6 抗体。

[0205] 抗 IL-6 抗体

[0206] 根据本发明的结合元件已经被证明能够高效能的中和 IL-6。中和作用意味着抑制 IL-6 的生物活性。根据本发明的结合元件可以中和一个或多个 IL-6 的活性。抑制的生物活性通常是 IL-6 与一个或多个其结合配体结合。例如，抑制的生物活性可以是 IL-6 与跨膜和 / 或可溶性 IL-6Rα 结合。这可以在以下试验中被证明，此处进行简要介绍，并且下文

将详细介绍：TF-1 试验表明根据本发明的结合元件抑制 IL-6 与膜 IL-6Ra 结合，因为 TF-1 似乎不产生可溶性 IL-6Ra。因此，本发明的结合元件抑制 IL-6 与膜受体结合。在滑膜成纤维细胞实验中，根据本发明的结合元件抑制 IL-6 与可溶性 IL-6Ra 结合，由于 sIL-6Ra 需要被加入到该实验中发挥作用。添加的 IL-1β 导致内源性 IL-6 的产生，此时其被本发明的结合元件抑制阻止 VEGF 的产生。

[0207] 根据本发明，人类或非人类灵长动物（例如猕猴）的 IL-6 与 IL-6Rα 的结合可能被抑制，例如，结合元件可抑制成熟的人 IL-6 与 IL-6Rα 的结合。

[0208] 生物活性的抑制可以是部分地或全部的。与缺乏结合元件的活性相比，结合元件可以至少 100％、或至少 95％、至少 90％、至少 85％、至少 80％、至少 75％、至少 70％、至少 60％或至少 50％的抑制 IL-6 的生物活性。

[0209] 测定结合元件的中和效力。效力通常表达为 IC_{50} 值，除非另有说明，用 nM 表示。在功能分析中，IC_{50} 是生物应答降低为最大值 50％时的结合元件的浓度。在配体结合研究中，IC_{50} 是配体－受体复合物制剂降低到最大特异结合水平的 50％时的浓度。IC_{50} 可以通过绘制最大生物应答的百分比曲线计算，其作为结合元件浓度的 log 函数存在，并使用软件程序，例如 Prism(GraphPad) 或 Origin(Origin Labs) 以适合 S 形函数的数据，从而得出 IC_{50} 值。可以使用一个或多个本领域技术人员已知的和 / 或本发明中描述或提到的试验确定或测定效力。

[0210] 在本发明中描述了在一试验中通过结合元件中和 IL-6 活性，所述试验例如 TF-1 增殖试验或者下文描述的其他基于细胞的试验，试验表明结合元件结合并中和 IL-6。可以使用其他的方法测定结合元件与 IL-6 的结合，包括 ELISA、免疫印迹法、免疫沉淀法、亲和色谱法和生物化学试验。

[0211] 本发明中的结合元件已经被证明能够结合和中和内源性人 IL-6，正如在根据内源性人 IL-6，VEGF 从人类滑膜成纤维细胞中的释放的抑制试验中所示，本发明的实施例 1.7 和 2.7 对此进行了叙述。在该试验中，来自类风湿性关节炎病人的滑膜成纤维细胞随着 IL-1β 和可溶性 IL-6Rα 的刺激产生 IL-6，导致 IL-6 诱导的 VEGF 分泌。因此由人类滑膜成纤维细胞产生的 IL-6 代表了内源性人 IL-6。内源性人 IL-6 是人类医学治疗中的分子靶标，所以内源性人 IL-6 的中和是结合元件治疗潜力的一个重要的指标。由于试验是在来自类风湿性关节炎病人的滑膜成纤维细胞中进行的，结果与结合元件治疗类风湿性关节炎的用途特别相关。在 VEGF 释放试验中测试的优化的抗体分子的中和效力超过已知的抗 IL-6 抗体 CNTO-328 的中和效力。

[0212] 根据本发明的结合元件，在用 0.6pM 人 IL-1β 和 2.4nM 可溶性人 IL-6Rα 刺激后，在从人滑膜成纤维细胞中释放的 VEGF 的抑制试验中，可以具有少于 50nM 的 IC_{50} 值，例如少于 5nM，例如少于 1nM。

[0213] 已知内源性 IL-6 是糖基化形式和未糖基化形式的混合物。在滑膜成纤维细胞中已经证明了本发明结合元件与内源性 IL-6 的结合，由于该试验利用了来自人滑膜成纤维细胞的 IL-6，即内源性 IL-6。

[0214] 本发明的结合元件可以抑制 IL-6 诱导的 TF-1 细胞的增殖。TF-1 是在患有红白血病的患者中建立的 premyeloid 细胞系 (Kitamura 等 1989)。TF-1 细胞系需要存在用于存活和增殖的生长因子。个体生长因子 TF-1 细胞能够对 IL-6、GM-CSF 和抑瘤素 M 进行应答。

在对于应答 20pM 人 IL-1β 的 TF-1 细胞的增殖抑制试验中，本发明的结合元件可以具有少于 100nM 的 IC50 值、例如少于 20nM、10nM 或 1nM，例如少于 100pM、70pM、50pM、40pM、30pM、20pM 或 10pM。正如本文所述（参见实施例 1.5），亲本 IgG″ CAN022D10″显示出在 TF-1 增殖试验中具有约 93nM 的 IC50 值，随后我们生产了 CAN022D10 的优化的变体，其具有增加的效力（IC_{50} 值通常小于 100pM），如实施例 2.2、2.5 和 2.6 所示（分别为表 3,4 和 5）。特别地，测定的优化的克隆中的一些 IC_{50} 值为 5pM 或更低，例如生殖系 IgG 抗体 7、抗体 17 和抗体 18，代表这些抗体具有极高的中和效力。

[0215] 本发明的结合元件可以抑制 IL-6 诱导的 B9 细胞的增殖。B9 细胞是鼠 B 细胞杂交瘤细胞系的亚克隆，B13.29，其基于对 IL-6 的特异性应答。B9 细胞系需要用于存活和增殖的 IL-6 并对非常低浓度的 IL-6 进行应答。因此，在存在 IL-6 抗体时，能够评估这些细胞的增殖并且测定抗体的亲和性。本发明的实施例 2.10 示出了抗体 18 抑制 B9 细胞增殖，以响应 IL-6，且在该试验中显示了高亲和性。

[0216] 类风湿性关节炎中自身抗体的生产大多是 IgM 类。SKW6.4 是纯系的 IgM，其分泌自人类淋巴母细胞 B 细胞系。一旦用 IL-6 刺激，这些细胞分泌 IgM，因此该试验被视为与类风湿性关节炎相关。SKW6.4 细胞可以用于中和 IL-6 的结合元件的效力的测定，其通过测定对于 IL-6 应答，IgM 分泌的抑制而测定。在对于应答 100pM 人 IL-6 的 IgM 分泌的抑制的 SKW6.4 细胞试验中，本发明的结合元件可以具有少于 10pM 的 IC_{50} 值，例如少于 5pM。在该试验中，抗体 18 示出了 IL-6 的中和作用，参见实施例 2.11（表 9）。

[0217] 本发明提供了对于人 IL-6 的高亲和性结合元件。也同样证明了其对于食蟹猴 IL-6 的高亲和性。本发明的结合元件可以与人 IL-6 和 / 或猕猴 IL-6 结合，其分子量大小不超过 1nM，例如不超过 100pM、50pM、30pM 或 10pM。可以通过表面等离子体共振例如 BIAcore ®，测定分子量。在实施例 2.9 中对亲和性的 BIAcore ®测量进行描述。显著地，发现抗体 7 和 18 的亲和性超过使用 BIAcore ®仪器的限制测量范围，表明其 KD 值低于 10pM。

[0218] 正如本文其他地方所述，表面等离子共振涉及在流体相中使分析物流过连接配体的支撑物，并测定分析物与配体的结合。表面等离子共振可以例如这样进行，其中在流体相中，IL-6 流过连接结合元件的支撑物。表面等离子共振数据可以被放入单价分析物数据模型中。亲和常数 Kd 可以用速率常数常数的比值 kd/ka 计算，如使用单价分析物数据模型的表面等离子共振测定。

[0219] 可选择地，对于 IL-6 的结合元件的亲和性可以用 Schild 试验计算，例如基于随着人 IL-6 浓度变化的 TF-1 细胞增殖的抑制试验。本发明的结合元件的亲和性可以少于 10pM，例如少于 1pM，如 Schild 试验所计算。如本发明的实施例 2.10 所叙述，使用 Schild 分析计算抗体 18 对于人 IL-6 的亲和性为 0.4pM。

[0220] 本发明的结合元件可以非必须地不与一个或多个或全部下列物质发生交叉反应：白血病抑制因子（LIF）、睫状神经营养因子（CNTF）、IL-11 或抑瘤素 M。

[0221] 本发明的结合元件可以非必要地不与大鼠 IL-6、小鼠 IL-6 和 / 或狗 IL-6 发生交叉反应。

[0222] 用于结合其他蛋白质或非人 IL-6 的结合元件的交叉反应性可以被测定，例如在时间分辨荧光分析中，所述分析用于抑制人 IL-6 与固定在支撑物上的结合元件结合，例如，如实施例 1.6 中所描述的 DELFIA®表位竞争试验。例如，任何或所有的 LIF，CNTF、IL-11、

抑瘤素 M、大鼠 IL-6 和小鼠 IL-6 可以显示出不抑制、少于 50％抑制或在时间分辨荧光分析中，其可能具有大于 0.5mM 或大于 1mM 的 IC_{50} 值，所述分析用于抑制人 IL-6 与固定在支撑物上的结合元件结合。例如，任何或所有的 LIF，CNTF、IL-11、抑瘤素 M、大鼠 IL-6 和小鼠 IL-6 可以显示出不抑制，或在用于测试交叉反应性的时间分辨荧光分析中，可具有至少 10 或 100 倍大于未标记的人 IL-6 的 IC_{50} 值。在该分析中，在其与结合元件反应的 Kd 的终浓度处使用标记的野生型成人 IL-6。

[0223] 本发明的结合元件可以与猕猴 IL-6 发生交叉反应。在上述的时间分辨荧光分析中，交叉反应性可以确定为标记的人 IL-6 与固定在支撑物上的结合元件结合的抑制作用。例如，在时间分辨荧光分析中，猕猴 IL-6 可以具有少于 5nM 的 IC_{50} 值，例如少于 2.5nM、例如少于约 1nM。在该分析中，与未标记的人 IL-6 相比，猕猴 IL-6 可以具有少于 10 倍的 IC_{50} 值，例如少于 5 倍。

[0224] 在一实施例中，抗 IL-6 抗体与 IL-6 的表位结合，所述表位在人与猕猴的 IL-6 序列中是保守的，相比于人的序列，在小鼠、大鼠和狗 IL-6 的序列中是不同的。

[0225] 在一实施例中，结合元件结合 IL-6 的“位点 1”区域，该区域与 IL-6Rα 相互作用。因此，本发明的结合元件可以竞争性地抑制 IL-6 与 IL-6Rα 结合，从而中和通过 IL-6Rα 介导的 IL-6 的生物学效应。

[0226] 本发明的结合元件可以在 Phe102 和 / 或 Ser204 与人 IL-6 结合。本发明的结合元件可以在 Arg207 与人 IL-6 结合。非必要地，除了结合 Phe102 和 / 或 Ser 204，结合元件可以结合 IL-6 分子中的侧翼残基或结构性的相邻残基。按照惯例，对应于全长人 IL-6(SEQ ID NO :15) 给残基编号。然而，可以使用成人 IL-6 测定结合。用位点直接突变测定 IL-6 残基的结合，如下所述。

[0227] 蛋白质的单独的氨基酸和区域的突变是为了与具有活性的结构相关联，这对于本领域技术人员是已知的，其被用于定义与抗体结合的蛋白质区域 (Lu 等，(2005) Biochemistry 44 :11106-14)。突变的人 IL-6 的结合和 / 或中和可以用于评估结合元件是否结合 Phe102、Ser204 和 / 或 Arg207。当突变型 IL-6 与野生型相比没有结合或中和，或者显著降低的结合或中和，则表明结合元件结合突变的残基。

[0228] 可以使用在选择的残基上突变的 IL-6 测定在 IL-6 中的残基的结合，所述选择的残基上突变在时间分辨荧光分析中抑制标记的野生型人 IL-6 与固定在支撑物上的结合元件结合，其中标记的野生型成人 IL-6 处于终浓度，相当于其与结合元件相互作用的 Kd。其中，突变体 IL-6 并不抑制标记的野生型 IL-6 与结合元件结合，或者其中突变体 IL-6 具有大于未标记的野生型 IL-6 的 IC_{50} 值（例如，大于 10 倍或者 100 倍），这表明突变的残基被结合元件结合。

[0229] 本发明的结合元件可以非必要地不结合和 / 或中和突变的人 IL-6，其在残基 Phe102，Ser204 和 / 或 Arg207 上具有突变，例如突变 Phe102Glu，Ser204Glu，Ser204Tyr 和 / 或 Arg207Glu。

[0230] 本发明的结合元件可以包括抗体分子，例如人抗体分子。结合元件通常包括抗体 VH 和 / 或 VL 结构域。结合元件的 VH 和 / 或 VL 结构域作为本发明的部分提供。互补决定区（“CDR”）和构架区（“FRs”）存在于每个 VH 和 VL 结构域中。VH 结构域包括一组 HCDR，且 VL 结构域包括一组 LCDR。抗体分子可以包括抗体 VH 结构域，其包括 VH CDR1、CDR2 和

CDR3 及构架。可选择地或同样地包括抗体 VL 结构域，其包括 VLCDR1、CDR2 和 CDR3 及构架。VH 或 VL 结构域构架包括 4 个构架区，FR1、FR2、FR3 和 FR4，与 CDR 穿插在以下结构中：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

[0231] 根据本发明的抗体 VH 和 VL 结构域以及 CDR 在序列表中列出，其形成了本发明的组成部分。其他的 CDR 在 PCT 公开号为 WO 2008/065378 的申请中公开。所有的 VH 和 VL 序列、CDR 序列、CDR 组和 HCDR 组以及 LCDR 组在 PCT 公开号为 WO 2008/065378 的申请中公开，其代表了本发明的其他方面和具体实施例。如本文所述，“CDR 组”包括 CDR1、CDR2 和 CDR3。因此 HCDR 组指的是 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，LCDR 组指的是 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。除非另有说明，“CDR 组”包括 HCDR 和 LCDR。本发明典型的结合元件是单克隆抗体。

[0232] 本发明的结合元件可以包括位于非抗体分子内的抗原结合位点，其通常由在非抗体蛋白质骨架内的一个或多个 CDR 提供，例如 CDR 组，下文将进一步讨论。

[0233] 如上所述，根据本发明的结合元件调节并可以中和 IL-6 的生物活性。正如本文所述，本发明的 IL-6- 结合元件可以对中和效力进行优化。通常地，效力优化涉及使选择的结合元件的序列（通常是抗体的可变区序列）突变以产生结合元件文库，然后其用于效力测定并选出更有效的结合元件。因此，相对于从文库中产生的结合元件，选择的“效力优化的”结合元件倾向于具有高效能。然而，高效能结合元件还可以不通过优化获得，例如，高效能结合元件可以直接从最初的筛选获得，例如生物化学中和试验。“效力优化的”结合元件指的是具有优化的 IL-6 特殊活性或下游功能的中和效力。本发明的其他地方将对试验和效力进行更详细的描述。本发明同时提供了效力优化的和非优化的结合元件，以及用于选择的结合元件效力优化的方法。因此本发明使本领域技术人员能够生产具有高效能的结合元件。

[0234] 在另一方面，本发明提供了获得一种或几种能够结合抗原的结合元件的方法，所述方法包括使根据本发明的结合元件库与所述抗原接触，并选择一种或几种能与所述抗原结合的文库中结合元件。

[0235] 文库可以在颗粒复合物或分子复合物中显示，例如可复制的遗传组合件，例如酵母、细菌或者噬菌体（例如 T7）颗粒、病毒、细胞或共价体、核糖体或其他体外显示系统，含有编码抗体 VH 可变区的核酸的颗粒复合物或分子复合物，所述 VH 可变区在其上显示，及非必要地，如果存在也可以显示 VL 结构域。在 WO92/01047 中和例如美国专利 US5969108、US5565332、US5733743、US5858657、US5871907、US5872215、US5885793、US5962255、US6140471、US6172197、US6225447、US6291650、US6492160 和 US6521404 描述了噬菌体显示，它们的全部内容通过引用并入本文。

[0236] 下述的能够结合抗原的结合元件的选择，并能显示在噬菌体或其他文库颗粒复合物或分子复合物中，核酸可取自噬菌体或其他显示所述选择的结合元件的颗粒复合物或分子复合物。这样的核酸可以用于通过核酸表达产生的结合元件或抗体 VH 或 VL 可变区的随后的生产中，所述核酸选自噬菌体或其他显示所述选择的结合元件的颗粒复合物或分子复合物。

[0237] 本发明的 VH 和 VL 结构域及 CDR 的变体，包括本文中所陈列的氨基酸，其可用于本发明的结合元件，能够通过序列改变或突变的方法获得，并筛选具有所需特征的抗原结合元件。所需特征的例子包括但不局限于：

[0238] ●相对于已知的特异于抗原的抗体，具有增加的抗原亲和力

[0239] ●相对于已知的特异于抗原的抗体（如果活性是已知的），具有增加的抗原活性中和能力

[0240] ●与已知抗体或配体与抗原结合的特定摩尔比，具有特异性的竞争能力

[0241] ●免疫沉淀复合物的能力

[0242] ●结合特异的表位的能力

[0243] ○线性表位，例如使用如本文所述的肽结合扫描鉴定的肽序列，例如使用线性和/或限制构象筛选的肽。

[0244] ○构象表位，由非连续的残基构成

[0245] ●调节 IL-6 或下游分子新的生物活性的能力

[0246] 在本发明中同样提供了这样的方法。

[0247] 本文中公开的抗体分子的变体可以被生产并用于本发明。计算化学在多元数据分析技术的应用建立了结构/性质-活性的关系 (Wold,等,Multivariate data analysis in chemistry.Chemometrics-Mathematics and Statistics in Chemistry(Ed.：B.Kowalski)，D.Reidel Publishing Company，Dordrecht，Holland,1984(ISBN 90-277-1846-6))。可以使用已知的数学技术获得抗体的定量的活性-性质关系，例如统计回归和统计分类 (Norman 等，Applied Regression Analysis.Wiley-Interscience；3rd edition(April 1998)ISBN：0471170828；Kandel，Abraham & Backer，Eric. Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis.Prentice Hall PTR，(May 11，1995)，ISBN：0133418847；Krzanowski，Wojtek.Principles of Multivariate Analysis：A User's Perspective(Oxford Statistical Science Series，No 22(Paper))。牛津大学出版；(December 2000)，ISBN：0198507089；Witten，Ian H.& Frank，Eibe. Data Mining：Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations.Morgan Kaufmann；(October 11,1999)，ISBN：1558605525；Denison David G.T.(Editor)，Christopher C.Holmes，Bani K.Mallick，Adrian F.M.Smith. Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression(Wiley Series in Probability and Statistics).John Wiley & Sons；(July 2002)，ISBN：0471490369；Ghose，Arup K.& Viswanadhan，Vellarkad N..Combinatorial Library Design and Evaluation Principles，Software，Tools，and Applications in Drug Discovery.ISBN：0-8247-0487-8)。抗体的性质可以从抗体序列的经验模型或者理论模型中获得（例如可能接触残基的分析或计算出的理化性质），功能和三维结构以及这些性质可以单独考虑也可以组合考虑。

[0248] 由 VH 结构域和 VL 结构域组成的抗体抗原结合位点通常由六个肽环形成：三个来自轻链可变区 (VL) 及三个来自重链可变区 (VH)。已知原子结构的抗体的分析已经阐明了抗体结合位点的序列和三维结构之间的关系(Chothia C. 等，(1992)J.Molecular Biology 227,799-817；Al-Lazikani，等，(1997)J.Molecular Biology 273(4)，927-948)。这些关系暗示，除了 VH 结构域里的第三个区域（环）之外，结合位点环具有少数量的主链构象（正则结构）之一。已经示出了在特殊环中的正则结构由其大小和在两个环以及框架区域内在关键位点特定残基的存在决定 (Chothia C. 等，(1992)J.Molecular Biology 227,799-817；

Al-Lazikani,等,(1997)J.Molecular Biology 273(4),927-948)。

[0249] 该序列-结构关系的研究可以用于预测那些已知序列抗体内的残基,但不能预测未知的三维结构,其对于维持CDR环的三维结构是必须的,从而维持结合特异性。该预测和前面优化试验的结果比对可支持该预测。在结构学中,可以使用任何免费提供或商业包装,例如WAM(Whitelegg,N.R.u.& Rees,A.R(2000).Prot.Eng.,12,815-824)来创建抗体分子的模型(Chothia,等,(1986)Science,223,755-758)。然后可以使用蛋白质可视化和分析软件包,例如Insight II(Accelrys,Inc.)或Deep View(Guex,N.and Peitsch,M.C.(1997)Electrophoresis 18,2714-2723)评估在CDR每个位置中可能的取代。然后这个信息可以用于取代同样具有最小的或有益的活性影响。

[0250] 该技术要求在CDR的氨基酸序列内进行取代,抗体VH或VL结构域以及结合元件是本领域常见的。变体序列可以用能够预测或不能预测的具有最小的或有益的活性影响进行取代,并测试其结合和/或中和IL-6和/或其他所需性质。

[0251] 任何VH和VL结构域的可变区氨基酸序列变体可以根据本发明使用,其序列在本文中特定公开,正如所讨论的一样。

[0252] 本发明的VL结构域变体和结合元件或包括它们的抗体分子,包括VL结构域,其中在Kabat残基108不存在精氨酸,其中Kabat残基108是不同的残基或者被删除。例如,抗体分子,如缺乏恒定区的抗体分子,例如scFv,可以包括具有VL结构域序列或其如本文所述的其变体的VL结构域,其中在Kabat残基108不是精氨酸或者被删除。

[0253] 本发明的另一方面的包括VH结构域的抗体分子,所述VH结构域与在附加的序列表中示出的抗体18的VH结构域具有至少60、70、80、85、90、95、98或99%氨基酸序列一致性,和/或包括VL结构域,其与在附加的序列表中示出的抗体18的VL结构域具有60、70、80、85、90、95、98或99%氨基酸序列一致性。比对可以用于计算两个氨基酸序列一致性的百分比,包括例如BLAST(Altschul等,(1990)J.Mol.Biol.215:405-410),FASTA(Pearson and Lipman(1988)PNAS USA 85:2444-2448),或Smith-Waterman比对(Smith and Waterman(1981)J.Mol Biol.147:195-197),例如采用默认参数。

[0254] 特殊的变体可以包括一个或多个氨基酸序列改变(氨基酸残基的增加、缺失、取代和/或插入)。

[0255] 可以在一个或多个框架区域和/或一个或多个CDR中进行改变。正常的改变不会导致功能丧失,所以包括这样改变的氨基酸序列的结合元件保留了结合和/或中和IL-6的能力。与没有改变的结合元件相比,它保留了相同量的结合和/或中和IL-6的能力,例如,如在本文所述的试验中测定的结果。包括这样改变的氨基酸序列的结合元件具有改进的结合和/或中和IL-6的能力。

[0256] 改变可以包括用非自然产生的或非标准的氨基酸取代一个或多个氨基酸残基,将一个或多个氨基酸残基修饰成非自然产生的或非标准的形式、或在序列中插入一个或多个氨基酸残基修饰成非自然产生的或非标准的氨基酸。本发明的序列中的改变的编号和位置的例子在本文其他地方进行描述。自然产生的氨基酸包括20个标准的L氨基酸,其标准的单字母代码为G、A、V、L、I、M、P、F、W、S、T、N、Q、Y、C、K、R、H、D、E。非标准氨基酸包括任何可以被并入到多肽骨架的残基或现有氨基酸修饰的结果。非标准氨基酸可以自然产生或非自然产生。几种自然产生的非标准氨基酸在本领域众所周知,例如4-羟脯氨酸、

5- 羟赖氨酸、3- 甲基组氨酸、N- 乙酰丝氨酸等 (Voet & Voet,Biochemistry,2nd Edition,(Wiley)1995)。这些氨基酸残基在其 N-α 位衍生,将仅位于氨基酸序列的 N 端。通常地,本发明的氨基酸是 L 氨基酸,但其可以是 D- 氨基酸。因此改变可以包括 L- 氨基酸的修饰,或用 D- 氨基酸取代。氨基酸的甲基化,乙酰化和 / 或磷酸化形式也是已知的,本发明的氨基酸可以经过这些修饰。

[0257] 本发明的抗体域和结合元件的氨基酸序列可以包括上述非自然的或非标准氨基酸。在氨基酸序列合成期间,非标准氨基酸 (例如 D- 氨基酸) 可以通过氨基酸序列合成后“原始”标准氨基酸的修饰或取代并入氨基酸序列中。

[0258] 非标准和 / 或非自然产生的氨基酸的使用增加了结构和功能多样性,从而增加本发明结合元件与所需 IL-6 结合的效力及中和特性。另外,与标准氨基酸相比,D- 氨基酸及其类似物已经显示出具有不同的药代动力学特征,由于具有 L- 氨基酸的多肽施用于动物 (例如人) 后体内降解,意味着 D- 氨基酸在体内应用中具有优势。

[0259] 携带有本发明 CDR 源序列的新型 VH 或 VL 结构域可以通过随机诱变产生,所述诱变为一个或多个选择的 VH 和 / 或 VL 基因诱变以在整个可变区内产生突变。这种技术已被 Gram 等人描述 (Gram 等,(1992)PNASUSA,89 :3576-3580),他使用了易错 PCR。在这些实施例中,在整个可变区或 CDR 组中有一个或两个氨基酸取代。

[0260] 另一个可使用的方法直接使 VH 和 / 或 VL 基因的 CDR 区诱变。这些技术被 Barbas 等人 (Barbas 等,(1994)PNAS USA,91 :3809-3813) 和 Schier 等人 (Schier 等,(1996)J.Mol.Biol.263 :551-567) 公开。

[0261] 上述所有技术都是本领域已知的并且本领域技术人员能够使用这些技术,使用本领域的常规方法提供本发明的结合元件。

[0262] 本发明的另一方面提供一种获得 IL-6 的抗体抗原结合位点的方法,该方法包括通过在本文中列出的 VH 结构域的氨基酸序列中增加、删除、取代或插入一个或多个氨基酸从而提供 VH 结构域,其是 VH 结构域的氨基酸序列变体,非必要地与 VH 结构域组合,从而提供一个或多个 VL 结构域,并检测 VH 结构域或 VH/VL 组合或鉴定用于 IL-6 的结合元件或抗体抗原结合位点的组合物,非必要地,其具有一个或多个所需性质,例如中和 IL-6 活性的能力。上述 VL 结构域可以具有基本上在本文中列出的氨基酸序列。类似的方法可以采用,其中本发明公开的一个或多个 VL 结构域变体与一个或多个 VH 结构域变体结合。

[0263] 如上所述,本文所列出的 CDR 氨基酸序列基本上可以作为人体抗体可变区的 CDR 或其部分。本文所列出的 HCDR3 序列基本上代表本发明的具体实施例,其中每一个可以作为人重链可变区的 HCDR3 或其部分。

[0264] 应用于本发明的可变区可以从任何种系或重新排序的人类可变区中获得或派生,或者可以是基于已知的人类可变区的共有序列或实际序列的合成可变区。可变区可以从非人类抗体中派生。可以使用重组 DNA 技术将本发明的一个 CDR 序列 (比如 CDR3) 引入缺乏 CDR(比如 CDR3) 的可变区的指令表中。例如,Marks 等,(Marks 等 (1992)Bio/Technology 10 :779-783) 描述了制造抗体可变区的指令表的方法,其中将指向或毗邻可变区的 5′ 端的共有序列引物与人类 VH 基因的第三个构架区的共有序列引物结合,以提供缺乏 CDR3 的 VH 可变区的指令表。Marks 等进一步描述了怎样可以将该指令表与一个特殊抗体的 CDR3 结合。使用类似的技术,可以将本发明的 CDR3 派生的序列与缺乏 CDR3 的 VH 或 VL 结构域的指

令表混合，而且该混合的完整的 VH 或 VL 结构域与同源 VL 或 VH 结构域结合以提供本发明的结合元件。然后可以将该指令表在合适的宿主系统中展示，比如 WO92/01047 的噬菌体展示系统，其全部内容通过引用并入本文，或任何后续 large body of literature，包括 Kay, Winter & McCafferty(Kay, B. K., Winter, J., and McCafferty, J. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins :A Laboratory Manual, San Diego :Academic Press) 以可以筛选合适的结合元件。指令表可以由来自 104 个体元件以上的任何东西组成，例如至少 105、至少 106、至少 107、至少 108、至少 109 或至少 1010 元件或更多。其他合适的宿主系统包括，但不局限于酵母显示、细菌显示、T7 显示、病毒显示、细胞显示、核糖体显示及其共价显示。

[0265] 本发明提供了制备用于 IL-6 抗原的结合元件的方法，该方法包括 ：

[0266] (a) 提供一个编码 VH 结构域的核酸的起始指令表，其包括将被取代的 CDR3 或缺乏编码区域的 CDR3 ；

[0267] (b) 将所述指令表与编码氨基酸序列的供体核酸基本上结合，如本文所述用于 VH CDR3，以将所述核酸插入指令表内的 CDR3 区域内，从而提供编码 VH 结构域的核酸的产物指令表 ；

[0268] (c) 表达所述产物指令表的核酸 ；

[0269] (d) 筛选 IL-6 的结合元件 ；并且

[0270] (e) 恢复所述结合元件或将其编码的核酸。

[0271] 再一次，可以应用类似的方法，其中将本发明的 VL CDR3 与编码 VL 结构域的核酸的指令表结合，该指令表包括将被取代的 CDR3 或缺乏编码区域的 CDR3。

[0272] 同样地，可以将一个或多个，或所有三个 CDR 移植入 VH 或 VL 结构域的指令表中，然后筛选结合元件或 IL-6 的结合元件。

[0273] 同样地，可以应用本文中公开的其他 VH 和 VL 结构域，CDR 组和 HCDR 组和 / 或 LCDR 组。

[0274] 免疫球蛋白可变区的实质部分可以包括至少三个 CDR 区域，以及它们的干扰构架区。该部分还可以包括至少约 50％的第一和第四构架区的一个或两个，该 50％是第一构架区的 50％ C 端和第四构架区的 50％ N 端。在该可变区实质部分的 N 端或 C 端的额外残基可能是那些未与自然产生的可变区正常结合的部分。例如，通过重组 DNA 技术形成的本发明的结合元件的构建可能导致引入由接头编码的 N 端或 C 端残基，引入该接头以方便进行克隆或其他操作步骤。其他操作步骤包括引入接头，以使本发明的可变区加入另外的蛋白质序列中，其包括抗体恒定区、其他可变区（例如在双抗体的制造中）或可检测 / 功能性标签，其更详细内容将在本文他处讨论。

[0275] 尽管在本文的一些方面，结合元件包括一对 VH 和 VL 结构域，基于 VH 或 VL 结构域序列的单个结合域形成了本发明的其他方面。已知，单个免疫球蛋白结构域，特别是 VH 结构域，能够以特殊的方式结合靶抗原。例如，参见上述 dAb 的讨论。

[0276] 在单个结合域之一的事例中，可以将这些结构域用于筛选能够形成能够与 IL-6 结合的双结构域结合元件的互补域。可以使用 WO92/01047（其全部内容通过引用并入本文）中公开的所谓的双层组合方式，通过噬菌体展示筛选的方法实现，其中将包含 H 或 L 链克隆的个体菌落用于感染编码其他链 (L 或 H) 的完整的克隆基因库，并根据噬菌体展示技术筛选得到的双链结合元件，比如在该文献中描述的那些元件。该技术也在 Marks 等，

ibid.(Marks 等 (1992)Bio/Technology 10 :779-783) 中公开。

[0277] 本发明的结合元件还包括抗体恒定区或部分恒定区，例如人抗体恒定区或部分恒定区。例如，VH 结构域可以在其 C 端与包括人 Cκ 或 Cλ 链的抗体轻链恒定区连接。同样地，基于 VH 结构域的结合元件可以在其 C 端与分离自任何抗体同型的免疫球蛋白重链的全部或部分（例如 CH1 域）连接，所述同型例如 IgG、IgA、IgE 和 IgM，以及任一同型亚类中的，特别是 IgG1 和 IgG4。IgG1 是优选的，鉴于其效应物功能及易于制造。任何合成或其他包括这些性质的恒定区变体以及稳定的可变区可同样用于本发明。

[0278] 本发明的结合元件可以用可检测的或功能性标签进行标记。因此，结合元件或抗体分子可以免疫交联物的形式存在，以获得可检测的和 / 或可量化的信号。免疫交联物可以包括本发明的抗体分子，其与可检测的或功能性标签偶联。标签可以是任何产生或能够被诱导产生信号的分子，包括但不局限于荧光增白剂、放射性同位素标记、酶、化学荧光剂或光敏剂。因此，通过检测荧光、发光、放射性、酶活性或光吸收来检测和 / 或测定结合。

[0279] 合适的标签包括，例如，但不局限于，

[0280] - 酶类，例如碱性磷酸酶、葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶（“G6PDH”）、α -D- 半乳糖苷酶、葡萄糖氧化酶、葡萄糖淀粉酶、碳酸酐酶、乙酰胆碱酯酶、溶菌酶、苹果酸脱氢酶和过氧化物如辣根过氧化物酶；

[0281] - 染料；

[0282] - 荧光标记或荧光剂、例如荧光素及其衍生物、荧光染料、罗丹明化合物及其衍生物、GFP(GFP 指的是“绿色荧光蛋白”)、丹磺酰、伞形酮、藻红蛋白、藻蓝蛋白、变藻蓝蛋白、邻苯二醛和荧光胺；荧光团例如稀土穴合物和螯合物，例如铕等 (Perkin Elmer and Cis Biointernational)；

[0283] - 化学发光标记或化学冷光物，例如异氨基苯二酰肼、氨基苯二酰一肼和二恶丁环；

[0284] - 生物荧光标记，例如萤光素酶和荧光素；

[0285] - 敏化剂；

[0286] - 辅酶；

[0287] - 酶底物；

[0288] - 放射性同位素标记包括但不局限于溴 77、碳 14、钴 57、氟 8、镓 67、镓 68、氢 3（氚）、铟 111、铟 113M、碘 123M、碘 125、碘 126、碘 131、碘 133、汞 107、汞 203、磷 32、铼 99M、铼 101、铼 105、钌 95、钌 97、钌 103、钌 105、钪 47、硒 75、硫 35、锝 99、锝 99M、碲 121M、碲 122M、碲 125M、铥 165、铥 167、铥 168、钇 199 和其他本发明中提到的放射性同位素标记；

[0289] - 颗粒，例如乳胶颗粒或碳颗粒；金溶胶；微晶；脂质体；细胞等，其可进一步被染料。催化剂或其他可检测的基团标记；

[0290] - 分子例如生物素，地高辛或 5 溴脱氧尿苷；

[0291] - 毒素基团，例如，选自以下基团的毒素基团：假单胞菌外毒素 (PE 或其细胞毒素片段或其突变体）、白喉毒素或其细胞毒素片段或其突变体、肉毒杆菌毒素 A、B、C、D、E 或 F、篦麻毒素或素或其细胞毒素片段、例如篦麻毒素 A、相思豆毒素其细胞毒素片段、皂草素或其细胞毒素片段、商陆抗病毒毒素或其细胞毒素片段和异株腹泻毒蛋白 1 或其细胞毒素片段。

[0292] 适合的酶和辅酶由 Litman 等，US4275149 和 Boguslaski 等，US4318980 公开，其通过引用完全并入本文。Litman 等，US4275149 还公开了合适的荧光剂和化学发光剂，其通过引用完全并入本文。标签还包括诸如生物素的化学基团，其可通过结合到一个特定同源的可检测基团上而被检测，例如标记的亲和素或抗生蛋白链菌素。可检测的标签可以通过传统的化学方法结合在抗体上。

[0293] 可以通过已知的方法制备免疫交联物或其功能片段。他们可以被直接偶联到酶或者荧光标签上或者通过某些连接基团作为介质间接偶联，如聚醛，戊二醛，乙二胺四乙酸 (EDTA)，二乙烯三胺五乙酸 (DPTA)，或存在偶联剂时，如上面所述的治疗共轭。含有荧光类型标签的共轭可以由异硫氰酸酯反应来制备。

[0294] 众所周知，现有的技术方法可以直接使治疗性的放射性同位素与抗体耦合，或通过螯合剂如 EDTA，上述的 DTPA 可用于诊断的放射性元素。它同样可以执行的氯胺 T 法 (Hunter W.M.and Greenwood F.C.(1962)Nature 194 :495) 或其他由 Crockford 等技术 (US4424200，纳入本 technetium99m 标签在其职权与 sodium125 整体）或通过 DTPA 的附加 Hnatowich 描述 (US4479930，这些在其申请资料中均有所体现）。

[0295] 许多方法可以对标签进行信号检测，例如，通过目视检查、电磁辐射、热、化学试剂。标签也可以结合到另一个结合元件上，该元件可以结合本发明的抗体。

[0296] 标签可以直接产生信号，因此，并不需要额外的组件产生信号。许多有机分子，例如荧光剂，能够吸收紫外线和可见光，光吸收的能量转移到这些分子并提升其所激发的能级。这种吸收的能量以二次波的形式发射出去。该第二次波的发射，也可将能量转移到一个被标记的分子上，然后受体分子将光散射出去。例如荧光共振能量转移 (FRET)。其他标签，直接产生包括放射性同位素和染料在内的信号。

[0297] 另外，标签可能需要其他组分产生信号，并且这种信号产生系统可能包括需要产生可测量信号的所有组分，其中可能包括基质、辅酶、增强剂、额外的酶、与酶产物相互作用的物质、催化剂、活化剂、辅助因子、酶抑制剂、清除剂、金属离子和与信号产生的物质结合的所需的特异性结合物质。Ullman 等 US5185243，可以找到一个合适的信号产生系统，并进行了详细论述，其通过引用完全并入本文中。

[0298] 本发明提供了包括本文所提供的结合元件与 IL-6 结合的方法。如上所述，这种结合可在体内发生，例如，接下来施用结合元件、或编码结合元件的核酸，或其也可在体外发生，例如 ELISA 法，免疫印迹，免疫细胞化学、免疫沉淀、亲和层、基于生化或细胞的分析，如检测 TF-1 细胞增殖检测试验。

[0299] 本发明还提供了直接测量抗原水平的检测方法，通过采用根据本发明的结合元件，例如在生物传感器系统中。例如，本发明包括检测和 / 或测量与 IL-6 结合，包括 (i) 将所述结合元件暴露于 IL-6(ii) 检测所述的结合元件与 IL-6 的结合，其中可以用任何方法或本文中描述的可检测的标签进行检测。因此，本文中描述的任何其他结合检测的方法都由执行该方法的人直接解释，例如，通过肉眼观察可检测的标签。另外，文中所述的这种方法，或任何其他的检测方法，可能产生的放射自显影形式的报告、照片、电脑打印输出，流式细胞仪检测报告、图形、图表、包含的结果试管或容器或孔的报告，或任何其他视觉或物理方法的结果表示。

[0300] 可测定结合元件与 IL-6 的结合量。定量分析可与检测样品中抗原的量相关，其可

能是目的诊断。筛选对 IL-6 结合和 / 或其定量是有用的，位点的寻找或者定量是。例如，筛选疾病或病症的患者是指涉及 IL-6 异常表达和 / 或活性的本文中和 / 或任何其他疾病或病症。

[0301] 本发明的一个诊断方法可包括 :(i) 从动物体内获取一个组织或液体样品，(ii) 将所述组织或液体样品暴露于一个或多个本发明的结合元件 ;及 (iii) 与对照组相比，检测与 IL-6 的结合，对 IL-6 结合力的增加可以指示出 IL-6 表达或者活性的异常。所检测的组织或液体样品包括血液、血清、尿液、活检材料、肿瘤或怀疑含有异常的 IL-6 水平的任何组织。受体异常 IL-6 水平或活动检测呈阳性，可能也有利于从披露后此处的治疗方法。

[0302] 根据本发明公开的方法，本领域技术人员根据其优选和常识，能够选择合适的模式测定结合元件与抗原结合。

[0303] 任何适当的方法都可以确定样品中的结合元件的反应性。放射免疫法 (RIA) 提供了这样一种可能性。放射性标记的抗原与未标记的抗原 (测试样品) 混合，并允许与结合元件相结合。结合抗原实际上从未结合抗原分离，并测定与结合元件结合的放射性抗原量。测试样品中的抗原越多，与结合元件相结合的放射性抗原就越少。竞争性结合实验也可能用于非放射性的抗原，使用与报告分子相连的抗原及其类似物。报告分子可以是荧光染料、磷光体或激光染料，其具有独立光谱的吸收或发射特性。合适的荧光染料包括荧光素、罗丹明、藻红蛋白和得克萨斯红、和镧系元素螯合物或穴状化合物。合适的显色染料，包括二氨基联苯胺。

[0304] 其他的报告分子包括大分子胶体颗粒或者颗粒材料，例如彩色、有磁性或者顺磁的乳胶球，和生物或化学活性剂，其可以直接或间接使检测信号被观察到，电子检测或以其他方式记录。这些分子可以是酶，其催化反应，所述反应建立或者改变颜色，或者例如引起电特性的改变。它们可以是分子应激的，以使能态之间的电子传递导致特征光谱吸收或发射。它们可以包括用于于生物传感器连接的化学实体。可以采用生物素 / 亲和素或生物素 / 链霉亲和素和碱性磷酸酶检测系统。

[0305] 由单独的结合元件 - 报告分子偶联物发出的信号可以用于推导与样品结合 (正常的和对照的) 的相关结合元件的定量的绝对值或相对值。

[0306] 作为本发明的一个方面，本发明还提供了一种试剂盒，其包括根据本发明的其他方面或其他具体化实施例的结合元件。在该试剂盒中，结合元件可以被标记以能够检测其在样品中的反应活性 (例如，如下所述)。另外的结合原件可以或可以不附着在一个固体支撑物上。试剂盒的组分通常是无菌的并且密封在小瓶或其他容器中。试剂盒可以用于诊断分析或其他结合元件有用的方法。一个试剂盒可能包含组分在方法中 (例如根据本发明的方法) 的使用说明。协助或能够执行这种方法的辅助材料可以包括在本发明的试剂盒中。辅助材料包括第二个不同的结合元件，其与第一结合元件结合并且偶联可检测的标记 (例如荧光标记、放射性同位素或酶)。基于抗体的试剂盒也可包括用于进行免疫沉淀反应的磁珠。试剂盒的每个组分通常都位于其合适的容器中。因此，这些试剂盒通常包括适用于每个结合元件的不同的容器。此外，试剂盒可以包括用于进行试验和解释于分析通过该试验获得的数据的方法的说明书。

[0307] 本发明同样提供了上述结合元件在竞争试验中用于测量抗原水平的用途，也就是说在竞争试验中，采用本发明提供的结合元件测量样品中的抗原水平。这可以不需要将结

合与为结合的抗原进行物理分离。将报告分子连接到结合元件上，以使在结合上发生物理或光学改变成为可能。报告分子可以直接或间接的产生可检测的信号，其可以是定量的。报告分子的连接可以是直接地或间接地，例如通过肽键或共轭或非共轭。通过肽键的链接可能会作为融合基因编码的抗体和报告分子的重组表达的结果。

[0308] 在不同的方面和不同的实施例中，本发明延伸包括与任何本文限定的结合元件（例如抗体 18，例如以 IgG1 形式存在）竞争结合 IL-6 的结合元件。结合元件间的竞争可以容易地在体外检测，例如给一个结合元件贴上特异性报告分子，其可以在存在其他没有标签的结合元件存在时被检测出来，以能够鉴定出结合相同表位或重叠表位的结合元件。可以使用例如 ELISA 测定竞争，其中 IL-6 被固定在一个平板上，在该板上添加第一具有标签的或标记的结合元件以及一个或多个不具有标签的或未标记的结合元件。通过具有标签的结合元件发出的信号减弱，可以观察到具有标签的结合元件与不具有标签的结合元件竞争。

[0309] 例如，本发明包括一种鉴定 IL-6 结合化合物的方法，其包括 (i) 在一支撑物上固定 IL-6，(ii) 是所述固定的 IL-6 同时或逐步接触至少一个具有标签的活标记的根据本发明的结合元件，以及一个或多个不具有标签或为标记的测试结合化合物，以及 (iii) 通过观察具有标签的结合元件的标签数量的下降来确定新的 IL-6 结合化合物。这种方法可以以使用多孔或多阵列形式的一种高通量的方式进行。这种试验也可在溶液中进行。参见，例如，美国专利U.S.5,814,468，它的全部内容通过引用并入本文。如上所述，结合的检测可以收到执行该方法的人影响，例如，通过目测观察可检测的标记，或者标记量的降低。可选地，本发明的结合方法可以以产生放射自显影形式、照片形式、电脑打印形式、流式细胞仪检测报告形式、图形形式、图表形式、包含结果的试管或容器或孔的形式，或任何其他视觉或实际表示所述方法的结果的形式。

[0310] 竞争分析同样可以用于表位作图。在一个例子中，表位作图可以用于确定被 IL-6 结合元件结合的表位，所述结合元件非必要地可以具有优化的中和和 / 或调节特性。这样的表位可以是线性的或构象的。构象表位可包括至少两个不同的 IL-6 片段，其中，当 IL-6 以三级结构或四级结构折叠形成被 IL-6 的抑制子（例如 IL-6 结合元件）识别构象表位是，所述片段的位置彼此接近。可以使用抗原的肽片段的竞争性实验，尤其是包括或基本上有目的表位组成的肽。肽具有表位序列加上一个或多个位于任何可以使用的端的氨基酸。根据本发明的结合元件其与抗原的结合被具有或包括给定序列的肽抑制。

[0311] 本发明还提供分离的编码本发明结合元件的核酸。核酸可以包括 DNA 和 / 或 RNA，在一实施例中，本发明提供用于编码如本发明上述定义的 CDR 或 CDR 组或 VH 结构域或 VL 结构域或抗体抗原结合位点或抗体分子，例如 scFv 或 IgG1 的核酸分子。

[0312] 本发明还提供质粒、载体、转录框或表达框的构建，其包括至少一种如上所述的多核苷酸。

[0313] 本发明还提供重组的宿主细胞，其包括一个或多个上述构建体。编码任何如本发明上述定义的 CDR 或 CDR 组或 VH 结构域或 VL 结构域或抗体抗原结合位点或抗体分子，例如 scFv 或 IgG1 的核酸分子，其构成了本发明的一方面，如编码产品的生产方法一样，所述方法包括编码核酸的表达。表达通常可以通过在适当的条件下培养含有该核酸重组宿主细胞完成。可以使用任何合适的技术分离和 / 或纯化 VH 或 VL 结构域或结合元件的表达产物，

然后酌情使用。

[0314] 根据本发明的核酸可以包括 DNA 或 RNA，并且可全部或部分合成。提到的如本文所列出的核苷酸序列包括具有特异序列的 DNA 分子，并包括具有特异序列的 RNA 分子，其中，除非上下文另有说明，U 被取代为 T。

[0315] 本发明的还一方面提供了抗体 VH 可变区的生产方法，该方法包括引起编码的核酸表达。这种方法可以包括在生产所述抗体 VH 可变区的条件下，培养宿主细胞。

[0316] 本发明的另一些方面提供了 VL 可变区和包括 VH 和 / 或 VL 结构域的结合元件的类似的生产方法。

[0317] 生产方法可以包括产物分离和 / 或纯化的步骤。生产方法还可以包括将产物配制成组合物，其包括至少一种其他组分，如药学上可接受的赋形剂。

[0318] 在各种不同宿主细胞中多肽的克隆和表达系统是众所周知的。合适的宿主细胞包括细菌、哺乳动物细胞、植物细胞、丝状真菌、酵母、杆状病毒系统、转基因植物和动物。本领域中原核细胞中抗体和抗体片段的表达是明确的。对于综述，参见例如 Plückthun(Plückthun, A.(1991)Bio/Technology 9 :545-551)。常见的细菌宿主是大肠杆菌。

[0319] 本领域技术人员可将培养的真核细胞中的表达作为生产结合元件的一个选择 (Chadd HE 和 Chamow SM(2001)Current Opinion in Biotechnology 12 :188-194 ; Andersen DC 和 Krummen L(2002)Current Opinion in Biotechnology 13 :117 ;Larrick JW 和 Thomas DW(2001)Current Opinion in Biotechnology 12 :411-418)。本领域中可用于异源多肽表达的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞、HeLa 细胞、幼仓鼠肾细胞、NSO 小鼠黑色素瘤细胞、YB2/0 鼠骨髓瘤细胞、人类胚胎肾细胞、人胚胎视网膜细胞和许多其他细胞。

[0320] 可以选择或构建合适的载体，其包含适当的调控序列，所述调控序列包括启动子序列、终止子序列、多聚腺苷酸化序列，增强子序列，标记基因和其他适当的序列。载体可能是质粒，如噬菌粒或病毒粒，如果适当，也可以是噬菌体 (Sambrook 和 Russell, Molecular Cloning :a Laboratory Manual :3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。Ausubel 等 (Ausubel 等, eds., Short Protocols in Molecular Biology :A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 4th edition 1999) 中详细地描述了许多已知的核酸操作技术和规定，例如核酸构建体的制备、诱变、测序、DNA 导入细胞中和基因表达及蛋白质分析。

[0321] 本发明的另一方面提供了含有如本发明所公开的核酸的宿主细胞。所述宿主细胞可以在体外培养。所述宿主细胞可以在体内。体内存在的宿主细胞可能允许作为“胞内抗体”的本发明的结合元件细胞内表达。胞内抗体可用于基因治疗。

[0322] 另一方面提供了包括将本发明的核酸导入宿主细胞的方法。导入可采用任何可用技术。对于真核细胞，合适的技术可能包括磷酸钙转染、二乙氨乙基葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染和使用逆转录酶病毒或其他病毒的转导，如牛痘病毒，对于昆虫细胞，使用杆状病毒。将核酸导入宿主细胞，尤其是真核细胞，可能使用基于病毒或质粒的系统。质粒系统可能被游离地保留或被合并到宿主细胞或人工染色体中。合并可以是随机地或有目的性地在一个或多个基因位点整合一个或多个复制子。对于细菌细胞，合适的技术可能包括使用

噬菌体的氯化钙转化、电穿孔和转染。

[0323] 导入后可引起或允许核酸表达，例如，在基因表达的条件下培养宿主细胞。可通过本领域技术人员已知的方法完成表达产物的纯化。

[0324] 本发明的核酸可被整合到宿主细胞的基因组（如染色体）中。序列内含物可以促进整合，其根据标准技术促进基因组重组。

[0325] 本发明还提供了包括在表达系统中使用上述构建体的方法以表达如上所述的结合元件或多肽。

[0326] 这是本文中其他地方所讨论的各种疾病包含 IL-6 的证据。因此本发明的结合元件可用于与 IL-6 相关的疾病的诊断或治疗的方法。所述疾病可能是炎症性和 / 或自身免疫疾病，例如类风湿性关节炎、骨关节炎、恶病质、慢性阻塞性肺疾病 (COPD)、青少年特发性关节炎、哮喘、系统性红斑狼疮、炎症性肠病、克罗恩氏病或动脉粥样硬化。本发明的结合元件还可能用于治疗肿瘤和 / 或癌症。此外，本发明的结合元件还可能用于治疗和 / 或预防由本文中所列举的疾病和条件引起或相关的疼痛。本发明的结合元件还可能用于诊断或治疗病人、动物、器官、组织或细胞中至少一个 IL-6 相关疾病的方法，包括但不局限于 ：包括慢性阻塞性肺疾病 (COPD) 的呼吸道阻塞性疾病 ；哮喘，如支气管、过敏性、内因性、外因性和尘埃性哮喘，尤其是慢性或顽固性哮喘（如晚期哮喘和呼吸道高反应 ；支气管炎 ；急性、过敏性、萎缩性鼻炎和慢性鼻炎，包括干酪性鼻炎、肥厚性鼻炎、化脓性鼻炎、干燥性鼻炎和药物性鼻炎 ；膜性鼻炎，包括格鲁布性、纤维素性和假膜性鼻炎及淋巴结结核 (scrofoulous) 鼻炎 ；季节性鼻炎，包括神经性鼻炎（枯草热）和血管舒缩性鼻炎、窦炎、特发性肺纤维化 (IPF) ；结节病，霉尘肺及相关疾病、成人呼吸窘迫综合症、过敏性肺炎、纤维性肺和特发性间质性肺炎 ；类风湿性关节炎、幼年型慢性关节炎、全身性发作青少年关节炎、血清阴性脊柱关节病（包括强直性脊柱炎、牛皮癣关节炎和莱特尔氏症）、贝切特氏病、斯耶格伦氏综合症和系统性硬化症、痛风、骨质疏松症和骨关节炎 ；牛皮癣、异位性皮炎、接触性皮炎和其他湿疹皮肤病、过敏性接触性皮炎、脂溢性皮炎、扁平苔癣、硬皮病、天疱疮、大疱性类天疱疮、大疱性表皮松解、荨麻疹，皮肤血管炎、血管炎、红斑、皮肤嗜酸性细胞增多、葡萄膜炎、局限性脱发、过敏性结膜炎春季 (vernalvemal) 结膜炎 ；（胃肠道）胃溃疡、腹腔疾病、直肠炎、嗜酸肠胃炎、肥大细胞增多症、炎症性肠病、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、抗磷脂综合症、与食品有关的过敏，其远离肠道产生影响，例如，偏头痛、鼻炎和湿疹 ；恶病质、多发性硬化、动脉粥样硬化、获得性免疫缺陷综合症 (AIDS)、系膜增生性肾小球肾炎、肾病综合症、肾炎、肾小球肾炎、急性肾功能衰竭、血液透析、尿毒症、局部或盘状红斑狼疮、系统性红斑狼疮、卡斯尔曼氏病、淋巴瘤性甲状腺肿、重症肌无力、I 型糖尿病、B 型胰岛素抗药性糖尿病、镰刀状细胞贫血、虹膜睫状体炎 / 葡萄膜炎 / 视神经炎、肾病综合症、嗜酸性细胞增多筋膜炎、超 IgE 综合症、系统性血管炎 / 眶坏死性肉芽肿病、睾丸炎 / 输精管结扎逆转过程、瘤型麻风病、酒精性肝炎、塞扎里综合症和特发性血小板减少性紫癜 ；术后的粘连、肾病、全身炎症反应综合症、败血症综合症、革兰氏阳性败血症、革兰氏阴性败血症、培养阴性败血症、真菌败血症、中性粒细胞减少发热、急性胰腺炎、尿脓毒症、格雷氏病、雷诺氏病、抗体介导的细胞毒性、III 型过敏反应、POEMS 综合症（多发性神经病、脏器肿大、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病和皮肤改变综合症）、混合结缔组织病、特发性阿狄森氏病、糖尿病、慢性活动性肝炎、原发性肝胆肝硬化、白癜风、心肌梗死后（心切开术）综合症，IV 型过敏反应、

胞内有机体引起的肉芽肿、威尔森氏症，血色素沉着症、α-I-抗胰蛋白酶缺乏、糖尿病视网膜病、淋巴瘤性甲状腺肿、下丘脑-垂体-肾上腺轴评价、甲状腺炎、脑脊髓炎、新生儿慢性肺部疾病、家族噬红细胞淋巴组织细胞增生症、脱发、放射疗法（例如，包括但不限于乏力、贫血、恶病质等）、慢性水杨酸中毒、睡眠窒息症、肥胖症、心力衰竭和脑膜炎球菌血症；急性和慢性病，例如，肾、心脏、肝、肺、胰腺、骨髓、骨骼、小肠、皮肤、软骨和角膜移植；及慢性移植物抗宿主病；白血病、急性淋巴细胞白血病（ALL）、急性白血病、T细胞、B细胞、或FAB ALL、铬粒细胞白血病（CML）、急性髓系白血病（AML）、慢性淋巴细胞白血病（CLL）、毛细胞白血病，骨髓增生异常综合症（MDS）、任何淋巴瘤、霍奇金氏病、非霍奇金氏淋巴瘤、任何恶性淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、卡波西氏肉瘤、肾细胞癌、大肠癌、前列腺癌、胰腺癌、鼻咽癌、恶性组织细胞病、肿瘤伴随综合症/血钙过多恶性肿瘤、实体瘤、腺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、血管瘤、转移性疾病、骨吸收相关癌症、骨痛相关癌症；癌症转移的抑制；癌症恶病质的改善；囊状纤维变性、中风、心、脑、四肢等末梢器官再灌注损伤；烧伤、创伤/出血、电离辐射、慢性皮肤溃疡；生殖器官疾病（如排卵、月经和植入紊乱、早产、子痫前期(pre-eclamp sia)、子宫内膜异位症）；急性或慢性细菌性感染、急性和慢性寄生虫或感染过程，包括细菌、病毒和真菌感染，艾滋病毒感染/艾滋病毒病变，脑膜炎，肝炎（甲、乙或丙或其他病毒性肝炎等），化脓性关节炎，腹膜炎，肺炎，会厌炎，大肠杆菌O157:H7型，溶血性尿毒症综合症/血栓性血小板减少紫癜，疟疾，登革热出血热，利什曼病，麻风病，中毒性休克综合症，链球菌肌炎，气性坏疽，结核分枝杆菌，胞内结核分枝杆菌，卡氏肺囊虫肺炎，盆腔炎，睾丸炎/附睾炎，军团菌，莱姆病，甲型流感，EB病毒，极度相关的血吞噬细胞综合症，病毒性脑炎/无菌性脑膜炎，抑郁症等。因此，本发明提供了治疗IL-6相关疾病的方法，其包括单独地或与本领域已知或本文中描述的其他合适药物以组合治疗方式对需要的病人施用有效量的一种或多种本发明的结合原件。

[0327] 在一实施例中，IL-6相关疾病是抑郁症，本文中也指重度抑郁症。重度抑郁症（又称为且本文中指临床抑郁症、严重抑郁症、单极抑郁症或单极障碍）是一种精神疾病，其特征在于，完全的情绪低落，伴随着在通常的娱乐活动中的自卑并失去兴趣或乐趣。术语“重度抑郁症”由美国精神病学协会选择以在1980年版的精神疾病诊断与统计手册（DSM-III）分类中将这一症候群指定为情绪障碍，且至今广泛应用。泛称抑郁症通常用来表示这种疾病，但因为它还用于其他类型的心里抑郁症，更精确的术语优选为在临床和研究中使用的该疾病。重度抑郁症是一种致残性疾病，其对个人的家庭、工作或学校生活、睡眠和饮食习惯及一般健康状况产生不利影响。

[0328] 抑郁症与包含全身性炎症的疾病高度共存。在许多抑郁症患者中观察到全身炎症反应，其反映在增加的炎症血浆生物标志物。此外，在抑郁症患者的血液和CSF（脑脊液）中检测到活化细胞因子信号转导通路。而且，细胞因子（IFN-a，IL-2）可诱导医学上无精神病史的患者产生重度忧郁症的症状。因此，本发明提供一种治疗抑郁症的方法，其包括单独地或与本领域已知的其他合适药物以组合治疗方式对需要的病人施用有效量的一种或多种本发明的结合原件，其他合适药物如抗抑郁药，如选择性血清素再摄取抑制剂（SSRIs），如舍曲林、依他普仑、氟西汀、帕罗西汀和西酞普兰或本文中描述的。

[0329] 本发明的结合元件还具有止痛特性。因此，结合元件适合用作止痛剂用于治疗和/或预防与本文所列举疾病相关的疼痛及由伤口、医疗过程、手术、外伤、创伤引起的或相关

的慢性和急性疼痛。例如，结合元件可作为用作术后止痛的止痛药使用。结合元件还用于治疗或预防由强直性脊柱炎、炎性腰背痛、神经痛、疼痛神经瘤、纤维肌痛、头痛、胰腺炎、脊髓神经压迫综合症和非恶性骨骼疼痛、炎症骨关节炎疼痛、风湿关节疼痛、癌症疼痛引起的或相关的疼痛，其中头疼如慢性头痛和偏头痛，癌症疼痛如骨癌疼痛。

[0330] 本发明的结合元件还可能用于治疗与几种疾病相关的肺动脉高血压症，例如，但不局限于 COPD、硬皮病、系统性红斑狼疮、POEMs 和特发性肺动脉高血压。据报道，在患有与这些疾病相关的肺动脉高血压症的病人中 IL-6 水平升高 (Savale, L. 等 Respir. Res. (2009)10,6 及其参考文献 ;Steiner, M. K. 等 Circ. Res. (2009)104(2)236-244 及其参考文献)。暴露在缺氧条件下的 IL-6- 缺陷型小鼠与野生型小鼠相比，右心室收缩压减小并且右心室肥大减小 (Savale, L. 等 Respir. Res. (2009)10,6 及其参考文献)。此外，在缺氧条件下，IL-6- 过表达的转基因小鼠与非转基因对照小鼠相比，右心室肥大增强并且右心室收缩压增加 (Steiner, M. K. 等 Circ. Res. (2009)104(2)236-244 及其参考文献)，且体外给药的 IL-6 加剧了暴露在慢性缺氧条件下的小鼠的肺动脉高血压症的发展 (Golembeski, S. M. 等 Chest(2005)128(6Suppl)572S-573S)。

[0331] 此外，已观察到患有稳定的 COPD(慢性阻塞性肺病) 的病人的 IL-6 的炎症因子超过健康对照组 (Yanbaeva, D. G. 等 BMC Med Genet(2009)10,23 ;Savale, L. 等 Am. J. Respir. Crit Care Med. (2009)179(7), 566-571 ;Eickhoff, P. 等 Am. J. Respir. Crit Care Med. (2008)178(12)1211-1218)。在 COPD 患者中增强的 IL-6 水平与肺功能受损有关 (R. E. 等 Chest(2008)133(1)19-25 ;Thorleifesson, S. J. 等 Respir. Med. (2009)103(10)1548-1553)。一些研究也报道过，COPD 恶化时唾液和 / 或血清中 IL-6 与恶化减弱时测量的 IL-6 或稳定 COPD 患者中测量的 IL-6 相比，其水平增加 (Valipour, A. 等 Clinical Science(2008)115(7), 225-232 ;Groenewegen, K. H. 等 Respir. Med. (2007)101(11)2409-2415 ;Perera, W. R. 等 Eur. Respir. J. (2007)29(3), 527-534)。增强的 IL-6 水平与更频繁的恶化有关 (Bhowmik, A. 等 Thorax(2000)55(2)114-120)。具有抗 IL-6 抗体的小鼠或缺乏 IL-6 的小鼠的治疗在某些动物模型中示出了减弱的肺部炎症，例如臭氧诱导的肺部炎症和博莱霉素诱导的肺部炎症及纤维变性 (Saito, F. 等 Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (2008)38(5)566-571 ;Lang, J. E. 等 Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. (2008)294(5)L1013-L1020 ;Johnston, R. A. 等 Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. (2005)288(2)L390-L397)。较高的 IL-6 水平与 COPD 某些并发症相关，例如肺动脉高血压症 (Chaouat, A. 等 Chest(2009)136(3)678-687 ;Eddahibi, S. 等 Proceedings of the American Thoracic Society(2006)3(6), 475-476)。

[0332] 某些其他疾病中含有 IL-6 的证据可被充分理解。本文和 PCT 公开号为 WO 2008/065378 的申请中提出的数据进一步表明，本发明的结合元件可用于治疗这些疾病，包括预防治疗和减少疾病的严重程度。因此，本发明提供了治疗或减少本文中提到的任何疾病的至少一种症状的严重程度的方法，其包括单独地或与本领域已知的或本文中描述的其他合适药物以组合治疗方式对需要的病人施用有效量的一种或多种本发明的结合原件，以减弱任何上述疾病的至少一种症状的严重程度。

[0333] 因此，本发明的结合元件用作治疗包含 IL-6 和 / 或 IL-6Ra 表达和 / 或活性的疾病的治疗药物，尤其是 IL-6 和 / 或 IL-6Ra 的异常表达 / 活性。治疗方法可能包括对有需

要的病人施用有效量的本发明的结合元件，其中 IL-6 和 / 或 IL-6Ra 的异常表达和 / 或活性被减弱。治疗方法可包括 (i) 确定表现出异常的 IL-6:IL-6Ra 水平或活性的病人，例如，使用上述的诊断方法，及 (ii) 对病人施用有效量的本发明的结合元件，其中 IL-6 和 / 或 IL-6Ra 的异常表达和 / 或活性被减弱。根据本发明的有效量是能减少 IL-6 和 / 或 IL-6Ra 的异常表达和 / 或活性的数量，以降低或减轻正在治疗的特定疾病或病症的至少一种症状的严重程度，但不一定治愈该疾病或病症。

[0334] 本发明还提供了反作用于至少一种 IL-6 效应的方法，其包括接触或施用有效量的本发明的一种或多种结合元件以反作用于至少一种 IL-6 效应。可通过本发明的方法反作用于 IL-6 效应，其包括 IL-6 与 gp130 相结合及这种结合引起的下游效应。

[0335] 因此，本发明其他方面提供了治疗方法，该方法包括提供的结合元件的施用、包含这种结合元件的药物组合物的施用以及在制造施用的药剂中这种结合元件的用途，例如在生产药剂或药物组合物的方法中，其包括配制结合元件与药学上可接受的赋形剂。药学上可接受的赋形剂可以是一种化合物或化合物组合物，其能够进入药物组合物且不引起二次反应，而且其允许如促进活性化合物的施用，增加生命周期和 / 或体内疗效，增加溶液中溶解度或改进其保存。这些药学上可接受的载体是已知的，本领域技术人员将用这些载体作为性质函数和选定的活性化合物的给药模式。

[0336] 本发明的结合元件还通常以药物组合物的形式给药，除了结合元件其可能包括至少一种组分。因此，根据本发明的药物组合物及根据本发明使用的药物组合物，除了活性组分，可包括赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员已知的其他材料。这些材料应该是无毒的且不干扰活性组分的疗效。载体或其他材料的确切性质取决于给药途径，其可能是如下讨论的口服、吸入、气管内、局部、内水疱或注射。

[0337] 本发明涉及包括本发明抗体的无菌、稳定的药物制剂。

[0338] 本发明提供稳定本发明抗体的方法。

[0339] 本发明还涉及生产包括本发明抗体的无菌、稳定的制剂的过程。

[0340] 所有本文中描述的“本发明的制剂”、“本发明的液体制剂”、“本发明的高浓度稳定液体制剂”、“本发明的抗体液体制剂”、“本发明的重组液体制剂”或“本发明的抗体制剂”统称为本发明的抗体的制剂。

[0341] 本文中使用的短语“药学上可接受的”指由联邦或州政府管理机构批准或在美国药典、欧洲药典或其他普遍公认的药典中列举，用于动物更特别是用于人类的。

[0342] 在包括本发明抗体（包括抗体及其片段）的液体制剂的上下文中使用的术语“稳定性”和“稳定的”是指制剂中的抗体（包括其抗体片段）在给定的制造、制备、运输和储存条件下对聚合、降解或断裂的抗性。本发明“稳定的”制剂在给定的制造、制备、运输和储存条件下保持生物活性。所述抗体（包括抗体及其片段）的稳定性可通过聚合、降解或断裂的程度估计，通过高效体积排阻色谱 (HPSEC)、反向色谱法、静态光散射 (SLS)、傅里叶变换红外分光镜 (FTIR)、圆二色性 (CD)、尿素伸展技术、体内色氨酸荧光、差示扫描量热法和 / 或 ANS 结合技术测定，与参考制剂相比较。例如，参考制剂可能是冷冻在 -70℃的参考标准样品，其由 pH 为 6.0-6.5 的 10mg/ml 组氨酸抗体（包括抗体及其片段）和随意的一种或几种赋形剂组成，参考制剂通过 HPSEC 有规律地显示单峰（例如，≥ 97％的面积）。包括抗体（包括抗体及其片段）的制剂的总稳定性可通过各种免疫学检测估计，例如，酶联免疫吸附

测定 (ELISA) 和使用分离抗原分子的放射免疫测定法。

[0343] 本文中使用的短语“检测不到的低水平聚合”是指含有不超过约 5%、不超过约 4%、不超过约 3%、不超过约 2%、不超过约 1%及不超过约 0.5%蛋白质重量聚合的样品，可通过高效体积排阻色谱 (HPSEC) 和静态光散射 (SLS) 技术测定。

[0344] 本文中使用的短语“检测不到的低水平断裂”是指含有等于或大于约 80%、约 85%、约 90%、约 95%、约 98%或约 99%总蛋白的样品，例如通过 HPSEC 或反向色谱法测定的单峰，或通过缩减毛细管凝胶电泳 (rCGE) 测定的双峰 (如重链和轻链) (或峰与亚基数相同)，表示非降解抗体或其非降解片段，且不含有其他超过约 5%、超过约 4%、超过约 3%、超过约 2%、超过约 1%或超过约 0.5%总蛋白的单峰。本文中使用的术语“缩减毛细管凝胶电泳”是指在缩减条件下减少抗体中二硫键的毛细管凝胶电泳。

[0345] 本发明涉及稳定、高浓度的本发明抗体的制剂。在一实施例中，本发明的制剂是液体制剂。在另一实施例中，本发明的制剂是冻干制剂 . 在另一实施例中，本发明的制剂是重组液体制剂。

[0346] 在一实施例中，本发明的制剂是稳定的液体制剂。在一实施例中，本发明的液体制剂是水性制剂。在一具体实施例中，本发明的液体制剂是水性制剂，其中水介质是蒸馏水。

[0347] 在一实施例中，本发明的制剂是无菌的。

[0348] 在一实施例中，本发明的制剂是均质的。

[0349] 在一实施例中，本发明的制剂是等渗的。

[0350] 本发明包括稳定的液体制剂，其包括单个的目的抗体 (包括抗体及其片段)，例如，与 IL-6 特异性结合的抗体。本发明还包括稳定的液体制剂，其包括两个或多个的目的抗体 (包括抗体及其片段)，例如，与 IL-6 多肽特异性结合的抗体。

[0351] 在一实施例中，本发明的制剂包括至少约 1mg/ml、至少约 5mg/ml、至少约 10mg/ml、至少约 20mg/ml、至少约 30mg/ml、至少约 40mg/ml、至少约 50mg/ml、至少约 60mg/ml、至少约 70mg/ml、至少约 80mg/ml、至少约 90mg/ml、至少约 100mg/ml、至少约 110m/ml、至少约 120mg/ml、至少约 130mg/ml、至少约 140mg/ml、至少约 150mg/ml、至少约 160mg/ml、至少约 170mg/ml、至少约 180mg/ml、至少约 190mg/ml、至少约 200mg/ml、至少约 250mg/ml、或至少约 300mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括至少约 100mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括至少约 125mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括至少约 130mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括至少约 150mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括至少约 90mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，本发明的制剂包括约 1mg/ml 至约 25mg/ml、约 1mg/ml 至约 200mg/ml、约 25mg/ml 至约 200mg/ml、约 50mg/ml 至约 200mg/ml、约 75mg/ml 至约 200mg/ml、约 100mg/ml 至约 200mg/ml、约 125mg/ml 至约 200mg/ml、约 150mg/ml 至约 200mg/ml、约 25mg/ml 至约 150mg/ml、约 50mg/ml 至约 150mg/ml、约 75mg/ml 至约 150mg/ml、约 100mg/ml 至约 150mg/ml、约 125mg/ml 至约 150mg/ml、约 25mg/ml 至约 125mg/ml、约 50mg/ml 至约 125mg/ml、约 75mg/ml 至约 125mg/ml、约 100mg/ml 至约 125mg/ml、约 25mg/ml 至约 100mg/ml、约 50mg/ml 至约 100mg/ml、约 75mg/ml 至约 100mg/ml、约 25mg/ml 至约 75mg/ml、约 50mg/ml 至约 75mg/ml 或约 25mg/ml 至约 50mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制

剂包括约 90mg/ml 至约 110mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括约 100mg/ml 至约 210mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，本文中描述的制剂包括约 20mg/ml、约 30mg/ml、约 40mg/ml、约 50mg/ml、约 60mg/ml、约 70mg/ml、约 80mg/ml、约 90mg/ml、约 100mg/ml、约 110mg/ml、约 120mg/ml、约 130mg/ml、约 140mg/ml、约 150mg/ml、约 160mg/ml、约 170mg/ml、约 180mg/ml、约 190mg/ml、约 200mg/ml、约 250mg/ml 或约 300mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括约 100mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括约 125mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括约 130mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括约 150mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括约 200mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0352] 在一实施例中，本发明的制剂包括至少 1mg/ml、至少 5mg/ml、至少 10mg/ml、至少 20mg/ml、至少 30mg/ml、至少 40mg/ml、至少 50mg/ml、至少 60mg/ml、至少 70mg/ml、至少 80mg/ml、至少 90mg/ml、至少 100mg/ml、至少 110mg/ml、至少 120mg/ml、至少 130mg/ml、至少 140mg/ml、至少 150mg/ml、至少 160mg/ml、至少 170mg/ml、至少 180mg/ml、至少 190mg/ml、至少 200mg/ml、至少 250mg/ml 或至少 300mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括至少 100mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括至少 125mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括至少 150mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括至少 175mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括至少 200mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，本发明的制剂包括 1mg/ml 至 25mg/ml、1mg/ml 至 200mg/ml、25mg/ml 至 200mg/ml、50mg/ml 至 200mg/ml、75mg/ml 至 200mg/ml、100mg/ml 至 200mg/ml、125mg/ml 至 200mg/ml、150mg/ml 至 200mg/ml、25mg/ml 至 150mg/ml、50mg/ml 至 150mg/ml、75mg/m 至 150mg/ml、100mg/ml 至 150mg/ml、125mg/ml 至 150mg/ml、25mg/ml 至 125mg/ml、50mg/ml 至 125mg/ml、75mg/ml 至 125mg/ml、100mg/ml 至 125mg/ml、25mg/ml 至 100mg/ml、50mg/ml 至 100mg/ml、75mg/ml 至 100mg/ml、25mg/ml 至 75mg/ml、50mg/ml 至 75mg/ml 或 25mg/ml 至 50mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括 90mg/ml 至 110mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括 100mg/ml 至 210mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，本文中描述的制剂包括 20mg/ml、30mg/ml、40mg/ml、50mg/ml、60mg/ml、70mg/ml、80mg/ml、90mg/ml、100mg/ml、110mg/ml、120mg/ml、130mg/ml、140mg/ml、150mg/ml、160mg/ml、170mg/ml、180mg/ml、190mg/ml、200mg/ml、250mg/ml 或 300mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括 100mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括 125mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括 150mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括 175mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括 200mg/ml 的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0353] 非必要的，本发明的制剂可进一步包括常见赋形剂和 / 或添加剂如缓冲剂、糖化物、盐类和表面活性剂。此外或可选择地，本发明的制剂可进一步包括常见赋形剂和 / 或添加剂，例如，但不局限于，增溶剂、稀释剂、粘合剂、稳定剂、盐类、亲脂性溶剂、氨基酸、螯合剂、防腐剂等。

[0354] 在特定实施例中，缓冲剂选自组氨酸、柠檬酸、磷酸盐、甘氨酸和醋酸。在另一实施例中，糖类赋形剂选自海藻糖、蔗糖、甘露醇、麦芽糖和棉子糖。在其他实施例中，表面活性剂选自聚山梨酯 20、聚山梨酯 40、聚山梨酯 80 和聚醚 F68。在其他实施例中，盐类选自 NaCl、KCl、$MgCl_2$ 和 $CaCl_2$。

[0355] 非必要的，本发明的制剂可进一步包括其他常见的辅助组分，比如，但不局限于，合适的赋形剂、多羟基化合物、增溶剂、稀释剂、粘合剂、稳定剂、亲脂性溶剂、螯合剂、防腐剂等。

[0356] 本发明的制剂包括缓冲剂或 pH 调节剂以提供更好的 pH 控制。在一实施例中，本发明的制剂的 pH 值为约 3.0 至约 9.0、约 4.0 至约 8.0，约 5.0 至约 8.0、约 5.0 至约 7.0、约 5.0 至约 6.5、约 5.5 至约 8.0、约 5.5 至约 7.0 或约 5.5 至约 6.5。在另一实施例中，本发明的制剂的 pH 值为约 3.0、约 3.5、约 4.0、约 4.5、约 5.0、约 5.1、约 5.2、约 5.3、约 5.4、约 5.5、约 5.6、约 5.7、约 5.8、约 5.9、约 6.0、约 6.1、约 6.2、约 6.3、约 6.4、约 6.5、约 6.6、约 6.7、约 6.8、约 6.9、约 7.0、约 7.5、约 8.0、约 8.5、或约 9.0。在一具体实施例中，本发明的制剂的 pH 值约为 6.0。

[0357] 本发明的制剂包括缓冲剂或 pH 调节剂以提供更好的 pH 控制。在一实施例中，本发明的制剂的 pH 为 3.0 至 9.0、4.0 至 8.0、5.0 至 8.0、5.0 至 7.0、5.0 至 6.5、5.5 至 8.0、5.5 至 7.0 或 5.5 至 6.5。在另一实施例中，本发明的制剂的 pH 值为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.5、8.0、8.5 或 9.0。在一具体实施例中，本发明的制剂的 pH 为 6.0。本领域的技术人员理解的是制剂的 pH 值通常不应该等同于制剂中使用的抗体（包括抗体及其片段）等电点。

[0358] 通常情况下，缓冲剂是由有机酸或无机酸或碱制备的盐类。代表性缓冲剂包括，但不限于，有机酸盐类如柠檬酸盐、抗坏血酸盐、葡萄糖酸盐、碳酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、乙酸盐或苯二甲酸盐；Tris（三氨基甲烷盐酸缓冲液）、盐酸氨丁三醇或磷酸盐缓冲液。此外，氨基酸组分可能也具有缓冲能力。使用于本发明的制剂中作为缓冲剂的代表性氨基酸组分包括，但不限于，甘氨酸和组氨酸。在特定实施例中，缓冲剂选自组氨酸、柠檬酸、磷酸盐、甘氨酸和醋酸。在一具体实施例中，缓冲剂是组氨酸。在另一具体实施例中，缓冲剂是柠檬酸。缓冲剂的纯度应该至少为 98%、或至少 99%、或至少 99.5%。本文中使用的在组氨酸背景下的术语“纯度”是指本领域理解的组氨酸的化学纯度，如 The Merck Index，13th ed.，O’Neil 等，ed.（Merck & Co.，2001）中描述的。

[0359] 缓冲剂通常在浓度为约 1mM 至约 200mM 或任何范围或数值内使用，其取决于所需的离子强度和所需的缓冲能力。用于注射制剂的传统缓冲剂的常见浓度可发现于：药品剂型：注射药物，第 1 卷，第 2 版，第 5 章，第 194 页，De Luca 和 Boylan，“小容量注射制剂”，表 5“常用于注射产品的添加剂”。在一实施例中，缓冲剂的浓度为约 1mM、约 5mM、约 10mM、约 15mM、约 20mM、约 25mM、约 30mM、约 35mM、约 40mM、约 45mM、约 50mM、约 60mM、约 70mM、约 80mM、约 90mM 或约 100mM。在一实施例中，缓冲剂浓度为 1mM、5mM、10mM、15mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM 或 100mM。在一具体实施例中，缓冲剂浓度为约 5mM 至约 50mM。在另一具体实施例中，缓冲剂浓度为 5mM 至 20mM。

[0360] 在另一实施例中，缓冲剂浓度为 1mM、或 5mM、或 10mM、或 15mM、或 20mM、或 25mM、或

30mM、或 35mM、或 40mM、或 45mM、或 50mM、或 60mM、或 70mM、或 80mM、或 90mM 或 100mM。在一实施例中，缓冲剂浓度为 1mM、或 5mM、或 10mM、或 15mM、或 20mM、或 25mM、或 30mM、或 35mM、或 40mM、或 45mM、或 50mM、或 60mM、或 70mM、或 80mM、或 90mM 或 100mM。在一具体实施例中，缓冲剂浓度为 5mM 至 50mM。在另一具体实施例中，缓冲剂浓度为 5mM 至 20mM。

[0361] 在特定实施例中，本发明的制剂包括缓冲剂。在一实施例中，所述缓冲剂选自组氨酸、柠檬酸、磷酸盐、甘氨酸、和醋酸。在一具体实施例中，本发明的制剂包括组氨酸作为缓冲剂。

[0362] 在一实施例中，本发明的制剂包括至少约 1mM、至少约 5mM、至少约 10mM、至少约 20mM、至少约 30mM、至少约 40mM、至少约 50mM、至少约 75mM、至少约 100mM、至少约 150mM 或至少约 200mM 组氨酸。在另一实施例中，本发明的制剂包括约 1mM 至约 200mM、约 1mM 至约 150mM、约 1mM 至约 100mM、约 1mM 至约 75mM、约 10mM 至约 200mM、约 10mM 至约 150mM、约 10mM 至约 100mM、约 10mM 至约 75mM、约 10mM 至约 50mM、约 10mM 至约 40mM、约 10mM 至约 30mM、约 20mM 至约 75mM、约 20mM 至约 50mM、约 20mM 至约 40mM 或约 20mM 至约 30mM 组氨酸。本发明的另一实施例包括约 1mM、约 5mM、约 10mM、约 20mM、约 25mM、约 30mM、约 35mM、约 40mM、约 45mM、约 50mM、约 60mM、约 70mM、约 80mM、约 90mM、约 100mM、约 150mM 或约 200mM 组氨酸。在一具体实施例中，本发明的制剂包括约 10mM 组氨酸。

[0363] 在一实施例中，本发明的制剂包括至少 1mM、至少 5mM、至少 10mM、至少 20mM、至少 30mM、至少 40mM、至少 50mM、至少 75mM、至少 100mM、至少 150mM 或至少 200mM 组氨酸。在另一实施例中，本发明的制剂包括 1mM 至 200mM、1mM 至 150mM、1mM 至 100mM、1mM 至 75mM、10mM 至 200mM、10mM 至 150mM、10mM 至 100mM、10mM 至 75mM、10mM 至 50mM、10mM 至 40mM、10mM 至 30mM、20mM 至 75mM、20mM 至 50mM、20mM 至 40mM 或 20mM 至 30mM 组氨酸。本发明的另一实施例包括 1mM、5mM、10mM、20mM、25mM、30mM、35mM、40mM、45mM、50mM、60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、150mM 或 200mM 组氨酸。在一具体实施例中，本发明的制剂包括 10mM 组氨酸。

[0364] 在特定实施例中，本发明的制剂包括碳水化合物赋形剂。碳水化合物赋形剂能作为，例如粘度增强剂、稳定剂、填充剂、溶解剂等。碳水化合物赋形剂通常以质量或体积的约 1％至约 9％存在。在一实施例中，碳水化合物赋形剂以约 0.1％至约 20％存在。在另一实施例中，碳水化合物赋形剂以约 0.1％至约 15％存在。在一具体实施例中，碳水化合物赋形剂以约 0.1％至约 5％、约 1％至约 20％、约 5％至约 15％、约 8％至约 10％、约 10％至约 15％、约 15％至约 20％存在。在另一具体实施例中，碳水化合物赋形剂以 0.1％至 20％、5％至 15％、8％至 10％、10％至 15％、15％至 20％存在。在另一具体实施例中，碳水化合物赋形剂以约 0.1％至约 5％存在。在另一具体实施例中，碳水化合物赋形剂以约 5％～ 10％存在。在还一具体实施例中，碳水化合物赋形剂以约 15％至约 20％存在。在另一具体实施例中，碳水化合物赋形剂以 1％、或 1.5％、或 2％、或 2.5％、或 3％、或 4％、或 5％、或 10％、或 15％、或 20％存在。

[0365] 在特定实施例中，本发明的制剂包括碳水化合物赋形剂。碳水化合物赋形剂能作为，例如粘度增强剂、稳定剂、填充剂、溶解剂等。碳水化合物赋形剂通常以质量或体积的 1％至 9％存在。在一实施例中，碳水化合物赋形剂以 0.1％至 20％存在。在另一实施例中，碳水化合物赋形剂以 0.1％至 15％存在。在一具体实施例中，碳水化合物赋形剂以 0.1％至 5％、1％至 20％、5％至 15％、8％至 10％、10％至 15％、15％至 20％存在。在另一具体

实施例中，碳水化合物赋形剂以 0.1％至 20％、5％至 15％、8％至 10％、10％至 15％、15％至 20％存在。在另一具体实施例中，碳水化合物赋形剂以 0.1％至 5％存在。在另一具体实施例中，碳水化合物赋形剂以 5％至 10％存在。在还一具体实施例中，碳水化合物赋形剂以 15％至 20％存在。在另一具体实施例中，碳水化合物赋形剂以 1％、或 1.5％、或 2％、或 2.5％、或 3％、或 4％、或 5％、或 10％、或 15％、或 20％存在。

[0366] 用于本发明制剂的合适的碳水化合物赋形剂包括，例如，单糖，如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D- 甘露糖、山梨糖等；二糖，如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等；多糖，如棉子糖、松三糖、麦芽糊精、右旋糖酐、淀粉等；及糖醇，如甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨醇（山梨醇）等。在一实施例中，本发明的碳水化合物赋形剂选自蔗糖、海藻糖、乳糖、甘露醇和棉子糖。在一具体实施例中，碳水化合物赋形剂是海藻糖。在另一具体实施例中，碳水化合物赋形剂是甘露醇。在还一具体实施例中，碳水化合物赋形剂是蔗糖。在另一具体实施例中，碳水化合物赋形剂是棉子糖。碳水化合物赋形剂的纯度应该至少为 98％、或至少为 99％、或至少为 99.5％。

[0367] 在一实施例中，本发明的制剂包括至少约 1％、至少约 2％、至少约 4％、至少约 8％、至少约 20％、至少约 30％、或至少约 40％海藻糖。在另一实施例中，本发明的制剂包括约 1％至约 40％、约 1％至约 30％、约 1％至约 20％、约 2％至约 40％、约 2％至约 30％、约 2％至约 20％、约 4％至约 40％、约 4％至约 30％或约 4％至约 20％海藻糖。在另一实施例中，本发明的制剂包括约 1％、约 2％、约 4％、约 8％、约 20％、约 30％或约 40％海藻糖。在一具体实施例中，本发明的制剂包括约 4％海藻糖。

[0368] 在一实施例中，本发明的制剂包括至少 1％、至少 2％、至少 4％、至少 8％、至少 20％、至少 30％或至少 40％海藻糖。在另一实施例中，本发明的制剂包括 1％至 40％、1％至 30％、1％至 20％、2％至 40％、2％至 30％、2％至 20％、4％至 40％、4％至 30％或 4％至 20％海藻糖。在另一实施例中，本发明的制剂包括 1％、2％、4％、8％、20％、30％或 40％海藻糖。

[0369] 在一实施例中，本发明的制剂包括赋形剂。在一具体实施例中，本发明的制剂包括至少一种赋形剂，其选自糖、盐类、表面活性剂、氨基酸、多羟基化合物、螯合剂、乳化剂和防腐剂。在一实施例中，本发明的制剂包括盐类。在一实施例中，本发明的制剂包括盐类，其选自 NaCl、KCl、$CaCl_2$ 和 $MgCl_2$。在一具体实施例中，本发明的制剂包括 NaCl。

[0370] 在一实施例中，本发明的制剂包括至少约 10mM、至少约 25mM、至少约 50mM、至少约 75mM、至少约 80mM、至少约 100mM、至少约 125mM、至少约 150mM、至少约 175mM、至少约 200mM 或至少约 300mM 氯化钠。在另一实施例中，本文所述制剂包括约 10mM 至约 300mM、约 10mM 至约 200mM、约 10mM 至约 175mM、约 10mM 至约 150mM、约 25mM 至约 300mM、约 25mM 至约 200mM、约 25mM 至约 175mM、约 25mM 至约 150mM、约 50mM 至约 300mM、约 50mM 至约 200mM、约 50mM 至约 175mM、约 50mM 至约 50mM、约 75mM 至约 300mM、约 75mM 至约 200mM、约 75mM 至约 175mM、约 75mM 至约 150mM、约 100mM 至约 300mM、约 100mM 至约 200mM、约 100mM 至约 175mM 或约 100mM 至约 150mM 氯化钠。在另一实施例中，本发明的制剂包括约 10mM、约 25mM、约 50mM、约 75mM、约 80mM、约 100mM、约 125mM、约 150mM、约 175mM、约 200mM 或约 300mM 氯化钠。

[0371] 在一实施例中，本发明的制剂包括至少 10mM、至少 25mM、至少 50mM、至少 75mM、至少 80mM、至少 100mM、至少 125mM、至少 150mM、至少 175mM. 至少 200mM 或至少 300mM 氯化

钠。在另一实施例中，本文所述制剂包括 10mM 至 300mM、10mM 至 200mM、10mM 至 175mM、10mM 至 150mM、25mM 至 300mM、25mM 至 200mM、25mM 至 175mM、25mM 至 150mM、50mM 至 300mM、50mM 至 200mM、50mM 至 175mM、50mM 至 150mM、75mM 至 300mM、75mM 至 200mM、75mM 至 175mM、75mM 至 150mM、100mM 至 300mM、100mM 至 200mM、100mM 至 175mM 或 100mM 至 150mM 氯化钠。在另一实施例中，本发明的制剂包括 10mM、25mM、50mM、75mM、80mM、100mM、125mM、150mM、175mM、200mM 或 300mM 氯化钠。

[0372] 在一实施例中，本发明的制剂包括氨基酸。在一实施例中，本发明的制剂包括氨基酸盐类。在一实施例中，本发明的制剂包括氨基酸，其选自赖氨酸、精氨酸和组氨酸。在一实施例中，本发明的制剂包括至少约 25mM 的氨基酸、至少约 50mM 的氨基酸、至少约 100mM 的氨基酸、至少约 150mM 的氨基酸、至少约 200mM 的氨基酸、至少约 250mM 的氨基酸、至少约 300mM 的氨基酸、至少约 350mM 的氨基酸或至少约 400mM 的氨基酸。在另一实施例中，本发明的制剂包括约 25mM 至约 250mM、约 25mM 至约 300mM、约 25mM 至约 350mM、约 25mM 至约 400mM、约 50mM 至约 250mM、约 50mM 至约 300mM、约 50mM 至约 350mM、约 50mM 至约 400mM、约 100mM 至约 250mM、约 100mM 至约 300mM、约 100mM 至约 400mM、约 150mM 至约 250mM、约 150mM 至约 300mM 或约 150mM 至约 400mM 的氨基酸。在另一实施例中，本发明的制剂包括约 25mM、约 50mM、约 100mM、约 150mM、约 200mM、约 250mM、约 300mM、约 350mM 或约 400mM 的氨基酸。在一具体实施例中，本发明的制剂包括约 25mM 的氨基酸。在一具体实施例中，本发明的制剂包括约 50mM 的氨基酸。在一具体实施例中，本发明的制剂包括约 75mM 的氨基酸。在一具体实施例中，本发明的制剂包括约 100mM 的氨基酸。在一具体实施例中，本发明的制剂包括约 200mM 的氨基酸。

[0373] 在一实施例中，本发明的制剂包括海藻糖和氨基酸。在一实施例中，本发明的制剂包括海藻糖和氨基酸的摩尔比为约 0.1、约 0.5、约 0.75、约 1、约 5、约 10、约 20、约 30、约 40、约 50、约 60、约 70、约 80、约 90、约 100、约 200 或约 300。在一实施例中，本发明的制剂包括海藻糖和氨基酸的摩尔比为约 1.5、约 1.7、约 1.8、约 1.9、约 2、约 2.1、约 2.2、约 2.3、约 2.4、约 2.5、约 2.6、约 2.7、约 2.8、约 2.9、约 3、约 3.1、约 3.2、约 3.3、约 3.4、约 3.5 或约 4。在一具体实施例中，本发明的制剂包括海藻糖和氨基酸的摩尔比为约 2.1。在一具体实施例中，本发明的制剂包括海藻糖和氨基酸的摩尔比为约 2.2。在一具体实施例中，本发明的制剂包括海藻糖和氨基酸的摩尔比为约 2.4。在一具体实施例中，本发明的制剂包括海藻糖和氨基酸的摩尔比为约 2.5。在一具体实施例中，本发明的制剂包括海藻糖和氨基酸的摩尔比为约 2.6。在一具体实施例中，本发明的制剂包括海藻糖和氨基酸的摩尔比为约 2.7。

[0374] 本发明的制剂可进一步包括表面活性剂。本文中使用的术语“表面活性剂”指的是具有两亲性结构的有机物质；即，它们由非溶解性基团、通常的油溶性烃链和水溶性离子基团组成。表面活性剂可根据表面活性基团的电荷分为阴离子、阳离子和非离子表面活性剂。表面活性剂通常用作各种药物组合物和生物材料制备的湿润剂、乳化剂、增溶剂和分散剂。药学上可接受的表面活性剂如聚山梨醇酯（如聚山梨醇酯 20 或 80）；polyoxamers（例如，泊洛沙姆 188）；三硝基甲苯；辛甙钠；十二烷基 -、十四烷基 -、直链油烯基 - 或硬脂酰 - 磺基三甲铵乙内酯；十二烷基 -、十四烷基 -、直链油烯基 - 或硬脂酰 - 肌氨酸；直链油烯基 -、十四烷基 - 或十六烷基 - 三甲铵乙内酯；十二烷基氨基丙基 -、椰油酰基胺丙基 -、

直链油烯基氨基丙基 -、十四烷基氨基丙基 -、palmidopropyl-、或异硬脂酰氨基丙基 - 三甲铵乙内酯（如十二烷基氨基丙基）；十四烷基氨基丙基 -、palmidopropyl-、或异硬脂酰氨基丙基 - 二甲胺；甲基椰油酰基 -、或油烯基甲基二钠 - 氨基乙磺酸盐；及 MONAQUA™ 系列 (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.)、聚乙烯乙二醇、聚丙烯乙二醇、及乙烯基乙二醇和丙烯基乙二醇的共聚物（例如 Pluronics, PF68 等），可随意地添加到本发明制剂中以减少聚合作用。如果施用制剂时使用泵或塑料容器，表面活性剂是特别有用的。药学上可接受的表面活性剂的存在可缓解蛋白质聚合的倾向。在一具体实施例中，本发明的制剂包括聚山梨醇酯，其浓度范围为约 0.001％至约 1％、或约 0.001％至约 0.1％、或约 0.01％至约 0.1％。在另一具体实施例中，本发明制剂包括聚山梨醇酯，其浓度为 0.001％、或 0.002％、或 0.003％、或 0.004％、或 0.005％、或 0.006％、或 0.007％、或 0.008％、或 0.009％、或 0.01％、或 0.015％、或 0.02％。在另一具体实施例中，聚山梨醇酯是聚山梨醇酯 80。在一具体实施例中，本发明的制剂包括聚山梨醇酯，其浓度范围为 0.001％至 1％、或 0.001％至 0.1％、或 0.01％至 0.1％。在另一具体实施例中，本发明制剂包括聚山梨醇酯，其浓度为 0.001％、或 0.002％、或 0.003％、或 0.004％、或 0.005％、或 0.006％、或 0.007％、或 0.008％、或 0.009％、或 0.01％、或 0.015％、或 0.02％。在另一具体实施例中，聚山梨醇酯是聚山梨醇酯 80。

[0375] 在一实施例中，本发明的制剂包括表面活性剂。在一实施例中，本发明的制剂包括聚山梨醇酯 20、聚山梨醇酯 40、聚山梨醇酯 60 或聚山梨醇酯 80。在一具体实施例中，本发明的制剂包括聚山梨醇酯 80。

[0376] 在一实施例中，本发明的制剂包括至少约 0.001％、至少约 0.002％、至少约 0.005％、至少约 0.01％、至少约 0.02％、至少约 0.05％、至少约 0.1％、至少约 0.2％或至少约 0.5％聚山梨醇酯 80。在另一实施例中，本发明的制剂包括约 0.001％至约 0.5％、约 0.001％至约 0.2％、约 0.001％至约 0.1％、约 0.001％至约 0.05％、约 0.002％至约 0.5％、约 0.002％至约 0.2％、约 0.002％至约 0.1％、约 0.002％至约 0.05％、约 0.005％至约 0.5％、约 0.005％至约 0.2％、约 0.005％至约 0.1％、约 0.005％至约 0.05％、约 0.01％至约 0.5％、约 0.01％至约 0.2％、约 0.01％至约 0.1％或约 0.01％至约 0.05％聚山梨醇酯 80。在另一实施例中，本发明的制剂包括约 0.001％、约 0.002％、约 0.005％、约 0.01％、约 0.02％、约 0.05％、约 0.1％、约 0.2％和约 0.5％聚山梨醇酯 80。在一具体实施例中，本发明的制剂包括约 0.02％聚山梨醇酯 80。在一具体实施例中，本发明的制剂包括约 0.04％聚山梨醇酯 80。在一具体实施例中，本发明的制剂包括约 0.05％聚山梨醇酯 80。

[0377] 在一实施例中，本发明的制剂包括至少 0.001％、至少 0.002％、至少 0.005％、至少 0.01％、至少 0.02％、至少 0.05％、至少 0.1％、至少 0.2％或至少 0.5％聚山梨醇酯 80。在另一实施例中，本发明的制剂包括 0.001％至 0.5％、0.001％至 0.2％、0.001％至 0.1％、0.001％至 0.05％、0.002％至 0.5％、0.002％至 0.2％、0.002％至 0.1％、0.002％至 0.05％、0.005％至 0.5％、0.005％至 0.2％、0.005％至 0.1％、0.005％至 0.05％、0.01％至 0.5％、0.01％至 0.2％、0.01％至 0.1％或 0.01％至 0.05％聚山梨醇酯 80。在另一实施例中，本发明的制剂包括 0.001％、0.002％、0.005％、0.01％、0.02％、0.05％、0.1％、0.2％、0.5％聚山梨醇酯 80。在一具体实施例中，本发明的制剂包括 0.02％聚山梨醇酯 80。在一具体实施例中，本发明的制剂包括 0.04％聚山梨醇酯 80。在一具体实施例中，本发明的制

剂包括 0.05％聚山梨醇酯 80。

[0378] 非必要的，本发明的制剂可进一步包括其他常见的赋形剂和 / 或添加剂，其包括，但不限于，稀释剂、粘合剂、稳定剂、亲脂性溶剂、防腐剂、佐剂等。药学上可接受的赋形剂和 / 或添加剂可用于本发明的制剂。常用的赋形剂 / 添加剂，如药学上可接受的螯合剂（例如，但不限于，EDTA、DTPA 或 EGTA）可随意地添加到本发明的制剂以减少聚合作用。如果施用制剂时使用泵或塑料容器，这些添加剂是特别有用的。

[0379] 非必要地，可将防腐剂以任意合适的浓度如约 0.001％至约 5％或任何范围或数值内添加到本发明制剂中，所述防腐剂如苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、苯基亚硝酸盐、苯氧乙醇、甲醛、氯丁醇、氯化镁（例如，但不局限于，六水合物）、烷基对羟苯甲酸酯（甲基、乙基、丙基、丁基等）、苯扎氯铵、脱氢醋酸钠和乙基汞硫代水杨酸钠或其混合物。本发明的制剂中使用的防腐剂浓度是指足以产生微生物作用的浓度。这种浓度取决于选择的防腐剂，其容易被技术人员测定。

[0380] 其他可能用于本发明制剂的赋形剂 / 添加剂包括，例如，调味剂、抗菌剂、甜味剂、抗氧化剂、抗静电剂、脂类如磷脂或脂肪酸、类固醇如胆固醇、蛋白质赋形剂如血清白蛋白（人血清白蛋白 (HAS)、重组人血清白蛋白 (rHA)）、明胶、酪蛋白、盐形成抗衡离子如钠等。适合用于本发明制剂的这些和其他已知的药物赋形剂和 / 或添加剂在本领域是已知的，如“Remington :The Science & Practice of Pharmacy”，21st ed.，Lippincott Williams & Wilkins，(2005) 和“Physician′ s Desk Reference”，60thed.，Medical Economics，Montvale，N.J.(2005) 所列举的。药学上可接受的载体通常选择适合于本领域众所周知的或本文中描述的 Fc 异体蛋白的给药方式、溶解性和 / 或稳定性。

[0381] 本领域的技术人员应当理解的是本发明的制剂可与人体血液是等渗的，即本发明的制剂的渗透压与人体血液的渗透压基本上相同。这种等渗制剂的渗透压通常为约 250mOSm 至约 350mOSm。等渗性可被测定，例如，通过使用蒸汽压力或冰冻式渗压计。通过使用渗涨度调节剂调节制剂的渗涨度。“渗涨度调节剂”是那些药学上可接受的惰性物质，其被添加到制剂中以提供制剂的等渗度。适合于本发明的渗涨度调节剂包括，但不局限于，糖类、盐类和氨基酸。

[0382] 在特定实施例中，本发明的制剂的渗透压为约 100mOSm 至约 1200mOSM、或约 200mOSm 至约 1000mOSM、或约 200mOSm 至约 800mOSM、或约 200mOSm 至约 600mOSM、或约 250mOSm 至约 500mOSM、或约 250mOSm 至约 400mOSM、或约 250mOSm 至约 350mOSm。

[0383] 在特定实施例中，本发明的制剂的渗透压为 100mOSm 至 1200mOSM、或 200mOSm 至 1000mOSM、或 200mOSm 至 800mOSM、或 200mOSm 至 600mOSM、或 250mOSm 至 500mOSM、或 250mOSm 至 400mOSM、或 250mOSm 至 350mOSm。

[0384] 调节本发明的制剂的各种组分的任何一个或任何组合物的浓度以达到最终制剂所需要的渗涨度。例如，可根据本领域已知的方法调节碳水化合物赋形剂与抗体的比例（例如美国专利 No.6,685,940）。在特定实施例中，碳水化合物赋形剂与抗体的摩尔比可能为约 100 至约 1000 摩尔的碳水化合物赋形剂比约 1 摩尔的抗体，或约 200 至约 6000 摩尔的碳水化合物赋形剂比约 1 摩尔的抗体，或约 100 至约 510 摩尔的碳水化合物赋形剂比约 1 摩尔的抗体，或约 100 至约 600 摩尔的碳水化合物赋形剂比约 1 摩尔的抗体。

[0385] 调节本发明的制剂的各种组分的任何一个或任何组合物的浓度以达到最终制剂

所需要的渗涨度。例如，可根据本领域已知的方法调节碳水化合物赋形剂与抗体的比例（例如美国专利 No. 6,685,940）。在特定实施例中，碳水化合物赋形剂与抗体的摩尔比可能为 100 至 1000 摩尔的碳水化合物赋形剂比 1 摩尔的抗体，或 200 至 6000 摩尔的碳水化合物赋形剂比 1 摩尔的抗体，或 100 至 510 摩尔的碳水化合物赋形剂比 1 摩尔的抗体，或 100 至 600 摩尔的碳水化合物赋形剂比 1 摩尔的抗体。

[0386] 还可通过调节制剂的盐浓度以达到最终制剂所需要的渗涨度。适合于本发明的作为渗涨度调节剂的药学上可接受的盐类包括，但不局限于，氯化钠、琥珀酸钠、硫酸钠、氯化钾、氯化镁、硫酸镁和氯化钙。在具体实施例中，本发明的制剂包括 NaCl、$MgCl_2$ 和 / 或 $CaCl_2$。在一实施例中，NaCl 浓度为是约 75mM 至约 150mM。在另一实施例中，$MgCl_2$ 浓度为约 1mM 至约 100mM。适合于本发明的作为渗涨度调节剂的药学上可接受的氨基酸包括，但不局限于，脯氨酸、丙氨酸、L- 精氨酸、天冬酰胺、L- 天冬氨酸、甘氨酸、丝氨酸、赖氨酸和组氨酸。

[0387] 在一实施例中，本发明的制剂是无热源制剂，其基本上没有内毒素类和 / 或相关致热物质。内毒素类包括局限于微生物内且只有当微生物分解或死亡时才被释放的毒素。致热物质还包括细菌和其他微生物外膜的热诱导、耐高温物质（糖蛋白）。如果将这些物质施用于人类，它们都能引起发热、低血压和休克。由于潜在的有害影响，即使是低量的毒素也必须从静脉注射给药的药物溶液中移除。美国食品与药物管理局（“FDA”）已建立了静脉注射药物每小时每千克体重的剂量上限为 5 个肉毒素单位 (EU)(The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26(1) :223(2000))。当治疗性蛋白质以每千克体重几百或几千毫克的数量给药时，其能与抗体作用，即使微量的有害和危险的内毒素必须移除。在特定具体实施例中，组合物中肉毒素和致热物水平小于 10EU/mg、或小于 5EU/mg、或小于 1EU/mg、或小于 0.1EU/mg、或小于 0.01EU/mg、或小于 0.001EU/mg。

[0388] 当用于体内给药时，本发明的制剂应该是无菌的。本发明的制剂可通过各种灭菌方法进行灭菌，包括过滤除菌、辐射等。在一实施例中，抗体制剂通过预灭菌的 0.22μm 过滤器过滤灭菌。根据传统药物实验如“Remington :The Science & Practice of Pharmacy”, 21st ed., Lippincott Williams & Wilkins, (2005) 中所述，可配制用于注射的无菌组合物。制剂包括如本文中所述的那些抗体，其通常以冻干形式或在溶液中保存。预期包括抗体的无菌组合物被置于具有无菌进入孔的容器，例如，具有接管的输液袋或瓶，接管允许制剂的回流，如通过皮下注射针的穿孔塞。在一实施例中，本发明的组合物提供为预充注射器。

[0389] 在一实施例中，本发明的制剂是冻干制剂。术语″冻干的″或“冷冻干燥的”包括经过干燥过程（如冷冻干燥法）的物质状态，其中去除至少 50％的湿度。

[0390] 短语“填充剂”包括药学上可接受的并添加到溶解层的化合物。本领域已知的填充剂包括，例如，糖类，其包括简单糖如葡萄糖、核糖、果糖等，糖醇如甘露醇、肌醇和山梨醇，二糖包括海藻糖、蔗糖和乳糖，天然聚合物如淀粉、右旋糖酐、壳聚糖、透明质酸、蛋白质（如明胶和血清白蛋白）、糖原、合成单体及聚合物。

[0391] “冻干保护剂”是一个分子，其与目的蛋白结合时，显著防止或减少在冻干和随后保存时蛋白的化学和 / 或物理的不稳定性。冻干保护剂包括，但不局限于，糖类及其相应的糖醇；氨基酸如谷氨酸钠或组氨酸；甲胺如三甲铵乙内酯；易溶盐如硫酸镁；多羟基化合物如含三个羟基或高分子量糖醇，例如，甘油、葡聚糖、赤藓糖醇、甘油、阿拉伯糖醇、木糖醇，

山梨醇和甘露醇；丙二醇；聚乙烯乙二醇；Pluronics™.；及其组合物。还原糖的例子包括，但不局限于，葡萄糖、麦芽糖、乳糖、麦芽酮糖、异麦芽酮糖和半乳糖苷果糖。非还原糖例子包括，但不局限于，多羟基化合物的非还原苷类，选自糖醇和其他直链多元醇。糖醇的例子包括，但不局限于，单苷、通过还原二糖获得的化合物如乳糖、麦芽糖、果糖和麦芽酮糖。糖苷基团可以是葡糖苷或糖苷的。糖醇的其他例子包括，但不局限于，山梨醇、麦芽糖醇、乳糖醇与异麦芽酮糖。在具体实施例中，海藻糖或蔗糖用作冻干保护剂。

[0392] 将冻干保护剂以“冻干保护数量”添加到预先冻干的制剂中，这表示存在冻干保护数量的冻干保护剂时冷冻干燥蛋白质，该蛋白质经冷冻干燥和保存基本上保留了其物理和化学稳定性及完整性。

[0393] 在一实施例中，冻干保护剂（如海藻糖）与本发明制剂的抗 IL-6 抗体分子的摩尔比为至少约 10、至少约 50、至少约 100、至少约 200 或至少约 300。在另一实施例中，冻干保护剂（如海藻糖）与本发明制剂的抗 IL-6 抗体分子的摩尔比为约 1、约 2、约 5、约 10、约 50、约 100、约 200 或约 300。

[0394] “重组的”制剂通过将冻干抗体制剂溶解于稀释剂中而制备，以使抗体分散在重组制剂中。重组制剂适合于给使用目的蛋白治疗的患者施用（如肠胃外给药），在本发明特定实施例中，可能适用于静脉给药。

[0395] 本文中目的“稀释剂”是药学上可接受的（对人给药时安全且无毒）且用于液体制剂制备的稀释剂，如冷到干燥后的重组制剂。在一些实施例中，稀释剂包括，但不局限于，无菌水、用于注射的抑菌水 (BWFI)、pH 缓冲溶液（如，磷酸盐缓冲液）、无菌生理盐水、林格氏溶液或葡萄糖溶液。在另一实施例中，稀释剂可包括盐类和 / 或缓冲剂的水溶液。

[0396] 在一实施例中，本发明的制剂是冻干制剂，其包括本发明的 IL-6 抗体，以每分钟振动 400 次的速度摇晃所述药水瓶 4 小时，其中所述药水瓶装有一半体积的所述试剂，其中至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 98％或至少约 99％的所述抗体可从药水瓶中回收。在另一实施例中，本发明的制剂是冻干制剂，所述制剂经过 3 个冷冻 / 解冻循环，其包括本发明的 IL-6 抗体，其中所述药水瓶装有一半体积的所述试剂，其中至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 98％或至少约 99％的所述抗体可从药水瓶中回收。在另一实施例中，本发明的制剂是冻干制剂，其包括本发明的 IL-6 抗体，其中至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 98％或至少约 99％的所述抗体通过重组所述制剂产生的冻干层可从药水瓶中回收。

[0397] 在一实施例中，本发明的制剂是冻干制剂，其包括本发明的 IL-6 抗体，以每分钟振动 400 次的速度摇晃所述药水瓶 4 小时，其中所述药水瓶装有一半体积的所述试剂，其中至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 98％或至少约 99％的所述抗体可从药水瓶中回收。在另一实施例中，本发明的制剂是冻干制剂，其包括本发明的 IL-6 抗体，所述制剂经过 3 个冷冻 / 解冻循环，其中所述药水瓶装有一半体积的所述试剂，其中至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 98％或至少约 99％的所述抗体可从药水瓶中回收。在另一实施例中，本发明的制剂是冻干制剂，其包括本发明的 IL-6 抗体，其中至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 98％或至少约 99％的所述抗体通过重组所述制剂产生的冻干层可从药水瓶中回收。

[0398] 在一实施例中，本发明的冻干制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体分子，其中至少约

90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 98％或至少约 99％的所述抗体保存在约 40℃下至少约 1 周、至少约 2 周、至少约 3 周、至少约 4 周、至少约 5 周或至少约 6 周后通过重组所述冻干制剂被回收。在一实施例中，本发明的冻干制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体分子，其中至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 98％或至少约 99％的所述抗体保存在约 40℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月或至少约 6 个月后通过重组所述冻干制剂被回收。

[0399] 在一实施例中，本发明的冻干制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体分子，其中至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 98％或至少约 99％的所述抗体储存在约 5℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月、至少约 6 个月、至少约 7 个月、至少约 8 个月、至少约 9 个月、至少约 10 个月、至少约 11 个月或至少约 12 个月后通过重组所述冻干制剂被回收。在一实施例中，本发明的冻干制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体分子，其中至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 98％或至少约 99％的所述抗体储存在约 5℃下至少约 1 年、至少约 2 年、至少约 3 年、至少约 4 年或至少约 5 年后通过重组所述冻干制剂被回收。

[0400] 在一实施例中，本发明的冻干制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体分子，其中至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 98％或至少约 99％的所述抗体储存在约 40℃下约 1 周、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周或约 6 周后通过重组所述冻干制剂被回收。在一实施例中，本发明的冻干制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体分子，其中至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 98％或至少约 99％的所述抗体储存在约 40℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月或约 6 个月后通过重组所述冻干制剂被回收。

[0401] 在一实施例中，本发明的冻干制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体分子，其中至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 98％或至少约 99％的所述抗体储存在约 5℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 7 个月、约 8 个月、约 9 个月、约 10 个月、约 11 个月或约 12 个月后通过重组所述冻干制剂被回收。在一实施例中，本发明的冻干制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体分子，其中至少约 90％、至少约 95％、至少约 97％、至少约 98％或至少约 99％的所述抗体储存在约 5℃下约 1 年、约 2 年、约 3 年、约 4 年或约 5 年后通过重组所述冻干制剂被回收。

[0402] 在一实施例中，本发明的制剂是重组制剂。在特定实施例中，本发明的重组液体制剂通过本文描述的冻干制剂制备。

[0403] 在一实施例中，本发明的重组液体制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，其浓度与预冻干的液体制剂的浓度相同。

[0404] 在一实施例中，本发明的重组液体制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，其浓度高于预冻干的液体制剂的浓度。在具体实施例中，本发明的重组液体制剂包括的本发明的抗 IL-6 抗体的浓度比预冻干的液体制剂的浓度高约 2 倍、约 3 倍、约 4 倍、约 5 倍、约 6 倍、约 7 倍、约 8 倍、约 9 倍、约 10 倍、约 15 倍、约 20 倍、约 30 倍、约 40 倍。

[0405] 在一实施例中，本发明的重组液体制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，其浓度低于预冻干的液体制剂的浓度。在具体实施例中，本发明的重组液体制剂包括的本发明的抗 IL-6 抗体的浓度比预冻干的液体制剂的浓度低约 2 倍、约 3 倍、约 4 倍、约 5 倍、约 6 倍、约 7 倍、约 8 倍、约 9 倍、约 10 倍、约 15 倍、约 20 倍、约 30 倍、约 40 倍。

[0406] 在一实施例中，本发明的重组液体制剂是水性制剂。在一具体实施例中，本发明的重组液体制剂是水性制剂，其中水介质是蒸馏水。

[0407] 在一实施例中，本发明的重组制剂是无菌的。

[0408] 在一实施例中，本发明的重组制剂是均质的。

[0409] 在一实施例中，本发明的重组制剂是等渗的。在一实施例中，本发明的重组制剂是低渗的。在一实施例中，本发明的重组制剂是高渗的。

[0410] 在特定实施例中，本发明的重组制剂包括（或作为总分数组成）少于约 3.4E+5 颗粒 /ml 的直径为 2 至 4μm 的颗粒、少于约 4.0E+4 颗粒 /ml 的直径为 4 至 10μm 的颗粒、少于约 4.2E+3 颗粒 /ml 的直径为 10 至 20μm 的颗粒、少于约 5.0E+2 颗粒 /ml 的直径为 20 至 30μm 的颗粒、少于约 7.5E+1 颗粒 /ml 的直径为 30 至 40 的颗粒、少于约 9.4 颗粒 /ml 的直径为 40 至 60μm 的颗粒，其颗粒直径通过颗粒计数仪测定。在特定实施例中，本发明的重组制剂包括粒径大于 40μm 或大于 30μm 的不可检测颗粒。

[0411] 在特定实施例中，在保存约 1 小时、约 2 小时、约 3 小时、约 4 小时、约 5 小时、约 6 小时、约 7 小时、约 8 小时、约 9 小时、约 12 小时、约 15 小时、约 18 小时或约 24 小时后，本发明的重组制剂包括（或作为总分数组成）少于约 3.4E+5 颗粒 /ml 的直径为 2 至 4μm 的颗粒、少于约 4.0E+4 颗粒 /ml 的直径为 4 至 10μm 的颗粒、少于约 4.2E+3 颗粒 /ml 的直径为 10 至 20μm 的颗粒、少于约 5.0E+2 颗粒 /ml 的直径为 20 至 30μm 的颗粒、少于约 7.5E+1 颗粒 /ml 的直径为 30 至 40 的颗粒、少于约 9.4 颗粒 /ml 的直径为 40 至 60μm 的颗粒，其颗粒直径通过颗粒计数仪测定。在特定实施例中，本发明的液体制剂包括粒径大于 40μm 或大于 30μm 的不可检测颗粒。

[0412] 在具体实施例中，药物组合物包括，但不局限于：

[0413] (a) 无菌液体制剂，其包括 100mg/ml 抗体、25mM 组氨酸、1.6mM 甘氨酸，pH 值为 6.0；

[0414] (b) 无菌液体制剂，其包括 100mg/ml 抗体和 25mM 组氨酸，pH 值为 6.0；

[0415] (c) 无菌液体制剂，其包括 5mg/ml 抗体、20mM 柠檬酸、100mMNACl、1.5％甘露醇、501DTPA 和 0.02％ PS80，pH 值为 6.0；

[0416] (d) 无菌液体制剂，其包括 100mg/ml 抗体、25mM 组氨酸、8％海藻糖和 0.02％ PS80，pH 值为 6.0；

[0417] (e) 无菌液体制剂，其包括 20mg/ml 抗体、10mM 组氨酸、2.35％ (w/v) 赖氨酸 -HCl 和 0.02％ PS-80(w/v)，pH 值为 6.0；

[0418] (f) 无菌液体制剂，其包括 5mg/ml 抗体、10mM 柠檬酸钠缓冲液、NaCl(0.15M) 和吐温 80(0.02％)，pH 值为 6.0；

[0419] (g) 无菌液体制剂，其包括 100mg/ml 抗体、10mM 组氨酸和 150mM NaCl，pH 值为 6.0。

[0420] 在一实施例中，本发明的制剂使本发明的抗 IL-6 抗体稳定。在一实施例中，本发明的制剂防止本发明的抗 IL-6 抗体的聚集作用。在另一实施例中，本发明的制剂防止本发明的抗 IL-6 抗体的断裂作用。

[0421] 在一实施例中，本发明的制剂储存在约 40℃下至少约 1 周、至少约 2 周、至少约 3 周、或至少约 4 周是稳定的。在一实施例中，本发明的制剂储存在约 40℃下至少约 1 个月、

至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月或至少约 6 个月是稳定的。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中是稳定的。

[0422] 在一实施例中，本发明的制剂储存在约 25℃下至少约 1 周、至少约 2 周、至少约 3 周或至少约 4 周是稳定的。在一实施例中，本发明的制剂储存在约 25℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月或至少约 6 个月是稳定的。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中是稳定的。

[0423] 在一实施例中，本发明的制剂储存在约 5℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月、至少约 6 个月、至少约 7 个月、至少约 8 个月、至少约 9 个月、至少约 10 个月、至少约 11 个月或至少约 12 个月是稳定的。在一实施例中，本发明的制剂储存在约 5℃下至少约 1 年、至少约 2 年、至少约 3 年、至少约 4 年、至少约 5 年、至少约 6 年、至少约 7 年、至少约 8 年、至少约 9 年、至少约 10 年、至少约 11 年或至少约 12 年是稳定的。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中是稳定的。

[0424] 在一实施例中，本发明的制剂储存在约 40℃下约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周是稳定的。在一实施例中，本发明的制剂储存在约 40℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月或约 6 个月是稳定的。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中是稳定的。

[0425] 在一实施例中，本发明的制剂储存在约 25℃下约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周是稳定的。在一实施例中，本发明的制剂储存在约 25℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月或约 6 个月是稳定的。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中是稳定的。

[0426] 在一实施例中，本发明的制剂储存在约 5℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 7 个月、约 8 个月、约 9 个月、约 10 个月、约 11 个月或约 12 个月是稳定的。在一实施例中，本发明的制剂储存在约 5℃下约 1 年、约 2 年、约 3 年、约 4 年、约 5 年、约 6 年、约 7 年、约 8 年、约 9 年、约 10 年、约 11 年或约 12 年是稳定的。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中是稳定的。

[0427] 本发明提供包括本发明抗 IL-6 抗体的稳定制剂。所述抗体的稳定性可通过聚集作用、降解作用和断裂作用的程度评估，通过 HPSEC、反向色谱法、静态光散射 (SLS)、傅里叶变换红外分光镜 (FTIR)、圆二色性 (CD)、尿素伸展技术、体内色氨酸荧光、差示扫描量热法和 / 或 ANS 结合技术测定，与包括参考抗体的参考制剂相比较。例如，参考制剂可能是冷冻在 -70℃的参考标准样品，其包括 10mM 组氨酸 (pH 6.0) 中的 10mg/ml 参考抗体 (包括抗体及其片段)(例如，但不局限于，包括 16C4 可变区域和 Fc 区域的抗体，其具有复杂的 N- 糖苷 - 连接糖链，在糖链中岩藻糖不与还原末端的 N- 乙酰氨基葡萄糖相结合)，组氨酸中包括 75mMNaCl 和 4％海藻糖，其中参考制剂通过 HPSEC 有规律地显示单峰 (例如，≥ 97％的面积)。在特定实施例中，参考制剂与检测稳定性的制剂相同；参考制剂在检测稳定性期间可能保存冷冻在 -70℃以保存参考制剂的原初状态。例如，用于评估任何储存在 40℃下的制剂中 IL-6 抗体结合活性损失的参考标准样品可能与储存在 -70℃下 30 天的制剂相同。包括抗体 (包括抗体及其片段) 的制剂的总稳定性可通过各种免疫学检测估计，例如，ELISA(酶联免疫吸附测定) 和使用分离抗原分子的放射免疫测定法。此外，包括抗体的制剂的稳定性可能还使用各种用于测量抗体功能特点的试验估计，例如，用于测量抗原亲和

力、体外 ADCC 活性、体内消耗作用、体外 CDC 活性、抑制试验、细胞增殖试验等。

[0428] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，所述抗体的 IL-6 结合活性为参考抗体的 IL-6 结合活性的至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％、至少 95％或至少 99％，其中所述制剂储存在约 40℃下至少约 1 周、至少约 2 周、至少约 3 周或至少约 4 周。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，所述抗体的 IL-6 结合活性为参考抗体的 IL-6 结合活性的至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％、至少 95％或至少 99％，其中所述制剂储存在约 40℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月或至少约 6 个月。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0429] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，所述抗体的 IL-6 结合活性为参考抗体的 IL-6 结合活性的至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％、至少 95％或至少 99％，其中所述制剂储存在约 25℃下至少约 1 周、至少约 2 周、至少约 3 周或至少约 4 周。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，所述抗体的 IL-6 结合活性为参考抗体的 IL-6 结合活性的至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％、至少 95％或至少 99％，其中所述制剂储存在约 25℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月或至少约 6 个月。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0430] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，所述抗体的 IL-6 结合活性为参考抗体的 IL-6 结合活性的至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％、至少 95％或至少 99％，其中所述制剂储存在约 5℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月、至少约 6 个月、至少约 7 个月、至少约 8 个月、至少约 9 个月、至少约 10 个月、至少约 11 个月或至少约 12 个月。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，所述抗体的 IL-6 结合活性为参考抗体的 IL-6 结合活性的至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％、至少 95％或至少 99％，其中所述制剂储存在约 5℃下至少约 1 年、至少约 2 年、至少约 3 年、至少约 4 年、至少约 5 年、至少约 6 年、至少约 7 年、至少约 8 年、至少约 9 年、至少约 10 年、至少约 11 年或至少约 12 年。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0431] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，所述抗体的 IL-6 结合活性为参考抗体的 IL-6 结合活性的至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％、至少 95％或至少 99％，其中所述制剂储存在约 40℃下约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，所述抗体的 IL-6 结合活性为参考抗体的 IL-6 结合活性的至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％、至少 95％或至少 99％的参考抗体的 IL-6 结合活性，其中所述制剂储存在约 40℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月或约 6 个月。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0432] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，所述抗体的 IL-6 结合活性为参考抗体的 IL-6 结合活性的至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％、至

少 95％或至少 99％，其中所述制剂储存在约 25℃下约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，所述抗体的 IL-6 结合活性为参考抗体的 IL-6 结合活性的至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％、至少 95％或至少 99％，其中所述制剂储存在约 25℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月或约 6 个月。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0433] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，所述抗体的 IL-6 结合活性为参考抗体的 IL-6 结合活性的至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％、至少 95％或至少 99％，其中所述制剂储存在约 5℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 7 个月、约 8 个月、约 9 个月、约 10 个月、约 11 个月或约 12 个月。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，所述抗体的 IL-6 结合活性为参考抗体的 IL-6 结合活性的至少 50％、至少 60％、至少 70％、至少 80％、至少 90％、至少 95％或至少 99％的参考抗体的 IL-6 结合活性，其中所述制剂储存在约 5℃下约 1 年、约 2 年、约 3 年、约 4 年、约 5 年、约 6 年、约 7 年、约 8 年、约 9 年、约 10 年、约 11 年或约 12 年。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0434] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，其中所述抗体在制剂储存在 40℃下至少约 1 周、至少约 2 周、至少约 3 周或至少约 4 周期间，其 IL-6 结合活性损失至多 50％、至多 40％、至多 30％、至多 20％、至多 10％、至多 5％或至多 1％。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，其中所述抗体在制剂储存在 40℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月或至少约 6 个月期间，其 IL-6 结合活性损失至多 50％、至多 40％、至多 30％、至多 20％、至多 10％、至多 5％或至多 1％。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。本文中使用的术语“至多”和“不超过”具有相同含义。

[0435] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，其中所述抗体在制剂储存在 40℃下至少约 1 周、至少约 2 周、至少约 3 周或至少约 4 周期间，其 IL-6 结合活性损失至多 50％、至多 40％、至多 30％、至多 20％、至多 10％、至多 5％或至多 1％。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，其中所述抗体在制剂储存在 40℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月或至少约 6 个月期间，其 IL-6 结合活性损失至多 50％、至多 40％、至多 30％、至多 20％、至多 10％、至多 5％或至多 1％。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0436] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，其中所述抗体在制剂储存在 25℃下至少约 1 周、至少约 2 周、至少约 3 周或至少约 4 周期间，其 IL-6 结合活性损失至多 50％、至多 40％、至多 30％、至多 20％、至多 10％、至多 5％或至多 1％。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，其中所述抗体在制剂储存在 25℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月或至少约 6 个月期间，其 IL-6 结合活性损失至多 50％、至多 40％、至多 30％、至多 20％、至多 10％、至多 5％或至多

1%。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0437] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，其中所述抗体在制剂储存在 5℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月、至少约 6 个月、至少约 7 个月、至少约 8 个月、至少约 9 个月、至少约 10 个月、至少约 11 个月、或至少约 12 个月期间，其 IL-6 结合活性损失至多 50%、至多 40%、至多 30%、至多 20%、至多 10%、至多 5%或至多 1%。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，其中所述抗体在制剂储存在 5℃下至少约 1 年、至少约 2 年、至少约 3 年、至少约 4 年、至少约 5 年、至少约 6 年、至少约 7 年、至少约 8 年、至少约 9 年、至少约 10 年、至少约 11 年或至少约 12 年期间，其 IL-6 结合活性损失至多 50%、至多 40%、至多 30%、至多 20%、至多 10%、至多 5%或至多 1%。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0438] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，其中所述抗体在制剂储存在 40℃下约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周期间，其 IL-6 结合活性损失至多 50%、至多 40%、至多 30%、至多 20%、至多 10%、至多 5%或至多 1%。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，其中所述抗体在制剂储存在 40℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月或约 6 个月期间，其 IL-6 结合活性损失至多 50%、至多 40%、至多 30%、至多 20%、至多 10%、至多 5%或至多 1%。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0439] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，其中所述抗体在制剂储存在 25℃下约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周期间，其 IL-6 结合活性损失至多 50%、至多 40%、至多 30%、至多 20%、至多 10%、至多 5%或至多 1%。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，其中所述抗体在制剂储存在 25℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月或约 6 个月期间，其 IL-6 结合活性损失至多 50%、至多 40%、至多 30%、至多 20%、至多 10%、至多 5%或至多 1%。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0440] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，其中所述抗体在制剂储存在 5℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 7 个月、约 8 个月、约 9 个月、约 10 个月、约 11 个月或约 12 个月期间，其 IL-6 结合活性损失至多 50%、至多 40%、至多 30%、至多 20%、至多 10%、至多 5%或至多 1%。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，其中所述抗体在制剂储存在 5℃下约 1 年、约 2 年、约 3 年、约 4 年、约 5 年、约 6 年、约 7 年、约 8 年、约 9 年、约 10 年、约 11 年或约 12 年期间，其 IL-6 结合活性损失至多 50%、至多 40%、至多 30%、至多 20%、至多 10%、至多 5%或至多 1%。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0441] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 40℃下至少约 1 周、至少约 2 周、至少约 3 周或至少约 4 周，通过 HPSEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体形成聚合体。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 40℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约

3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月或至少约 6 个月，通过 HPSEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体形成聚合体。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0442] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 25℃下至少约 1 周、至少约 2 周、至少约 3 周、或至少约 4 周，通过 HPSEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体形成聚合体。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 25℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月、或至少约 6 个月，通过 HPSEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体形成聚合体。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0443] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 5℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月、至少约 6 个月、至少约 7 个月、至少约 8 个月、至少约 9 个月、至少约 10 个月、至少约 11 个月或至少约 12 个月，通过 HPSEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体形成聚合体。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 5℃下至少约 1 年、至少约 2 年、至少约 3 年、至少约 4 年、至少约 5 年、至少约 6 年、至少约 7 年、至少约 8 年、至少约 9 年、至少约 10 年、至少约 11 年、或至少约 12 年，通过 HPSEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体形成聚合体。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0444] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 40℃下约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周，通过 HPSEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体形成聚合体。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 40℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、或约 6 个月，通过 HPSEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体形成聚合体。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0445] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 25℃下约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周，通过 HPSEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体形成聚合体。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 25℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、或约 6 个月，通过 HPSEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体形成聚合体。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0446] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 5℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 7 个月、约 8 个月、约 9 个月、约 10 个月、约 11 个月、或约 12 个月，通过 HPSEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于

4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体形成聚合体。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 5℃下约 1 年、约 2 年、约 3 年、约 4 年、约 5 年、约 6 年、约 7 年、约 8 年、约 9 年、约 10 年、约 11 年、或约 12 年，通过 HPSEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体形成聚合体。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0447] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 40℃下至少约 1 周、至少约 2 周、至少约 3 周或至少约 4 周，通过 RP-HPLC 或 SEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体断裂。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 40℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月、或至少约 6 个月，通过 RP-HPLC 或 SEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体断裂。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0448] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 25℃下至少约 1 周、至少约 2 周、至少约 3 周或至少约 4 周，通过 RP-HPLC 或 SEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体断裂。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 25℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月、或至少约 6 个月，通过 RP-HPLC 或 SEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体断裂。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0449] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 5℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月、至少约 6 个月、至少约 7 个月、至少约 8 个月、至少约 9 个月、至少约 10 个月、至少约 11 个月或至少约 12 个月，通过 RP-HPLC 或 SEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体断裂。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 5℃下至少约 1 年、至少约 2 年、至少约 3 年、至少约 4 年、至少约 5 年、至少约 6 年、至少约 7 年、至少约 8 年、至少约 9 年、至少约 10 年、至少约 11 年或至少约 12 年，通过 RP-HPLC 或 SEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体断裂。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0450] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 40℃下约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周，通过 RP-HPLC 或 SEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体断裂。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 40℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月或约 6 个月，通过 RP-HPLC 或 SEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体断裂。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗

体。

[0451] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 25℃下约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周，通过 RP-HPLC 或 SEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体断裂。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 25℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月或约 6 个月，通过 RP-HPLC 或 SEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体断裂。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0452] 在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 5℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 7 个月、约 8 个月、约 9 个月、约 10 个月、约 11 个月或约 12 个月，通过 RP-HPLC 或 SEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体断裂。在一实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗 IL-6 抗体，储存在约 5℃下约 1 年、约 2 年、约 3 年、约 4 年、约 5 年、约 6 年、约 7 年、约 8 年、约 9 年、约 10 年、约 11 年或约 12 年，通过 RP-HPLC 或 SEC 测定其中少于 1%、少于 2%、少于 3%、少于 4%、少于 5%、少于 7%或少于 10%的所述抗体断裂。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0453] 在一实施例中，本发明的制剂储存在约 40℃下至少约 1 周、至少约 2 周、至少约 3 周或至少约 4 周，通过目视检查确定所述制剂是清澈无色的。在一实施例中，本发明的制剂储存在约 40℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月或至少约 6 个月，通过目视检查确定所述制剂是清澈无色的。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0454] 在一实施例中，本发明的制剂储存在约 25℃下至少约 1 周、至少约 2 周、至少约 3 周或至少约 4 周，通过目视检查确定所述制剂是清澈无色的。在一实施例中，本发明的制剂储存在约 25℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月或至少约 6 个月，通过目视检查确定所述制剂是清澈无色的。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0455] 在一实施例中，本发明的制剂储存在约 5℃下至少约 1 个月、至少约 2 个月、至少约 3 个月、至少约 4 个月、至少约 5 个月、至少约 6 个月、至少约 7 个月、至少约 8 个月、至少约 9 个月、至少约 10 个月、至少约 11 个月或至少约 12 个月，通过目视检查确定所述制剂是清澈无色的。在一实施例中，本发明的制剂储存在约 5℃下至少约 1 年、至少约 2 年、至少约 3 年、至少约 4 年、至少约 5 年、至少约 6 年、至少约 7 年、至少约 8 年、至少约 9 年、至少约 10 年、至少约 11 年或至少约 12 年，通过目视检查确定所述制剂是清澈无色的。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0456] 在一实施例中，本发明的制剂储存在约 40℃下约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周，通

过目视检查确定所述制剂是清澈无色的。在一实施例中，本发明的制剂储存在约 40℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、或约 6 个月，通过目视检查确定所述制剂是清澈无色的。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0457] 在一实施例中，本发明的制剂储存在约 25℃下约 1 周、约 2 周、约 3 周或约 4 周，通过目视检查确定所述制剂是清澈无色的。在一实施例中，本发明的制剂储存在约 25℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月或约 6 个月，通过目视检查确定所述制剂是清澈无色的。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0458] 在一实施例中，本发明的制剂储存在约 5℃下约 1 个月、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 7 个月、约 8 个月、约 9 个月、约 10 个月、约 11 个月或约 12 个月，通过目视检查确定所述制剂是清澈无色的。在一实施例中，本发明的制剂储存在约 5℃下约 1 年、约 2 年、约 3 年、约 4 年、约 5 年、约 6 年、约 7 年、约 8 年、约 9 年、约 10 年、约 11 年或约 12 年，通过目视检查确定所述制剂是清澈无色的。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0459] 在特定实施例中，本发明的制剂储存后维持改善的聚合特性，如室温或 4℃下的延长的周期（比如，但不局限于 1 周、1 个月、6 个月、1 年、2 年、3 年或 5 年）或高温如 38℃至 42℃下延长的周期（比如，但不局限于 1 周、2 周、3 周、1 个月、2 个月、3 个月或 6 个月）。在特定实施例中，当制剂在各种湿度条件（包括，但不局限于高达 10％、或高达 20％、或高达 30％、或高达 40％、或高达 50％、或高达 60％、或高达 70％、或高达 80％、或高达 90％、或高达 100％）暴露在光线下或储存在黑暗中时，其储存后维持改善的聚合特性。本领域中应当理解的是术语“环境的”条件通常指温度约为 20℃，相对湿度为 10％至 60％，并暴露在光线下。类似地，温度为约 2℃至 8℃，相对湿度小于 10％，统称为“4℃”或“5℃”，温度为约 23℃至 27℃，相对湿度为约 60％，统称为“23℃”，温度为约 38℃至 42℃，相对湿度为约 75％，统称为“40℃”。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。

[0460] 在特定实施例中，储存在 4℃下至少一个月后，本发明的制剂包括（或作为总分数组成）少于约 3.4E+5 颗粒 /ml 的直径为 2 至 4μm 的颗粒、少于约 4.0E+4 颗粒 /ml 的直径为 4 至 10μm 的颗粒、少于约 4.2E+3 颗粒 /ml 的直径为 10 至 20μm 的颗粒、少于约 5.0E+2 颗粒 /ml 的直径为 20 ～ 30μm 的颗粒、少于约 7.5E+1 颗粒 /ml 的直径为 30 至 40μm 的颗粒、少于约 9.4 颗粒 /ml 的直径为 40 至 60μm 的颗粒，其颗粒直径通过颗粒计数仪测定。在特定实施例中，本发明的液体制剂包括粒径大于 40μm 或大于 30μm 的不可检测颗粒。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。

[0461] 用于测定聚集作用程度和 / 或蛋白质制剂（如，本发明的抗体制剂）中存在的聚集体的类型和 / 或大小的多种方法在本领域中是已知的，所述方法包括，但不局限于，体积排阻色谱法 (SEC)、高效体积排阻色谱 (HPSEC)、静态光散射 (SLS)、傅里叶变换红外分光镜 (FTIR)、圆二色性 (CD)、尿素伸展技术、体内色氨酸荧光、差示扫描量热法和 1- 苯胺 -8- 萘磺酸 (ANS) 蛋白质结合技术。例如，体积排阻色谱法 (SEC) 可基于分子大小进行分离分子，通过使分子经过填充了合适树脂的柱，大分子（如聚集体）将在小分子（如单体）之前洗

脱。分子一般通过280nm的紫外吸收检测，并收集用于进一步鉴定。高压液相色谱柱通常用于SEC分析(HP-SEC)。具体的SEC方法在以下名为“实施例”的章节具体介绍。可选地，可使用分析超速离心(AUC)。AUC是正交技术，其测定液体样品中大分子的沉降系数(Svedberg，S中报导)。如同SEC，AUC能够分离并检测单体中的抗体片段/聚集体，并能够进一步提供分子质量的信息。制剂中的蛋白聚集还可通过使用库尔特计数器的颗粒计数分析或通过使用浊度计的浊度测量表征。浊度是数量的度量单位，溶液中的颗粒散射光，且因此可作为蛋白聚集的通用指标。此外，非还原性聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)或毛细管凝胶电泳(CGE)可以用来表征本发明制剂中的抗体或其片段的聚集和/或断裂状态。

[0462] 在一实施例中，本发明的制剂用于肠胃外给药。在一实施例中，本发明的制剂是注射剂型。在具体实施例中，本发明的制剂适合于静脉、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、皮层内、腹腔内、神经周围、经气管的、皮下、表皮下的、关节内、囊下的、蛛网膜下的、脊柱内、硬膜外和胸骨内的注射和输液。在一实施例中，本发明的制剂用于静脉、皮下或肌肉给药。在一具体实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗IL-6抗体，其中所述制剂用于皮下注射。在一具体实施例中，本发明的制剂包括本发明的抗IL-6抗体，其中所述制剂用于静脉注射。在一具体实施例中，本发明的制剂储存在预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗IL-6抗体。

[0463] 在一实施例中，本发明的制剂用于静脉给药，其中所述制剂包括约1mg/ml至约60mg/ml、约1mg/ml至约50mg/ml、约1mg/ml至约40mg/ml、约10mg/ml至约60mg/ml、约10mg/ml至约50mg/ml、约10mg/ml至约40mg/ml、约20mg/ml至约60mg/ml、约20mg/ml至约50mg/ml、约20mg/ml至约40mg/ml、约30mg/ml至约60mg/ml、约30mg/ml至约50mg/ml或约30mg/ml至约40mg/ml的本发明的抗IL-6抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗IL-6抗体。

[0464] 在一实施例中，本发明的制剂用于神经周的或鞘内给药，其中所述制剂包括约0.01g/ml至约50g/ml、约0.05g/ml至约45mg/ml、约0.1g/ml至约30g/ml、约0.15g/ml至约25g/ml、约0.2g/ml至约20g/ml、约0.25g/ml至约17.5g/ml、约0.5g/ml至约15g/ml、约0.75g/ml至约12.5g/ml、约0.6g/ml至约10g/ml、约1.0g/ml至约8g/ml、约1.25g/ml至约7.5g/ml或约1.5g/ml至约6g/ml的本发明的抗IL-6抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗IL-6抗体。

[0465] 在一实施例中，本发明的制剂用于皮下给药，其中所述制剂包括约1mg/ml至约100mg/ml、约1mg/ml至约150mg/ml、约1mg/ml至约200mg/ml、约25mg/ml至约100mg/ml、约25mg/ml至约150mg/ml、约25mg/ml至约200mg/ml、约50mg/ml至约100mg/ml、约50mg/ml至约150mg/ml、约50mg/ml至约00mg/ml、约75mg/ml至约100mg/ml、约75mg/ml至约150mg/ml或约75mg/ml至约200mg/ml的本发明的抗IL-6抗体。在一具体实施例中，本发明的制剂提供于预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗IL-6抗体。

[0466] 在一实施例中，本发明的制剂用于气溶胶给药。

[0467] 本发明还提供了适合肠胃外施用于人类的药物的单位剂型，其在一合适的容器中包括本发明的抗IL-6抗体制剂。在一实施例中，本发明的药物的单位剂量包括静脉、皮下或肌肉递送本发明制剂的抗IL-6抗体。在另一实施例中，本发明的药物的单位剂量包括气

溶胶递送本发明制剂的抗 IL-6 抗体。在一具体实施例中，本发明的药物的单位剂量包括皮下递送本发明制剂的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，本发明的药物的单位剂量包括气溶胶递送本发明制剂的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，本发明的药物的单位剂量包括鼻内给药本发明制剂的抗 IL-6 抗体。在一实施例中，合适的容器是预充注射器。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0468] 在一实施例中，本发明的制剂提供于密封容器中。在一具体实施例中，本发明的制剂提供于预充注射器中。在一具体实施例中，本发明的制剂包括具有延长的体内半衰期的本发明的抗 IL-6 抗体。

[0469] 本发明还提供了包括本发明制剂的本发明抗 IL-6 抗体的试剂盒。本发明提供了药物组合件或试剂盒，其包括一个或多个装有本发明液体制剂或冻干制剂的容器。在一实施例中，装有本发明液体制剂的容器是预充注射器。在一具体实施例中，本发明的制剂包括与另一个基团重组融合或化学偶联的抗体（包括其抗体片段），另一个基团包括但不局限于，异源蛋白质、异源多肽、异源肽、大分子、小分子、标记序列、诊断或检测剂、治疗性基团、药物基团、放射性金属离子、二级抗体和载体。在一具体实施例中，本发明的制剂制定成无菌液体在单剂量小瓶中。本发明的制剂可能提供与目的体积 1.2ml 的 3cc USP I 型硼硅琥珀色小瓶 (West Pharmaceutical Serices-Part No.6800-0675)。非必要的与这种容器相关可以调控药品或生物制品制造、使用或销售的政府机关规定的形式通知，该通知反应了制造、使用或销售部门对于人类给药的认可。在另一实施例中，本发明的制剂可提供于预充注射器中。

[0470] 在一实施例中，装有本发明液体制剂的容器是预充注射器。本领域技术人员已知的任何预充注射器可能用于本发明液体制剂的结合。可能使用的预充注射器在下列申请中被描述，例如，但不局限于，PCT 公开号为 WO05032627、WO08094984、WO9945985、WO03077976 的申请，美国专利 US6792743、US5607400、US5893842、US7081107、US7041087、US5989227、US6807797、US6142976、US5899889、美国专利公开号为 US20070161961A1、US20050075611A1、US20070092487A1、US20040267194A1、US20060129108A1 的申请。预充注射器可以由各种材料制成。在一实施例中，预充注射器是玻璃注射器。在另一实施例中，预充注射器是塑胶注射器。本领域技术人员应当理解的是用于制造注射器的材料的性质和 / 或质量可能影响储存在注射器中的蛋白质制剂的稳定性。例如，不用说，沉积在注射室内表面的硅润滑剂可能影响蛋白质制剂中的颗粒形成。在一实施例中，预充注射器包括硅润滑剂。在另一实施例中，预充注射器不含有硅润滑剂。本领域技术人员理解的是从注射器管、注射器尖帽、柱塞或瓶塞浸入制剂的少量污染成分也可能影响制剂的稳定性。例如，不用说，在制造过程中引入的钨可能对制剂的稳定性产生不利影响。在一实施例中，预充注射器可能包括高于 500ppb 的钨。在另一实施例中，预充注射器是低钨注射器。在另一实施例中，预充注射器可能包括约 500ppb 至约 10ppb、约 400ppb 至约 10ppb、约 300ppb 至约 10ppb、约 200ppb 至约 10ppb、约 100ppb 至约 10ppb、约 50ppb 至约 10ppb、约 25ppb 至约 10ppb 的钨。

[0471] 制造的产品

[0472] 本发明还包括完成包装和标签的药剂产品。这种制造产品包括合适的导管或容器（如密封的玻璃小瓶、预充注射器或其他容器）中适当的单位剂型。在一实施例中，单位剂

型提供为非溶液的无菌颗粒，其包括适合于肠胃外给药的抗 IL-6 抗体。在另一实施例中，单位剂型提供为无菌冻干粉末，其包括适合于重组的抗 IL-6 抗体。

[0473] 在一实施例中，单位剂型适合于静脉、肌肉、鼻内、口服、外用或皮下递送。因此，本发明包括适合于各种递送途径的无菌溶液。本发明还包括适合于重组的无菌冻干粉末。

[0474] 对于任何药剂产品，包装材料和容器被设计为保护产品保存和运输期间的稳定性。此外，本发明的产品还包括使用说明书或其他信息材料说明，其建议医生、技术人员或患者怎样适当地预防或治疗所述疾病或病症。换言之，制造产品包括说明方法，其指出或建议给药方案，包括，但不局限于，实际剂量、监测程序和其他监测信息。

[0475] 具体地，本发明提供了制造的产品，其包括包装材料，如盒、瓶、管、小瓶、容器、预充注射器、喷雾器、吹药器、静脉注射（i.v.）袋、包封等；和至少一个包含在所述包装材料中的药剂单位剂型，其中所述药剂包括含有抗体的液体制剂。包装材料包括说明方法，其指出如何使用所述抗体以预防、治疗和 / 或处理与疾病或病症相关的一个或多个症状。

[0476] 用于口服给药的药物组合物，如单域抗体分子（如“纳米抗体™”）等也都在本发明中设想。这种口服制剂可能是片剂、胶囊、粉末、液体或半固体形式。片剂可能包括固体载体，如明胶或佐剂。液体药物组合物通常包括液体载体，如水、石油、动植物油、矿物油或合成油。也可以包括生理盐水、葡萄糖或其他糖溶液或二醇类，如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。

[0477] 对于静脉内注射，或在痛苦部位注射，活性成分将以肠胃外可接受的水溶液形式存在，其为无热原并具有合适的 pH、等渗性和稳定性。本领域的相关技术人员能够使用如等渗介质制备合适的溶液，等渗介质如氯化钠注射液、林格氏注射液、乳酸钠林格氏注射液。防腐剂、稳定剂、缓冲液、抗氧化剂和 / 或其他添加剂可根据需要使用，包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸和其他有机酸；抗氧化剂，如抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂（如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵、氯化六烃季铵、苯扎氯铵、苄索氯铵；苯酚、丁基或苯甲基醇；烷基对羟苯甲酸酯，如甲基或丙基对羟苯甲酸酯；儿茶酚；间苯二酚；环己醇；3′ - 戊醇和间甲酚）；低分子量多肽；蛋白质，如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，如甘氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖或其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂如 EDTA；糖，如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；盐形成反离子，如钠；金属配合物（如锌蛋白质复合物）；和 / 或非离子型表面活性剂，如 TWEEN™、PLURONICS™ 或聚乙二醇 (PEG)。

[0478] 本发明的结合元件可根据分子的物理化学性质和递送途径被制成液体、半固体或固体形式。制剂可包括赋形剂，或赋形剂组合物，如糖类、氨基酸和表面活性剂。液体制剂可能包括各种抗体浓度和 pH。固体制剂可能通过低压冻干法、喷雾干燥或超临界流体技术干燥生成的。结合元件的制剂将取决于预期的递送途径，例如，用于肺部递送的制剂可能由具有物理性能的颗粒组成，其保证通过吸入渗透到肺部深处；外用制剂（例如，用于治疗伤疤，如皮肤伤疤）可能包括粘度修饰剂，其延长药物处于作用部位的时间。可制备带有载体的结合元件，所述载体将阻止结合元件快速释放，如可控缓释剂，包括移植物、经皮肤贴剂和微胶囊递送系统。可使用可生物降解、生物相容的聚合物，如乙烯醋酸乙烯酯、聚酐类、聚乙醇酸、胶原、多正酯类和聚乳酸。对于本领域技术人员来说制备这种制剂的许多方法是已知的 (Robinson, J.R.ed., (1978)Sustained and Controlled Release Drug Delivery

Systems, Marcel Dekker, Inc., New York)。

[0479] 可口服地（例如，单域抗体分子（如“纳米抗体™”)），通过注射（例如，皮下、关节内、静脉内、腹膜内、动脉内或肌肉内），通过吸入、气管内，通过囊泡内途径（滴注如膀胱内），或局部地（例如眼内、鼻内、直肠、伤口内、皮肤上）进行治疗。可通过脉冲输液施用治疗，尤其是用于结合组件的下降剂量。给药途径可通过治疗的物理化学特性、通过疾病的特殊条件或通过优化疗效或使副作用最小化的需要确定。一种特定的给药途径是静脉注射。另一种本发明药物组合物的给药途径是皮下注射。据设想，治疗不只限制于在临床使用。因此，使用无针设备的皮下注射是优选的。

[0480] 组合物可能单独地或与其他疗法相结合施用，同时施用或按顺序施用取决于要治疗的情况。

[0481] 本发明的结合元件可作为组合疗法的一部分，与另外的药用成分相结合。联合治疗可用于提供显著的协同效应，特别是本发明的结合元件与一种或几种其他药物的组合。本发明的结合元件可同时地或按顺序地或与另一个治疗剂联合给药，用于治疗一种或几种本文所列举的情况。

[0482] 本发明的结合元件可用作化学感光剂，其能够增加细胞毒性药物的治疗功效，且因此被提供为与一种或多种细胞毒性药物同时地或按顺序地组合给药。结合元件还可用作放射线感光剂，其能改善放射线的疗效，且因此被提供为与放射线相同时地或按顺序地组合给药。

[0483] 根据本发明的结合元件可能被提供为与一种或几种以下制剂相结合或添加一种或几种以下制剂：

[0484] -细胞因子或细胞因子功能的激动剂或拮抗剂（例如，作用于细胞因子信号转导通路的药剂，如 SOCS 系统的调节剂），如 α-、β-和 / 或 γ-干扰素；I 型胰岛素样生长因子 (IGF-1)，其受体和相关结合蛋白；白细胞介素类 (IL)，例如，一种或多种 IL-1 至 IL-33 和 / 或白介素拮抗剂或抑制剂，如阿那白滞素；白介素家族成员的受体抑制剂或这类受体的特定亚基抑制剂，α-肿瘤坏死因子 (TNF-α）抑制剂，如抗 TNF 单克隆抗体（例如英夫利昔单抗、阿达木单抗和 / 或 CDP-870）和 / 或 TNF 受体拮抗剂，例如，免疫球蛋白分子（如依那西普）和 / 或低分子量药剂，如己酮可可碱；

[0485] -B 细胞调节剂，例如靶向 B 淋巴细胞（如 CD20（利妥昔）或 MRA-aIL16R）或 T 淋巴细胞（例如，CTLA4-Ig、HuMax Il-15 或 Abatacept）的单克隆抗体；

[0486] -抑制破骨细胞活性的调节剂，如 RANKL 抗体；

[0487] -趋化因子或趋化因子受体功能的调节剂，如 CCR1、CCR2、CCR2A、CCR2B、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CCR10 和 CCR11 的拮抗剂（用于 C-C 家族）；CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5 和 CXCR6 拮抗剂（用于 C-X-C 家族）；用于 C-X_3-C 家族的 CX_3CR1 拮抗剂；

[0488] -基质金属蛋白酶 (MMPs) 抑制剂，即一种或多种间质溶解素、胶原酶类和明胶酶类及聚蛋白多糖酶，尤其是胶原酶 -1(MMP-1)、胶原酶 -2(MMP-8)、胶原酶 -3(MMP-13)、基质溶素 -1(MMP-3)、基质溶素 -2(MMP-10) 和 / 或基质溶素 -3(MMP-11) 和 / 或 MMP-9 和 / 或 MMP-12，例如，药剂如强力霉素；

[0489] -白三烯生物合成抑制剂、5- 脂肪氧合酶 (5-LO) 抑制剂或 5- 脂肪氧合酶活化蛋

白 (FLAP) 拮抗剂，如积璐琛 ;ABT-761 ;芬留顿 ;替泊沙林 ;Abbott-79175 ;Abbott-85761 ; N-(5- 取代)- 噻吩 -2- 烷基磺酰胺类 ;2,6- 二叔丁基苯酚脲 ;甲氧基四氢吡喃如泽尼卡 ZD-2138 ;化合物 SB-210661 ;吡啶取代 2- 萘甲腈化合物，如 L-739,010 ;2- 氰基喹啉化合物，如 L-746,530 ;吲哚和 / 或喹啉化合物，如 MK-591、MK-886 和 / 或 BAY x1005 ;

[0490] - 白三烯 (LT)B4、LTC4、LTD4 和 LTE4 受体拮抗剂，选自吩噻嗪 -3-1s，如 L-651,392 ; 脒基化合物，如 CGS-25019c ;benzoxalamines，如昂唑司特 ; benzenecarboximidamides，如 BIIL 284/260 ;和化合物，如扎鲁司特、阿鲁司特、孟鲁司特、普仑司特、维鲁司特 (MK-679)、RG-12525、Ro-245913、伊拉司特 (CGP 45715A) 和 BAY x 7195 ;

[0491] - 磷酸二酯酶 (PDE) 抑制剂，如甲基黄嘌呤，例如，茶碱和 / 或氨茶碱 ;和 / 或选择性 PDE 同工酶抑制剂，例如，PDE4 抑制剂和 / 或同工型 PDE4D 抑制剂和 / 或 PDE5 抑制剂 ;

[0492] -1 型组胺受体拮抗剂，如西替立嗪、氯雷他定、地氯雷他定 (抗过敏性鼻炎的新药)、非索非那定、阿伐斯汀、特非那定、阿司咪唑、氮卓斯汀、左卡巴司汀、氯曲米通、异丙嗪、苯甲嗪和 / 或咪唑拉汀 (通常口服、局部地或肠道外使用) ;

[0493] - 质子泵抑制剂 (如奥美拉唑) 或 2 型保护胃的 (gastroprotective) 组胺受体拮抗剂 ;

[0494] -4 型组胺受体拮抗剂 ;

[0495] - α 1/α 2 肾上腺素能受体激动剂血管收缩剂拟交感神经剂，如六氢脱氧麻黄碱、苯肾上腺素、苯丙醇胺、麻黄碱、假麻黄碱、盐酸萘唑啉、盐酸羟甲唑啉、盐酸四氢萘咪唑啉、盐酸丁苄唑啉、盐酸萘胺唑啉和盐酸丁肾素 ;

[0496] - 抗胆碱能剂，例如蕈毒碱受体 (M1、M2 和 M3) 拮抗剂，如阿托品、东莨菪碱、格隆铵、异丙托溴铵、噻托溴铵、氧托溴铵、哌仑西平和替伦折平 ;

[0497] -β - 肾上腺素能受体激动剂 (包括 β - 受体亚型 1-4)，如异丙基肾上腺素、舒喘宁、福莫特罗、沙美特罗、间羟叔丁肾上腺素、间羟异丙肾上腺素、双甲苯喘定甲磺酸盐和 / 或吡布特罗，例如其手性异构体 ;

[0498] - 色酮，例如咳乐钠和 / 或奈多罗米钠 ;

[0499] - 糖皮质激素，如氟尼缩松、氟羟脱氢皮质甾醇丙酮化合物、二丙酸倍氯米松、布地缩松、氟替卡松丙酸盐、环索奈德和 / 或糠酸莫米他松 ;

[0500] - 调节核激素受体的药剂，如 PPAR ;

[0501] - 免疫球蛋白 (Ig) 或 Ig 制剂或调节 Ig 功能的拮抗剂或抗体，如抗 IgE(例如，奥马佐单抗) ;

[0502] - 其他系统或局部使用的抗炎症药剂，例如，酞咪哌啶酮或其衍生物，类维生素 A、蒽三酚和 / 或卡泊三醇 ;

[0503] - 氨基水杨酸盐和磺胺嘧啶的组合物，如水扬酸偶氮磺胺吡啶、5- 氨基水杨酸、巴柳氮和偶氮水杨酸 ;及免疫调节剂，如 thiopurines ;及皮质甾类，如布地缩松 ;

[0504] - 抗菌剂，例如，青霉素衍生物、四环素、大环内酯物、β - 内酰胺、氟喹诺酮、甲硝哒唑和 / 或吸入氨基糖苷类 ;和 / 或抗病毒剂，例如，阿昔洛韦、泛昔洛韦、瓦拉西洛维、更昔洛韦、西多福韦 ;氨基三环癸烷、金刚烷乙胺 ;病毒唑和 / 或沙喹那韦 ;核苷逆转录酶抑制剂，如地达诺新、拉米夫定、脱氧胸苷、扎西他滨、叠氮胸腺 ;非核苷逆转录酶抑制剂，如奈韦

拉平、依法韦仑；

[0505] -心血管剂，如钙通道阻滞剂、β-受体阻滞剂、血管紧张素转换酶（ACE）抑制剂、血管紧张肽-2受体拮抗剂；降脂药物，如抑制素和/或非诺贝特；血细胞形态调节剂，如己酮可可碱；溶解血栓剂和/或抗凝血剂，例如血小板聚集抑制剂；

[0506] -CNS药剂，如抗抑郁剂（如舍曲林）、抗帕金森药物（如苄甲炔胺、左旋多巴、罗平尼咯、普拉克索；MAOB抑制剂，如司来吉兰和雷沙吉兰；comP抑制剂，如托卡朋；A-2抑制剂、多巴胺再摄取抑制剂；NMDA拮抗剂、尼古丁拮抗剂、多巴胺拮抗剂和/或神经型一氧化氮合酶抑制剂）和抗老年痴呆症的药物，如多奈哌齐、利凡斯的明、塔克林、COX-2抑制剂、丙戊茶碱或美曲膦脂；

[0507] -用于治疗急性和慢性疼痛的药剂，例如，中心或外周作用的镇痛剂，如类鸦片类似物或衍生物、酰胺咪嗪、苯妥英、丙戊酸钠、阿米替林或其他抗抑郁剂、扑热息痛、或非甾体抗炎症药剂；

[0508] -肠胃外或局部使用（包括吸入）的局部麻醉剂，如利多卡因或其类似物；

[0509] -抗骨质疏松剂，例如，激素药物、如雷洛昔芬、或双磷酸脂，如二膦酸盐；

[0510] -(i)类胰蛋白酶抑制剂；(ii)血小板活化因子(PAF)拮抗剂；(iii)白介素转换酶(ICE)抑制剂；(iv)IMPDH抑制剂；(v)粘着分子抑制剂包括VLA-4拮抗剂；(vi)组织蛋白酶；(vii)激酶抑制剂，如酪氨酸激酶抑制剂（如Btk、Itk、Jak3MAP抑制剂可包括吉非替尼、伊马替尼、甲磺酸盐），丝氨酸/苏氨酸激酶（例如，MAP激酶抑制剂，如p38、JNK、蛋白激酶A、B、C和IKK），或细胞周期调控中涉及的激酶（例如，细胞周期蛋白依赖激酶）；(viii)葡萄糖-6磷酸脱氢酶抑制剂；(ix)激肽-B_1和/或B2-受体拮抗剂；(x)抗痛风剂，例如，秋水仙素；(xi)黄嘌呤氧化酶抑制剂，例如，别嘌呤醇；(xii)促尿酸尿剂，例如，羧苯磺丙胺、苯磺唑酮和/或苯溴香豆酮；(xiii)生长激素促分泌素；(xiv)转化生子因子(TGFβ)；(xv)血小板衍生生长因子(PDGF)；(xvi)成纤维细胞生长因子，例如，碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)；(xvii)粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)；(xviii)辣椒素霜；(xix)速激肽NK_1和/或NK_3受体拮抗剂，如NKP-608C、SB-233412(他奈坦)和/或D-4418；(xx)弹性蛋白酶抑制剂，例如，UT-77和/或ZD-0892；(xxi)TNF-α转换酶抑制剂(TACE)；(xxii)诱导型一氧化氮合成酶(iNOS)抑制剂或(xxiii)TH2细胞表达的趋化因子受体的同源分子（如CRTH2拮抗剂）；(xxiv)P38抑制剂；(xxv)Toll样受体(TLR)功能调节剂和(xxvi)调节嘌呤受体活性的药剂，如P2X7；(xxvii)转录因子激活抑制剂，如NFkB、API和/或STATS。

[0511] 抑制剂可以是特定的或混合的抑制剂，例如，靶向多个上述提到的分子（例如受体）或分子种类的抑制剂。

[0512] 结合元件还可用作与化疗剂或其他酪氨酸激酶抑制剂结合联合给药或以免疫偶联物的形式存在。所述抗体的片段还可用于通过重组机制或生化耦合获得的双特异性抗体，然后使上述抗体的特异性与其他抗体的特异性相关联，其他抗体能够识别其他涉及IL-6相关活性的分子。

[0513] 用于治疗炎症性疾病，本发明的结合元件可以与一种或多种药剂结合，如非甾体抗炎药物（下文中为NSAID），其包括非选择性环加氧酶(COX)-1/COX-2抑制剂，可局部地或全身地使用，如吡罗昔康、双氯高灭酸、丙酸，如甲氧萘丙酸、氟联苯丙酸、苯氧苯丙酸、苯酮苯丙酸和异丁苯丙酸、灭酸酯类，如甲灭酸、茚甲新、阿扎丙酮、吡唑啉酮，如苯基丁氮酮、水

杨酸盐，如阿斯匹林；选择性 COX-2 抑制剂（如美洛昔康、塞来考昔、罗非考昔、伐地考昔、罗美昔布 (lumarocoxib)、帕瑞考昔和艾托考昔）；环加氧酶抑制一氧化氮供体 (CINOD)；糖皮质激素（通过局部地、口服、肌肉内、静脉内或关节内途径给药）；甲氨蝶呤、来氟米特；羟化氯喹、D- 青霉胺、金诺芬或其他注射或口服金色制剂；镇痛剂；双醋瑞因；关节内治疗，如透明质酸衍生物；和营养补充剂，如葡糖胺。

[0514] 本发明的结合元件还可与用于癌症治疗的现有治疗剂相联合使用。用于联合的合适药剂包括：

[0515] (i) 用于内科肿瘤学的抗增殖 / 抗肿瘤药及其组合物，如 Gleevec（甲磺酸伊马替尼）、烷化剂（例如顺铂、卡铂、环磷酰胺、氮芥、苯丙氨酸氮芥、苯丁酸氮芥、白消安和亚硝基脲）；抗代谢物（例如抗叶酸物，如氟尿嘧啶，比如 5- 氟尿嘧啶和喃氟啶、雷替曲塞、甲氨蝶呤、阿糖胞苷、羟基脲、吉西他滨和紫杉酚）；抗肿瘤抗生素（例如蒽环类，如阿霉素、博来霉素、链霉素、道诺霉素、表柔比星、去甲氧正定霉素、丝裂霉素 C、放线菌素 D 和光神霉素）；抗有丝分裂剂（例如长春花生物碱，如长春新碱、长春花碱、去乙酰长春酰胺和长春瑞滨，及紫杉化合物，比如烷类紫杉酚和泰索帝）；及拓扑异构酶抑制剂（例如表鬼臼毒素，比如表鬼臼毒素吡喃葡糖苷和表鬼臼毒噻吩糖苷、安吖啶、托泊替康和喜树碱衍生物）；

[0516] (ii) 抑制细胞生长剂，如抗雌激素药（例如他莫昔芬、托瑞米芬、雷洛昔芬、屈洛昔芬和 iodoxyfene），雌激素受体负调节剂（例如氟维司群），抗雄激素物质（例如比卡鲁胺、氟他米特、尼鲁米特和环丙氯地孕酮），LHRH（促黄体激素 - 释放激素）拮抗剂或 LHRH 激动剂（例如戈舍瑞林、亮丙瑞林和乙基酰胺），孕激素类（例如醋酸甲地孕酮），芳香化酶抑制剂（例如阿纳托唑、来曲唑、伏氯唑和依西美坦）及 5α - 还原酶抑制剂，如非那司提；

[0517] (iii) 抑制癌症细胞侵染的药剂（例如金属蛋白酶抑制剂，比如马马司他和尿激酶纤溶酶原激活剂受体功能抑制剂）；

[0518] (iv) 生长因子功能抑制剂，例如这种抑制剂包括生长因子抗体、生长因子受体抗体（例如抗 erbb2 抗体曲妥单抗和抗 erbb1 抗体西妥昔单抗 [C225]）、法尼基转移酶抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂和丝氨酸 / 苏氨酸激酶抑制剂，例如表皮生长因子家族抑制剂（例如 EGFR 家族酪氨酸激酶抑制剂，如 N-(3- 氯 -4- 氟苯基)-7- 甲氧基 -6-(3- 吗啉代丙氧基) 喹唑啉 -4- 胺（吉非替尼，AZD1839）、N-(3- 乙炔基苯基)-6,7- 二 (2- 甲氧乙氧基) 喹唑啉 -4- 胺（厄洛替尼，OSI-774）和 6- 丙烯酰胺基 -N-(3- 氯 -4- 氟苯基)-7-(3- 吗啉代丙氧基) 喹唑啉 -4- 胺 (CI 1033)），例如血小板衍生生长因子家族抑制剂和例如肝细胞生长因子家族抑制剂；

[0519] (v) 抗血管生成剂，如那些抑制血管内皮生长因子作用的药剂（例如抗血管内皮细胞生长因子抗体贝伐单抗，如国际专利申请 WO 97/22596、WO 97/30035、WO 97/32856 和 WO 98/13354 中公开的化合物，它们的全部内容通过引用并入本文）和通过其他机制作用的化合物（例如利诺胺、整联蛋白 αvβ3 功能抑制剂和厄洛替尼）；

[0520] (vi) 血管损伤剂，如考布他汀 A4 和国际专利申请 WO 99/02166、WO 00/40529、WO 00/41669、WO 01/92224、WO 02/04434 和 WO 02/08213 中公开的化合物（它们的全部内容通过引用并入本文）；

[0521] (vii) 反义疗法，例如直接作用于上面列举靶标的那些，如 ISIS2503、抗 ras 反义；

[0522] (viii)基因治疗方法，包括例如替换异常基因的方法，如异常p53或异常BRCA1或BRCA2、GDEPT(基因定向的酶前药治疗)方法，如使用胞嘧啶脱氨酶、胸苷激酶或细菌硝基还原酶的方法及增加患者对化疗或放疗耐受力的方法，如多药耐药基因疗法；及

[0523] (ix)免疫疗法，例如提高患者肿瘤细胞免疫原性的体外和体内方法，如细胞因子转染，如白介素2、白介素4或粒细胞巨噬细胞集落刺激因子，减少T-细胞无反应性的方法，使用转染免疫细胞的方法，如细胞因子-转染的树突状细胞，使用细胞因子转染肿瘤细胞株的方法和使用抗个体遗传型抗体的方法。

[0524] 本发明结合元件和一个或多个以上其他药用成分可用于药剂的生产。药剂可能单独或联合地施用于个体，且因此可以包括结合元件和其他成分作为组合的制剂或独立的制剂。独立的制剂可用于促进单独的和顺序的或同时的给药，并允许成分通过不同途径给药，例如口服或肠胃外给药。

[0525] 根据本发明，提供的组合物可以施用于哺乳动物。通常以“治疗上有效量”施用，这足以说明对患者有利。这种益处可以是改善至少一种症状。实际给药量和给药速度及时间过程将取决于治疗的疾病的性质和严重程度、治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床情况、疾病起因、组合物递送的位置、结合元件的类型、给药方法、给药进度和医师知道的其他因素。治疗处方，如剂量等决定，是全科医生和其他医生负责的，且取决于治疗的疾病的症状和/或进展的严重程度。适当剂量的抗体在本领域是众所周知的(Ledermann J.A. 等.(1991)Int.J.Cancer 47:659-664;Bagshawe K.D. 等.(1991)Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4:915-922)。还可使用对于施用药剂类型合适的本文中指出的或Physician′s Desk Reference(2003)中的具体剂量。通过比较动物模型体外活性和体内活性确定本发明的结合元件的治疗上有效量或合适剂量。通过小鼠和其他试验动物的有效剂量推测人类的有效剂量的方法是已知的。精确剂量将取决于许多因素，包括抗体是用于诊断、预防或治疗、治理区域的大小和位置、抗体(例如，整个抗体、片段或双特异抗体)的确切性质及任何可检测标记及其他附着抗体的分子的性质。全身性应用的典型的抗体剂量为100μg至1g，局部性应用的典型的抗体剂量为1μg至1mg。可施用初始的高负荷剂量，后面是一个或多个低剂量。通常地，抗体是整个抗体，例如，IgG1同型。这是成年患者的有效治疗剂量，用于儿童或婴儿时可成比例地调整，且还可以分子量比例调整其他抗体形式。根据医生的决定，治疗可每日重复、每周两次、每周或每月一次。治疗可以是每2至4周皮下注射给药和每4至8周静脉注射给药。治疗可以是周期性的，且给药周期约为2周或更长时间，例如约3周或更长时间、约4周或更长时间、或约一个月一次。治疗可在外科手术之前和/或之后进行，和/或直接在外科手术治疗解剖部位给药时应用。

[0526] 与sIL-6Ra抗体相比较，本发明的IL-6结合元件就剂量和给药需求而言可能具有优势。如本文中其他地方所述，疾病中IL-6的循环水平明显低于sIL-6Ra的循环水平。因此，IL-6结合元件的使用，与抗IL-6R结合元件相反，其在生产的药物数量方面具有明显优势，用于患者的剂量可能更低。而且如果抗IL6治疗剂剂量较低，其在低剂量促进皮下注射及静脉注射方面有明显优势。本领域技术人员众所周知的是，皮下给药可受限于结合元件数量，如抗体分子，需要的每次剂量。这是由于皮下注射受限于能够注入皮肤一个位点的量。通常使用的皮下注射量为1.2ml或更少。由于可能增加制成用于皮下注射的浓度大于

50mg/ml 的结合元件的难度，通过这种途径的大于 100mg 的剂量通常需要多次注射及患者的多次不适感。

[0527] 进行低剂量抗 IL-6 治疗可能还需要较低“负荷”剂量的抗体以抑制所有全身的 IL-6 相比较于较高浓度的全身的 sIL-6Ra。

[0528] 另外的优点可能与目标 IL-6 而不是 IL-6 受体相关，表现出本发明的结合原件与用于 IL-6Ra 的结合元件相比较的其他优势。

[0529] 例如，有文献报道示出疾病中 IL-6 的循环水平明显低于 sIL-6Ra 的循环水平 (Desgeorges 等，(1997)J.Rheumatol 24 :1510 ;Yokota 等，(2005)Arth & Rheum 52(3) : 818-25)。由于 sIL-6R 的水平明显高于 IL-6 的水平，相比较于中和 IL-6 所需要的抗 IL-6 结合元件的数量，可能需要更多的抗 sIL-6R 结合元件中和 sIL-6Ra。因此，如果使用抗受体组合元件，可能需要低剂量的抗配体组合元件。

[0530] 靶向 IL-6 配体而不是 IL-6 受体可减少疾病中 IL-6 的水平，但仍然允许感染期间增加 IL-6 的水平，其中 IL-6 上调作为免疫应答的一部分。

[0531] Kawano 等 (Nature(1988)332 :83) 示出了 IL-6 是有效的生长因子并示出了从患者新分离的骨髓瘤细胞产生 IL-6 并表达其受体。而且，抗 IL-6 抗体抑制骨髓瘤细胞的体外生长。这是自分泌环作用于人体骨髓瘤诱发肿瘤形成的直接证据。在这个研究之后，Van Zaanen 等 (J.Clin.Invest.(1996)98 :1441-1448) 证明当用抗 IL-6 配体抗体治疗时，多发性骨髓瘤患者中 IL-6 的产生量下降。

[0532] 大量的进一步研究示出了 IL-6 包含于其他细胞类型的自分泌反馈环中，如平滑肌细胞 (SMC)(Klouche 等，(1999)J.Immunol.163(8)4583-9)、U373-MG 星形神经胶质瘤细胞 (Oh 等，(2001)J.Immunol.166 :2695-704)、3T3 脂肪细胞 (Fasshauer 等，(2003) Horm.Metab.Res.35(3)147-52)、神经细胞 (Marz 等，(1998)Proc.Natl.Acad.Sci USA 95(6)3251-6)、内皮细胞 (Modur 等，(1997)J.Clin.Invest.100(1)2752-6) 和卡波西氏肉瘤细胞 (Murakami-Morl 等，(1996)Cell Growth Differ.7(12)1697-703)。因此，在疾病中使用抗 IL6 结合组件的 IL-6 抑制作用可导致 IL-6 在基础疾病中的产生量下降。

[0533] 此外，抗 IL-6 结合元件在体循环中与 IL-6 结合，相反地结合元件与 IL-6 受体结合，IL-6 受体需要穿透组织以使受体位于细胞表面，该细胞涉及将治疗疾病的病理。

[0534] IL-6 结合元件可以在体循环中与 IL-6 形成平衡，跨越屏障（例如滑膜）引起梯度效应，其具有从连接处去除活性 IL-6 并与结合元件形成非活性复合物的净效应。因此，相比较于 IL-6R 结合元件，IL-6 结合元件可能更快地开始，且给药方案可能不同并更易于优化。

[0535] IL-6 信号通过 IL-6 与 IL-6R 结合调节，且该复合物与 gp130 结合。考虑到 IL-6 与 IL-6Ra 结合是纳摩尔浓度的亲和性（约 5nM)，IL6:IL6R 复合物与 gp130 结合是皮摩尔浓度的亲和性，靶向 IL-6 的结合元件面对低量的用于 IL-6 结合的竞争物，所以可抑制较大比例的 IL-6 信号转导。虽然这也可应用于靶向溶解性 IL-6Ra 的结合元件并阻止 IL-6:IL-6Ra 复合物形成，但如果 IL-6Ra 与膜结合，由于空间限制，其可能更难与抗 IL-6Ra 结合并抑制存在于膜上的 IL-6Ra。

[0536] 本发明提供了预防、治疗和 / 或处理疾病的方法，例如，与 IL-6 异常表达和 / 或活性相关的疾病或以此为特征的疾病，与 IL-6 受体异常表达和 / 或活性相关的疾病，自身免

疫性疾病、炎症疾病、增生性疾病、感染及通过向受体施用有效量本发明组合物的一个或多个症状。各种递送系统是已知的且能够用于施用本发明的组合物或预防剂或治疗剂。施用本发明组合物或治疗剂（例如，预防剂或治疗剂）的方法包括，但不局限于肠胃外给药（如皮内、肌肉内、腹膜内、静脉周围神经和皮下）、硬膜外给药、局部给药和粘膜给药（例如，但不局限于，鼻内和口服给药）。在一具体实施例中，本发明的组合物是肌肉、静脉或皮下给药的。在一实施例中，本发明的组合物是皮下给药的。制剂可通过任何方便的途径给药，例如通过输液或大剂量注射，通过上皮或粘膜吸收（例如，口腔粘膜、直肠和肠粘膜等），且可以与其他生物活性剂一起施用。给药可能是全身性的或局部的。

[0537] 本发明还提供了将本发明的组合物封装在一个密封的密闭容器中，如标示抗体（包括抗体及其片段）数量的安瓿瓶或 sachette。在一实施例中，本发明的组合在标示抗体（包括抗体及其片段）数量和浓度的密封的密闭容器中。在一实施例中在密封的密闭容器中提供本发明的组合物，并包括约 10mg/ml、约 15mg/ml、约 20mg/ml、约 30mg/ml、约 40mg/ml、约 50mg/ml、约 60mg/ml、约 70mg/ml、约 80mg/ml、约 90mg/ml、约 100mg/ml、约 150mg/ml、约 175mg/ml、约 200mg/ml、约 250mg/ml 或约 300mg/ml 的抗体（包括抗体及其片段），该抗体与 IL-6 特异性结合，数量为约 1ml、约 2ml、约 3ml、约 4ml、约 5ml，6 约 ml、约 7ml、约 8ml、约 9ml、约 10ml、约 15ml 或约 20ml。在本发明一具体实施例中，在密封的密闭容器中提供本发明的组合物，并包括至少约 15mg/ml、至少约 20mg/ml、至少约 25mg/ml、至少约 50mg/ml、至少约 100mg/ml、至少约 150mg/ml、至少约 175mg/ml、至少约 200mg/ml、至少约 250mg/ml 或至少约 300mg/ml 的抗体（包括抗体及其片段），该抗体与用于静脉注射的 IL-6（例如，但不局限于，抗体 18E）特异性结合，和至少约 15mg/ml、至少约 20mg/ml、至少约 50mg/ml、至少约 80mg/ml、至少约 100mg/ml、至少约 150mg/ml、至少约 175mg/ml、至少约 200mg/ml、至少约 250mg/ml 或至少约 300mg/ml 的抗体（包括抗体及其片段），该抗体与用于重复皮下给药的 IL-6（例如，但不局限于，抗体 18E）特异性结合。

[0538] 本发明组合物在预防、治疗和 / 或处理与 IL-6 异常表达和 / 或活性相关的疾病或以此为特征的疾病、与 IL-6 受体或其一个或多个亚基的异常表达和 / 或活性相关或以此为特征的疾病、自身免疫性疾病、移植排异、移植物抗宿主病，或其一种或多种症状的有效数量通过本领域众所周知的或本文中描述的标准临床技术确定。使用的组合物的精确剂量还取决于给药途径、炎症疾病或自身免疫性疾病的严重程度，而且还应该根据医生的判断和每个患者的情况决定。有效剂量可通过源于体外或动物模型试验系统的剂量 - 反应曲线推测。

[0539] 因为本发明包括抗体组合物，施用于患者的剂量可使用患者体重 (kg) 乘以将施用的剂量 (mg/kg) 计算。然后通过用所需的剂量 (mg) 除以抗体制剂的浓度确定所需的体积 (ml)。通过将对于用注射器施用本发明的抗体制剂必要的多个小瓶的内容物合并获得最终计算的所需的体积。可在每个位点注射最大体积为 2.0ml 的抗体制剂。使用以下公式计算剂量 (ml)：剂量 (mL) ＝ [志愿者体重](kg)x[剂量]mg/kg÷100mg/mL 抗体制剂。本发明的抗体在人体内具有延长的半衰期。因此，低剂量的本发明抗体和低频率给药通常是可能的。此外，可以通过增加组合物中抗体的浓度、增加抗体的亲和性和 / 或亲抗原性而降低本发明组合物的剂量、给药体积和给药频率。

[0540] 在一具体实施例中，施用于患者的剂量可使用患者体重 (kg) 乘以将施用的剂量

(mg/kg) 计算。然后通过用所需的剂量 (mg) 除以制剂中 (100mg/mL) 抗体 (包括抗体及其片段) 的浓度确定所需的体积 (ml)。通过将对于用注射器施用药物必要的多个小瓶的内容物合并获得最终计算的所需的体积。可在每个位点注射最大体积为 2.0ml 的制剂中的抗体 (包括抗体及其片段)。

[0541] 在一具体实施例中,将本发明的组合物中 IL-6(例如,但不局限于,1 抗体 18E) 与 IL-6 特异性结合的 0.1 ～ 20mg/kg/ 周、1 ～ 15mg/kg/ 周、2 ～ 8mg/ 周、3 ～ 7mg/kg/ 周、或 4 ～ 6mg/kg/ 周的抗体 (包括抗体及其片段) 施用于患有炎症疾病或自身性免疫疾病的患者。在另一实施例中,将一倍或多倍剂量的本发明组合物预防上或治疗上的有效量施用于患者,其中预防上或治疗上有效量对于每个剂量是不同的。

[0542] 在一实施例中,本发明的组合物以以下给药方案施用,所述给药方案使 IL-6 特异性抗体的血浆浓度维持在理想水平 (例如,约 0.1 ～ 100μg/ml),其连续阻断 IL-6 活性。在一具体实施例中,抗体的血浆浓度维持在约 0.2μg/ml、约 0.5μg/ml、约 1μg/ml、约 2μg/ml、约 3μg/ml、约 4μg/ml、约 5μg/ml、约 6μg/ml、约 7μg/ml、约 8μg/ml、约 9μg/ml、约 10μg/ml、约 15μg/ml、约 20μg/ml、约 25μg/ml、约 30μg/ml、约 35μg/ml、约 40μg/ml、约 45μg/ml 或约 50μg/ml。患者的理想血浆浓度将根据许多因素变化,包括但不局限于,疾病或病症的性质、疾病或病症的严重程度和患者的情况。这种给药方案对于慢性疾病或病症的预防、治疗和 / 或处理是特别有益的。

[0543] 在具体实施例中,间接施用特异于 IL-6 且包括共轭抗体 (包括抗体及其片段) 的本发明组合物。本文中使用的“共轭抗体或抗体片段”是指与另一个基团共轭或融合的抗体 (包括抗体及其片段),另一个基团包括但不局限于,异源肽、多肽、另一个抗体 (包括抗体及其片段)、标记序列、诊断剂、聚合物、蛋白素和载体。

[0544] 在另一实施例中,将一倍或多倍剂量的抗体的预防上或治疗上的有效量施用于人类患者,该抗体与本发明组合物中 IL-6(例如,但不局限于,抗体 18E) 特异性结合,其中施用于所述患者的本发明组合物中抗体的预防上或治疗上有效剂量在治疗过程中是逐渐增加的,如约 0.01μg/kg、约 0.02μg/kg、约 0.04μg/kg、约 0.05μg/kg、约 0.06μg/kg、约 0.08μg/kg、约 0.1μg/kg、约 0.2μg/kg、约 0.25μg/kg、约 0.5μg/kg、约 0.75μg/kg、约 1μg/kg、约 1.5μg/kg、约 2μg/kg、约 4μg/kg、约 5μg/kg、约 10μg/kg、约 15μg/kg、约 20μg/kg、约 25μg/kg、约 30μg/kg、约 35μg/kg、约 40μg/kg、约 45μg/kg、约 50μg/kg、约 55μg/kg、约 60μg/kg、约 65μg/kg、约 70μg/kg、约 75μg/kg、约 80μg/kg、约 85μg/kg、约 90μg/kg、约 95μg/kg、约 100μg/kg 或约 125μg/kg。

[0545] 在另一实施例中,将一倍或多倍剂量的抗体的预防上或治疗上的有效量施用于受体 (如人类),该抗体与本发明组合物中 IL-6(例如,但不局限于,抗体 18E) 特异性结合,其中施用于所述对象的本发明组合物中抗体的预防上或治疗上有效剂量在治疗过程中是逐渐减少的,如约 0.01μg/kg、约 0.02μg/kg、约 0.04μg/kg、约 0.05μg/kg、约 0.06μg/kg、约 0.08μg/kg、约 0.1μg/kg、约 0.2μg/kg、约 0.25μg/kg、约 0.5μg/kg、约 0.75μg/kg、约 1μg/kg、约 1.5μg/kg、约 2μg/kg、约 4μg/kg、约 5μg/kg、约 10μg/kg、约 15μg/kg、约 20μg/kg、约 25μg/kg、约 30μg/kg、约 35μg/kg、约 40μg/kg、约 45μg/kg、约 50μg/kg、约 55μg/kg、约 60μg/kg、约 65μg/kg、约 70μg/kg、约 75μg/kg、约 80μg/kg、约 85μg/kg、约 90μg/kg、约 95μg/kg、约 100μg/kg 或约 125μg/kg。

[0546] 抗体半衰期

[0547] 在特定实施例中，本发明组合物和方法的抗 IL-6 抗体的半衰期至少约 10 天。在特定实施例中，本发明组合物和方法的抗 IL-6 抗体的平均半衰期至少约 20 至 40 天、25 至 40 天、26 至 40 天、20 至 30 天、25 至 30 天、26 至 30 天或 26 至 29 天。在另一个实施例中，本发明组合物和方法的抗 ICOS 抗体的半衰期能达到约 50 天。在特定实施例中，本发明组合物和方法的抗体的半衰期能通过本领域已知方法延长。这种延长能转而减少抗体组合物给药的量和 / 或次数。改善体内半衰期的抗体和制备他们的方法在美国专利号 6,277,375 及国际公开号 WO 98/23289 和 WO 97/3461 的申请中公开。

[0548] 通过使惰性聚合物分子（如高分子量聚乙二醇 (PEG)）附加到带有或不带有多功能连接子的抗体上，通过 PEG 与抗体的 N- 末端或 C- 末端位点特异性共轭，或通过存在于赖氨酰残基上的氨基，可以延长体内抗 IL-6 抗体的血清循环。将使用引起生物活性最少损失的直链或支链聚合物衍生物。可通过 SDS-PAGE 和质谱准确监测共轭程度以保证 PEG 分子与抗体的适当的共轭。可通过尺寸排阻和离子交换层析将未反应的 PEG 从抗体 -PEG 共轭物中分离。可使用本领域技术人员已知的方法（例如本文所述的免疫测定法），测定 PEG- 衍生抗体的结合活性及体内疗效。

[0549] 此外，本发明组合物和方法的抗体可与白蛋白共轭，以得到更稳定或更长的体内半衰期的抗体。这些技术在本领域是众所周知的，例如，参见国际公开号 WO 93/15199、WO 93/15200 和 WO 01/77137 ；及欧洲专利号 EP 413,622 的申请，它们的全部内容通过引用并入本文。

[0550] 另外，变种 Fc 区域能赋予抗体延长的体内半衰期已被描述（见美国专利号 US2003/0190311 A1）。设想使用具有延长的体内半衰期的 Fc 区域与本发明的组合物和方法相结合。在一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括具有延长的体内半衰期的 Fc 区域。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括 Fc 区域，其包括至少一个氨基酸残基取代，所述氨基酸残基选自残基 252、254 和 256，其中氨基酸残基的位置根据 EU 惯例确定。在一具体实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括 Fc 区域，其包括至少一个氨基酸残基取代，所述氨基酸残基选自 M252Y、S254T 和 T256E，其中氨基酸残基位置根据 EU 惯例确定。在另一实施例中，本发明的抗 IL-6 抗体包括 Fc 区域，其包括至少一个氨基酸残基，氨基酸残基选自 252 位处的 Y、254 位处的 T 和 256 位处的 E，其中氨基酸残基位置根据 EU 惯例确定。

[0551] Fc 变体

[0552] 本发明提供包括变体 Fc 区域的抗 IL-6 抗体。即为非自然产生的 Fc 区域，例如包括一个或多个非自然产生的氨基酸残基的 Fc 区域。本发明变体 Fc 区域还包括那些包括氨基酸缺失、添加和 / 或修饰的 Fc 区域。

[0553] 应当理解的是，本文中使用的 Fc 区域包括多肽，其包括抗体的恒定区域但排除第一恒定区域免疫球蛋白结构域。因此，Fc 是指 IgA、IgD 和 IgG 的最后两个恒定区域免疫球蛋白结构域，IgE 和 IgM 的最后三个恒定区域免疫球蛋白结构域，及这些结构域的柔性铰链 N- 末端。对于 IgA 和 IgM，Fc 可能包括 J 链。对于 IgG，Fc 包括免疫球蛋白结构域 Cgamma2 和 Cgamma3（C γ 2and C γ 3）及 Cgamma1（C γ 1）和 Cgamma2（C γ 2）之间的铰链。虽然 Fc 区域的边界可能改变，但人类 IgG 重链 Fc 区域通常确定为其羧基末端包括 C226 或 P230 残基，其中编号是依据 EU 索引如 Kabat 等 (1991，NIH Publication 91-3242，National Technical

Information Service,Springfield,VA)。“Kabat 中列出的 EU 索引”是指如上文 Kabat 等中描述的人类 IgG1 EU 抗体的残基编号。Fc 可指单独的这个区域,或在抗体、抗体片段或 Fc 融合蛋白背景下的这个区域。Fc 变体蛋白可以是抗体、Fc 融合或包括 Fc 区域的任何蛋白或蛋白结构域,其包括,但不局限于,包括变种 Fc 区域的蛋白,其为非自然产生的 Fc 变体。(注 :在大量 Fc 位置观察到多态现象,该位置包括,但不局限于 Kabat 270、272、312、315、356 和 358。因此在当前序列与之前领域中的序列之间可能存在微小差异。)

[0554] 本发明包括 Fc 变体蛋白,相对于可比分子(具有相同的氨基酸序列但不具有野生型 Fc 区域的蛋白质),具有关于 Fc 配体(例如,Fc 受体,C1q)的改变的结合性质。结合性质的例子包括,但不局限于,结合特异性、平衡解离常数 (K_D)、离解率和结合率(各自的 k_{off} 和 k_{on}),结合亲和性和 / 或亲抗原性。通常认为具有低 K_D 的结合分子(例如,Fc 变体蛋白如抗体)可能优选具有高 K_D 的结合分子。然而,在某些情况下,k_{on} 或 k_{off} 值可能比 K_D 值更相关。本领域技术人员能够确定对于给定抗体哪个动力学参数是最重要的。

[0555] Fc 结构域对于其配体的亲和性和结合属性可能通过许多在本领域已知的用于确定 Fc-FcγR 反应的体外试验方法(生物化学或免疫学试验)确定,例如,Fc 区域与 FcγR 的特异性结合,包括但不局限于,平衡方法(例如,酶联免疫吸附试验 (ELISA) 或放射免疫法 (RIA))、或动力学(例如 BIACORE ®分析)和其他方法如间接结合试验、竞争性抑制实验、荧光共振能量转移 (FRET)、凝胶电泳和色谱法(例如凝胶过滤)。这些和其他的方法可使用标记一个或多个待检验的组分和 / 或使用多种检测方法,包括但不局限于,显色、荧光、发光或同位素标记。结合亲和性和动力学的详细描述可在基础免疫学 (Paul,W.E.,ed., Fundamental Immunology,4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia(1999)) 中找到,其侧重于抗体 - 免疫原相互作用。

[0556] 在一实施例中,相对于可比分子,Fc 变体蛋白增强了与一个或多个 Fc 配体的结合。在另一实施例中,Fc 变体蛋白与 Fc 配体的亲和性大于 Fc 变体蛋白与可比分子的亲和性至少 2 倍、或至少 3 倍、或至少 5 倍、或至少 7 倍、说至少 10 倍、或至少 20 倍、或至少 30 倍、或至少 40 倍、或至少 50 倍、或至少 60 倍、或至少 70 倍、或至少 80 倍、或至少 90 倍、或至少 100 倍或至少 200 倍。在一具体实施例中,Fc 变体蛋白增强了与 Fc 受体 FcRn 的结合。

[0557] 可通过增加 Fc 区域与 FcRn 的结合亲和性而增加包括 Fc 区域的蛋白质的血清半衰期。在一实施例中,相对于可比分子,Fc 变体蛋白具有延长的血清半衰期。

[0558] 在一实施例中,本发明提供了这样的组合物,其中 Fc 区域包括一个或多个位置上的非自然产生的氨基酸残基,所述位置选自如 Kabat 中列出的通过 EU 索引编号的 234、235、236、237、238、239、240、241、243、244、245、247、251、252、254、255、256、262、263、264、265、266、267、268、269、279、280、284、292、296、297、298、299、305、313、316、325、326、327、328、329、330、332、333、334、339、341、343、370、373、378、392、416、419、421、440 和 443。非必要的,Fc 区域可能包括在本领域技术人员已知的其他和 / 或备选位置上的非自然产生的氨基酸残基(参见美国专利 5,624,821、6,277,375、6,737,056 ;PCT 专利公开号 WO 01/58957、WO 02/06919、WO 04/016750、WO 04/029207、WO 04/035752、WO 04/074455、WO 04/099249、WO 04/063351、WO 05/070963、WO 05/040217、WO 05/092925 和 WO 06/020114)。

[0559] 在一具体实施例中,本发明提供了 Fc 变体蛋白组合物,其中 Fc 区域包括至少一种非自然产生的氨基酸残基,其选自如 Kabat 中列出的通过 EU 索引编号的 234D、234E、

234N、234Q、234T、234H、234Y、234I、234V、234F、235A、235D、235R、235W、235P、235S、235N、235Q、235T、235H、235Y、235I、235V、235F、236E、239D、239E、239N、239Q、239F、239T、239H、239Y、240I、240A、240T、240M、241W、241L、241Y、241E、241R.243W、243L 243Y、243R、243Q、244H、245A、247L、247V、247G、251F、252Y、254T、255L、256E、256M、262I、262A、262T、262E、263I、263A、263T、263M、264L、264I、264W、264T、264R、264F、264M、264Y、264E、265G、265N、265Q、265Y、265F、265V、265I、265L、265H、265T、266I、266A、266T、266M、267Q、267L、268E、269H、269Y、269F、269R、270E、280A、284M、292P、292L、296E、296Q、296D、296N、296S、296T、296L、296I、296H、269G、297S、297D、297E、298H、298I、298T、298F、299I、299L、299A、299S、299V、299H、299F、299E、305I、313F、316D、325Q、325L、325I、325D、325E、325A、325T、325V、325H、327G、327W、327N、327L、328S、328M、328D、328E、328N、328Q、328F、328I、328V、328T、328H、328A、329F、329H、329Q、330K、330G、330T、330C、330L、330Y、330V、330I、330F、330R、330H、332D、332S、332W、332F、332E、332N、332Q、332T、332H、332Y、332A、339T、370E、370N、378D、392T、396L、416G、419H、421K、440Y 和 434W。非必要的，Fc 区域可能包括本领域技术人员已知的其他和 / 或备的非自然产生的氨基酸残基（参见，例如，美国专利 5,624,821、6,277,375、6,737,056；PCT 专利公开号 WO 01/58957、WO 02/06919、WO 04/016750、WO 04/029207、WO 04/035752 和 WO 05/040217）。

[0560] 在另一实施例中，本发明提供了 Fc 变体蛋白组合物，其中 Fc 区域包括至少一个非自然产生的氨基酸残基，其选自如 Kabat 中列出的通过 EU 索引编号的 239、330 和 332。在一具体实施例中，本发明提供了 Fc 变体蛋白组合物，其中 Fc 区域包括至少一个非自然产生的氨基酸残基，其选自如 Kabat 中列出的通过 EU 索引编号的 239D、330L 和 332E。非必要的，Fc 区域还包括在一个或多个位置上的另外的非自然产生的氨基酸，其选自如 Kabat 中列出的通过 EU 索引编号的 252、254 和 256。在一具体实施例中，本发明提供了 Fc 变体蛋白组合物，其中 Fc 区域包括至少一个非自然产生的氨基酸，其选自如 Kabat 中列出的通过 EU 索引编号的 239D、330L 和 332E；及在一个或多个位置上的至少一种非自然产生的氨基酸，其选自如 Kabat 中列出的通过 EU 索引编号的 252Y、254T 和 256E。

[0561] 在一实施例中，本发明的 Fc 变体可能与其他已知的 F 变体相结合，其他 Fc 变体如在以下文章中公开的那些：Ghetie 等，1997，Nat Biotech. 15：637-40；Duncan 等，1988，Nature 332：563-564；Lund 等，1991，J. Immunol 147：2657-2662；Lund 等，1992，Mol Immunol 29：53-59；Alegre 等，1994，Transplantation 57：1537-1543；Hutchins 等，1995，Proc Natl. Acad Sci USA92：11980-11984；Jefferis 等，1995，Immunol Lett. 44：111-117；Lund 等，1995，Faseb J 9：115-119；Jefferis 等，1996，Immunol Lett 54：101-104；Lund 等，1996，J Immunol 157：4963-4969；Armour 等，1999，Eur J Immunol 29：2613-2624；Idusogie 等，2000，J Immunol 164：4178-4184；Reddy 等，2000，JImmunol 164：1925-1933；Xu 等，2000，Cell Immunol 200：16-26；Idusogie 等，2001，J Immunol 166：2571-2575；Shields 等，2001，J Biol Chem 276：6591-6604；Jefferis 等，2002，Immunol Lett 82：57-65；Presta 等，2002，Biochem Soc Trans 30：487-490）；美国专利 号 5,624,821、5,885,573、5,677,425、6,165,745、6,277,375、5,869,046、6,121,022、5,624,821、5,648,260、6,528,624、6,194,551、6,737,056、6,821,505、6,277,375；美 国专利公开号 2004/0002587 和 PCT 公开号 WO 94/29351、WO 99/58572、WO 00/42072、WO

02/060919、WO 04/029207、WO 04/099249、WO 04/063351。本发明还包括含有缺失、添加和/或修饰的Fc区域。对于本领域技术人员，其他的Fc区域的修饰/置换/缺失是显而易见的。

[0562] 产生非自然发生的Fc区域的方法在本领域是已知的。例如，可通过诱变方法产生氨基酸取代和/或缺失，包括但不局限于，定点诱变(Kunkel，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:488-492(1985))、PCR诱变(Higuchi，in" PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications"，Academic Press，San Diego，pp.177-183(1990))和盒式诱变(Wells等，Gene 34:315-323(1985))。优选地，通过重叠-延伸PCR方法进行定点诱变(Higuchi，in " PCR Technology:Principles and Applications for DNA Amplification "，Stockton Press，New York，pp.61-70(1989))。重叠-延伸PCR技术(Higuchi，ibid.)也可用于将任何所需突变引入目标序列(起始DNA)。例如，重叠-延伸方法的第一轮PCR涉及使用外引物(引物1)和内部诱变引物(引物3)的目标序列的扩增，并分别使用第二外引物(引物4)和内引物(引物2)，产生两个PCR片段(片段A和B)。内部诱变引物(引物3)被设计为包含与目标序列的错配，特异于所需的突变。在第二轮PCR中，第一轮PCR的产物(片段A和B)使用两个外引物(引物1和4)通过PCR被扩增。用限制性内切酶消化产生的全长的PCR片段(C段)并将得到的限制性片段克隆到一个合适的载体上。作为诱变的第一步骤，将起始DNA(例如，编码Fc融合蛋白、抗体或仅Fc区域)可操作的克隆到诱变载体中。引物被设计为反应所需的氨基酸取代。其他用于产生变体Fc区域的方法在本领域是已知的(参见，例如，美国专利号5,624,821、5,885,573、5,677,425、6,165,745;6,277,375、5,869,046、6,121,022、5,624,821、5,648,260、6,528,624、6,194,551、6,737,056、6,821,505、6,277,375;美国专利公开号2004/0002587和PCT公开号WO 94/29351、WO 99/58572、WO 00/42072、WO 02/060919、WO 04/029207、WO 04/099249、WO 04/063351)。

[0563] 在一些实施例中，Fc变体蛋白包括一个或多个工程糖链异质体(glycoforms)，例如，与包括Fc区域的分子共价连接的碳水化合物组合物。工程糖链异质体可用于多种目的，包括但不局限于，提高或降低效应物功能。可通过本领域技术人员已知的任何方法产生工程糖链异质体，例如通过使用工程的或变异表达的菌株，通过与一种或多种酶的共表达，例如DI N-乙酰氨基葡萄糖转移酶III(GnTI11)，通过在各种生物体或各种生物的细胞株中表达包括Fc区域的分子，或通过在包括Fc区域的分子被表达后使碳水化合物修饰。用于产生工程糖链异质体的方法在本领域是已知的，其包括但不局限于在下列文章中描述的，Umana等，1999，Nat.Biotechnol 17:176-180;Davies等，20017 Biotechnol Bioeng 74:288-294;Shields等，2002，J Biol Chem 277:26733-26740;Shinkawa等，2003，JBiol Chem 278:3466-3473);U.S.Pat.No.6,602,684;U.S.Ser.No.10/277,370;U.S.Ser.No.10/113,929;PCT WO 00/61739A1;PCT WO 01/292246A1;PCT WO 02/311140A1;PCT WO 02/30954A1;Potillegent™技术(Biowa，Inc.Princeton，N.J.);GlycoMAb™糖基化工程技术(GLYCART biotechnology AG，Zurich，Switzerland)。参见，例如，WO 00061739;EA01229125;US 20030115614;Okazaki等，2004，JMB，336:1239-49。

实施例

[0564] 本发明参考以下实施例进行说明。这些实施例仅用于说明且本发明绝不应局限于

这些实施例解释，而应包括解释为包括任何和所有变化，其成为本文中提供的研究结果的证据。

[0565] 实施例 1 ：抗 IL-6 抗体分离

[0566] 在 PCT 公开号 WO 2008/065378 的申请中提供了抗体 18 和其他本文中描述的可以用于本发明的抗 IL-6 抗体的分离的详细描述。简言之，使用重组人 IL-6 作为目标通过噬菌体展示库筛选将抗体 18 的前体分离。使前体经过亲和性优化以产生几种高亲和性人抗 IL-6 抗体。在 PCT 公开号 WO 2008/065378 的申请中描述了这些抗体的特征。抗体 18 能够阻断 IL-6 与 IL-6R 结合。抗体 18 与人和猕猴 IL-6 结合，但不与源于鼠的（大鼠）或狗的 IL-6 结合。抗体 18 与人 IL-6 的亲和性高于 BIAcore 检测的 10pM 检测水平。使用 TF-1 细胞增殖试验估计抗体 18 与人 IL-6 的亲和性为 0.40pM(95％ CI 0.12pM-0.69pM)。

[0567] 实施例 2 ：具有延长的半衰期的抗 IL-6 抗体

[0568] 2.1 包括具有 M252Y、S254T 和 T256E 取代的 Fc 区域的变体抗 IL-6IgG1 抗体的产生

[0569] 使用标准实验方法将编码抗体 18 的表达载体修饰以将 M252Y、S254T 和 T256E 取代引入到 Fc 区域。包括 M252Y、S254T 和 T256E 取代的修饰抗体 18 以下简称为抗体 18E 或 18E。

[0570] 编码抗 IL6 抗体重链和轻链的多核苷酸可能经过核酸序列优化。序列优化过程的最终目标是创建编码区，其能尽可能高效率地转录和翻译。序列优化通过以下步骤的组合完成 ：(i) 优化密码子选择 ；(ii) 适配 G/C 含量 ；(iii) 去除内部的剪接位点和过早的聚腺苷酸化位点 ；(iv) 破坏稳定的 RNA 二级结构 ；(v) 去除同向重复序列 ；(vi) 去除可能形成具有宿主细胞转录物的稳定双链 RNA 的序列 ；(vii) 去除宿主细胞微 RNA 靶向的序列 ；(viii) 引入 RNA 稳定信号和 RNA 易位信号。详细的序列优化方法在 WO2004059556A2、WO2006015789A2 和 Bradel-Tretheway 等，J. Virol. Methods 111 ：145-56(2003)，Valencik & McDonald，Transgenic Res. 3 ：269-75(2001) 中描述。可选地，可通过商业供应商（例如，GENEART 公司）优化序列。

[0571] 编码抗体 18E 的 VH、VL、重链和轻链的核苷酸序列通过以下本文所述方法进行优化。优化的编码抗体 18E 的 VH、VL、重链和轻链的核苷酸序列分别公开为 SEQ ID NO ：11-14。

[0572] 抗体 18E 被包括全长 18E 抗体的编码区域的表达载体转染，在 CHO-K1 细胞中稳定表达。使用标准实验方法将抗体 18E 从上清液中纯化。

[0573] 2.2 包括具有 M252Y、S254T 和 T256E 取代的 Fc 区域的变体抗 IL-6IgG1 抗体的体外表征

[0574] 抗体 18E 包括具有 M252Y、S254T 和 T256E 取代的 Fc 区域。使用 ELISA 检测确定抗体 18E 的 Fc 区域存在 M252Y、S254T 和 T256E 取代。该试验用作捕获试剂两个单克隆抗体，其与包括 M252Y、S254T 和 T256E 取代的 Fc 多肽特异性结合，但不与相应的野生型多肽结合。根据标准规定进行 ELISA 检测。图 1 示出了得到的特异性单克隆抗体取代的 ELISA 滴定曲线。在 ELISA 检测中通过特异于 M252Y、S254T 和 T256EFc 区域取代的抗体获取抗体 18E，而不是抗体 18。因此，抗体 18 包括具有 M252Y、S254T 和 T256E 取代的 Fc 区域。

[0575] 包括 M252Y、S254T 和 T256E 取代的 Fc 多肽相比较于野生型 Fc 多肽，在 pH 值为 6 时，具有与 FcRn 增加的亲合力。使用 BIAcore 检测测定纯化的抗体 18 和抗体 18E 的 FcRn

亲合力。根据标准规定进行该检测。相比于抗体 18，抗体 18E 在 pH 值为 6 时以明显更高的亲合力与人和猕猴 FcRn 结合。表 1 示出了通过 BIAcore 测定的 Kd 值。

[0576] 表 1 抗体 18 和 18E 的 FcRn 亲合力

[0577]

抗体	KD 人 FcRn(nM)	KD 猕猴 FcRn(nM)
18	2610	1160
18E	226	365

[0578]

[0579] 抗体 18 和 18E 以基本上相同的亲和性与 IL-6 结合。通过 ELISA 检测确定抗体 18 和 18E 的 IL-6 亲合力。大肠杆菌表达的重组人 IL-6 制剂被用作捕获试剂。根据标准规定进行 ELISA 检测。除了抗体 18 和 18E，在该检测中还包括两个竞争剂抗 IL-6 抗体 (AB A 和 AB B) 作为阳性对照。图 2 示出了所获得的实施例数据。抗体 18 和 18E 的 EC_{50} 值分别为 6.1pM 和 6.5pM。

[0580] 抗体 18 和 18E 抑制 IL-6 诱导的 TF-1 细胞以基本上相同的功效扩增。大体上如本文所述进行 IL-6 诱导的 TF-1 细胞增殖试验。除了抗体 18 和 18E，在该试验中还包括两个竞争剂抗 IL-6 抗体 (AB A 和 AB B) 作为阳性对照。图 3 中示出了代表性数据。计算的抗体 18 和 18E 的 IC_{50} 分别为 4.5pM 和 5.2pM。

[0581] 抗体 18 和 18E 抑制内源性 IL-6 诱导的 VEGF 以基本上相同的功效从人类滑膜成纤维细胞中释放。大体上如本文所述进行该试验。除了抗体 18 和 18E，在该试验中还包括两个竞争剂抗 IL-6 抗体 (AB A 和 AB B) 作为阳性对照。图 4 中示出了代表性数据。计算的抗体 18 和 18E 的 IC_{50} 分别为 1.3pM 和 1.2pM。

[0582] 2.3 包括具有 M252Y、S254T 和 T256E 取代的 Fc 区域的变体抗 IL-6IgG1 抗体的体内表征

[0583] 在猕猴中进行单剂量药物动力学药效学研究，以确定抗体 18 和 18E 的血清半衰期和清除率。表 2 中概述了研究设计。

[0584] 表 2 单剂量药物动力学实验的研究设计

[0585]

组	治疗	剂量 (mg/kg)	给药途径	数量
1	18	5	静脉注射	3 个雄性动物
2	18	5	皮下给药	3 个雄性动物
3	18E	5	静脉注射	3 个雄性动物
4	18E	5	皮下给药	3 个雄性动物
5	18E	50	皮下给药	3 个雄性动物

[0586]

[0587] 用于猕猴血浆中抗体 18 或抗体 18E 定量的 IL-6 抗原捕获 PK 试验 (ECL) :将 MA240096 孔板涂有 2.5g/ml 重组人 IL-6(R&D 系统),在 2 至 8℃下过夜,用含有 0.05%吐温 20 的 PBS 洗涤,并在室温下使用 I- 模块缓冲区 (Tropix) 封闭 1 至 2 小时。在 1%猕猴血浆中制备抗体 18 和抗体 18E 标准曲线、质量控制 (QC) 和测试样品稀释液并在室温下添加到封锁板 1 小时。如上洗涤板并在 1μg/ml MSD-TAG(钌)- 标记的 - 羊抗人类 IgG(H+L) 侯吸附检测抗体 (结合位点) 下再培养一个小时。通过洗涤去除未结合的检测抗体并将 150ml 1X Read Buffer T(MSD) 添加到板孔。MSD 扇形成像仪 2400 将板立即读数,且使用该板的标准曲线定量每孔中 QC 和检测样品稀释液的抗体 18 和抗体 18E 浓度。通过绘制标准曲线和 Softmax Pro GxP 软件 (Molecular Devices) 下合适的两坐标轴对数曲线的 ECL 信号进行所有分析。抗体 18 和抗体 18E 定量的测定范围是 100%血浆中 10,000 至 13.7ng/ml(10 至 0.0137μg/ml)。

[0588] PK 数据分析 :根据 MedImmune 标准操作程序,使用 WinNonlin 专业版 (version 5.2,Pharsight Corp.,Mountain View,CA) 对源于所有动物的个体 PK 数据进行非间隔毒理动力学分析。

[0589] 图 5 和图 6 示出了所获得的结果。图 5 示出了皮下或静脉给药单独的 5mg/ml 抗体剂量后随时间变化的抗体 18 和 18E 的血药浓度。抗体 18 和 18E 都显示线性 PK 分布图。在皮下或静脉给药后抗体 18 的血清半衰期分别约为 8.5 天至 9.1 天。在皮下或静脉给药后抗体 18E 的血清半衰期分别约为 28.4 天至 28.8 天。在皮下或静脉给药后抗体 18 的清除率分别约为 12.1ml/ 天 /kg 和 13.1ml/ 天 /kg。在皮下或静脉给药后抗体 18E 的清除率分别约为 2.8ml/ 天 /kg 和 3.0ml/ 天 /kg。皮下给药抗体 18 和 18E 的生物利用率分别为 94%和 96%。

[0590] 图 6 示出了皮下给药单独的 5mg/ml 抗体剂量后随时间变化的抗体 18 和 18E 的血药浓度。图 6 还示出了皮下给药单独的 5mg/ml 剂量的抗体 18 或 18E 后动物中检测的总的血清 IL-6 浓度。IL-6 总水平上升约基线 3 倍对数。使用抗体 18E 观察到总 IL-6 更多的累积。总 IL-6 水平的下降大约平行于 PK 的下降。

[0591] 2.3 通过皮下给药抗 IL-6 抗体血浆游离 IL-6 中和作用的模型

[0592] 在健康动物中游离 IL-6 浓度很低处于基线。因此将更难通过游离 IL-6 水平,估计给药抗 IL-6 抗体后目标中和作用。我们开发了 SAAM II 软件包中的 PK/PD 模型,使用总 IL-6 作为 PD 标记预测关于抗体 PK 的游离 IL-6 中和作用的动力学。PK/PD 模型描述了抗体、游离 IL-6、IL-6 和抗体组合物、可溶性受体及 IL-6 与可溶性受体组合物的动力学。开发的模型充分地描述了产生于猴子研究的抗体 PK 和总 IL-6 动力学,并用于模拟使用标准异速所发假设的不同治疗方案后人类 RA 患者的 PK/PD 时间分布图。基于类风湿性关节炎患者中检测的血清游离 IL-6 浓度确定人血浆中游离 IL-6 水平的 90%抑制水平 (Uson 等, J.of Rheumatology(1997)24(11)2069-75)。

[0593] 图 7-10 和表 3 示出了 PD 模型的结果。该模型预测游离 IL-6(例如,不与 sIL-6R 或 IL-6R 结合) 持续的至少 90%抑制作用可能根据一些给药方案通过给药抗体 18E 实现 :

[0594] 每 8 周皮下给药 100mg 抗体 18E ;

[0595] 每 4 周皮下给药 50mg 抗体 18E ;

[0596] 递送单负荷剂量的 200mg 抗体 18E 后每 8 周皮下给药 100mg 抗体 18E ;并且

[0597] 递送单负荷剂量的 100mg 抗体 18E 后每 4 周皮下给药 50mg 抗体 18E。

[0598] 该模型进一步预测类似水平的游离血清 IL-6 的持续抑制作用将需要更频繁和 / 或更大剂量的抗体 18。例如，游离 IL-6（例如，不与 sIL-6R 或 IL-6R 结合）的持续的至少 90％抑制作用可能通过每 2 周皮下给药 100mg 抗体 18 实现。

[0599] 表 3 血浆游离 IL-6 中和作用模型的结果概括

[0600]

给药间隔	抗体 18 剂量	抗体 18E 剂量
2 周	• 100 mg SC • IL-6 抑制≥ 90%	
4 周	• 100 mg SC	• 50 mg SC 或 2x 负荷剂量+ 50 mg SC 维持剂量

[0601]

	• IL-6 抑制≤ 90%	• IL-6 抑制≥ 90%
8 周	• 500 mg SC • IL-6 抑制 ≤ 90%	• 100 mg SC 或 2x 负荷剂量 + 100 mg SC 维持剂量 • IL-6 抑制≥ 90%
12 周		• 100 mg SC • IL-6 抑制≤ 90%

[0602] 这些结果表明了抗 IL-6 抗体抑制体内 IL-6 的全身效应的能力。然而，上述的本发明的特定实施例仅用于说明，本领域技术人员将会理解的是，在不脱离如附属权利要求中所述的本发明的范围内，可以实现多种变化。

[0603] 实施例 3 ：小鼠 FCA 诱导的炎症痛模型中的疗效

[0604] 在小鼠尾部（尾巴末端 3cm 处），检测 mAb406（抗小鼠 IL-6，纯化于单克隆 IgG1，克隆 MP5-20F3，lot AHV100904A，R&D 系统）的逆转炎症痛的能力，所述炎症痛是由局部皮下给药 Freund 完全佐剂（“FCA”）(20μl) 诱导的。该物质产生了随着时间的推移的局部炎症反应，并在给药后 24 小时和 48 小时之间达到平衡。引发的炎症使尾巴产生对热或机械刺激的过敏性。通过记录在热刺激下（温水，46℃）尾巴的撤出延迟估计热痛觉过敏，而通过测痛仪 (analgesymeter)(Randall Selitto apparatus) 产生的稳定增加压力下尾巴的撤出临界估计机械性痛觉过敏。在 FCA 治疗后 6 小时腹腔内给药 (ip)IgG1 同型对照 (mAb005，纯化于小鼠单克隆 IgG1，克隆 43414，lot CAN04904A，购买于 R&D 系统）和 mAb406。引出了表面炎症反应的证据，其包括增加的细胞因子水平、一氧化氮产生和对轻度伤害性刺激的过敏性。起始研究估计了 mAb406 的单剂量 (20mg/kg)。此剂量在热痛觉过敏试验中的 24 和 48 小时产生了 50％ E-max（见图 11），并在机械性痛觉过敏中的 24 和 48 小时产生了 40％逆转（见图 12）。这些动物中 IL-6 全身血浆水平的体外分布图说明所有的 IL-6 已被中和。随后，估计不同剂量的 mAb406（和高剂量 IgG1 对照）以表征关于疼痛抑制和痛觉过敏逆转的疗效和 IL-6 中和作用。使用相同实验示例剂量（范围为 1 至 20mg/kg），在 24 小时和 48 小时检测热和机械性痛觉过敏的 ip。图 13 示出了热痛觉过敏是剂量依赖型的，在 24 小时抗 IL6 的治疗使其逆转，且在 48 小时得到相似结果。在第二次研究中 E-max 是 64％逆转的，其略高于上面得到的逆转。图 15 和图 16 分别示出了在 24 小时和 48 小时机械性

痛觉过敏的结果。在 48 小时观察的再次剂量依赖型逆转，达到 91％ E-max，其高于第一次研究中得到的逆转。在任何检测剂量和任何研究中都未观察到副作用。总体而言，mAb406 的体内疗效和相同模型中的基准测试小分子化合物甲氧萘丙酸相当或比其高（见图 17 甲氧萘丙酸的热过敏性和图 18 甲氧萘丙酸的机械压力过敏性）。

[0605] 在本说明书中提到的所有公开、专利和专利申请的内容在相同程度上通过引用并入本说明书，如每个个体公开、专利和专利申请是特定并单独说明通过引用并入本文。

[0606] 材料与方法

[0607] 通过纯化的 scFv 和 IgG 抑制 IL-6 诱导的 TF-1 细胞增殖

[0608] TF-1 细胞是从 R&D 系统获得的并根据供应规定保存。试验介质包括 RPMI-1640 和 GLUTAMAX I(Invitrogen)，其含有 5％胎牛血清 (JRH) 和 1％丙酮酸钠 (Sigma)。在每个试验之前，TF-1 细胞在 300xg 离心沉淀 5 分钟，通过抽吸和在试验介质中的细胞重新悬浮去除介质。这个过程和细胞重新悬浮重复两次，在试验介质中的最终浓度为 $5x10^5$ 细胞 /ml。将细胞以 100μl/ 孔接种于 96 孔检测板。平板在 37℃和 5％ CO_2 下培养 24 小时使 GM-CSF 细胞缺失。将纯化的 scFv 或 IgG 检测溶液（一式两份）稀释到试验介质所需浓度。使用不直接作用于 IL-6 的无关抗体作为阴性对照。将重组细菌衍生的人类 (R&D) 和猕猴（本身的）IL-6 添加到最终浓度 20pM（人 IL-6）或 100pM（猕猴），与适当的检测抗体混合，总体积为 100μl/ 孔。选择本试验中使用的 IL-6 浓度作为约 80％最大增殖反应的最终试验浓度的记录。所有样品在室温下培养 30 分钟。然后将 100μlIL-6 和抗体混合物添加到 100μl 细胞中以得到 200μl/ 孔的总试验体积。平板在 37℃和 5％ CO_2 下培养 24 小时，然后想每个检测点中添加 20μl 氚标记胸腺嘧啶核苷 (5μCi/ml)，并将板再培养 24 小时。使用细胞采集装置在玻璃纤维过滤板 (Perkin Elmer) 上收集细胞。使用 Packard TopCount 微孔板液体闪烁计数器测定氚标记胸腺嘧啶核苷。然后使用 Graphpad Prism 软件分析数据。

[0609] 通过纯化的 scFv 和 IgG 抑制内源性 IL-6 诱导的 VEGF 从人滑膜成纤维细胞释放

[0610] 在含有抗生素的 DMEM 中获取源于全关节置换手术的类风湿关节炎的膝盖样品。将浸透在介质中的滑膜从关节分离并细致地切割。用添加 10％ FCS 的介质洗涤滑膜组织。细胞悬浮液在 37℃的二氧化碳培养箱中在胶原酶溶液中培养 2 小时。通过 10ml 移液管的重复抽吸、室温下 400g 细胞过滤和离心 5 分钟使消化的滑膜细胞悬液断裂。在含有 10％ FCS 的 DMEM 中重新悬浮细胞，并通过细胞滤网，调整到 $1x10^6$ 细胞 /ml，并在 37℃的二氧化碳培养箱中在 $225cm^2$ 细胞培养瓶中培养 (3001，CoStar Corning Inc.)。在吸附后，多数介质被丢弃，替换为新鲜的介质并恢复到培养箱中拥有长期培养。每周一次的基础上检测细胞并在 1 到 3 代通过胰蛋白酶化作用传代合流。

[0611] 通过 37℃下每个烧瓶用 10mL 0.1％胰酶 -EDTA 溶液 (25300-054，Gibco Life Sciences) 培养 5 至 10 分钟将融合的成纤维细胞 (P3-5) 从烧瓶中移除。将等体积添加 10％ FCS 的 DMEM 培养基添加到细胞中，然后在室温下 330g 离心沉淀 5 分钟。在用添加 10％ FCS 的 DMEM 培养基的洗涤步骤后，将细胞悬浮液 ($1x10^5$ 细胞 /mL) 添加到（每孔 150μL）无菌 96 孔细胞培养集群平底聚苯乙烯板 (3598，Corning CoStar) 的孔中 $1.5x10^4$ 细胞 / 孔。将额外的添加 10％ FCS 的 DMEM 培养基添加到每个孔中（每孔 100μL）以达到每孔的总体积 250μL。37℃下过夜培养细胞以允许粘附并静止。

[0612] 检查 96 孔板以确保细胞融合并状况良好（例如，无污染）。然后从孔中吸出介质

并立即添加 100μL 添加 10% FCS 的 DMEM 培养基。对此，将 50μL 含有样品 IgG 或只有介质的添加 10% FCS 的 DMEM 培养基添加到孔中（检测中从 1 稀释到 5）。

[0613] 其次，每孔加入 50μL 含有重组人可溶性 (rhs)IL-6Rα (500ng/mL ;12nM) 和 rhIL-1β (50pg/mL ;2.95pM、检测中从 1 稀释到 5) 的添加 10% FCS 的 DMEM 培养基。

[0614] 在各别的孔中，加入 50μL 含有 rh-IL-6(0，100ng/mL ;21.5nM)、sIL-6Rα (500ng/mL ;12nM)、rhIL-1β (50pg/mL ;2.95pM)、或只有介质的添加 10% FCS 的 DMEM 培养基（检测中从 1 稀释到 5)。每个孔的最终体积为 250μL。

[0615] 平板在 37℃下培养 48 小时。在两个或三个孔中进行培养。在室温下 330g 离心板 5 分钟，并去除悬浮介质，在 -40℃微量平底板 (611F96，Sterilin) 中冷冻。

[0616] 根据制造说明使用 ELISA(DY293B，R&D Systems) 测量 VEGF。简言之，涂有小鼠抗人类 VEGF 抗体的酶标板在 4℃过夜并用 BSA/PBS 封闭。用 0.05%吐温 20/PBS 洗涤板并与人关节滑膜成纤维细胞和生物素化山羊抗人 VEGF 抗体的培养悬浮物在室温下过夜培养。在清洗后，使用链霉亲和素辣根过氧化物酶检测 VEGF。使用 1 ： 1 的过氧化氢：四甲基联苯胺使板显影。2M H_2SO_4 停止反应，并用 540nm 校正波长在 450nm 测定光密度。

[0617] 总血浆 IL-6 水平的测定

[0618] 根据制造商的建议使用 Milliplex™ MAP 试剂盒 (MPXHCYTO60K) 测定总 IL-6。检测试剂盒提供了所有必需的试剂。简言之，试验过滤板是 200μL 试验缓冲液且通过真空去除液体。将以下各种试剂加入 25μL/ 孔的板中 :(a) 试验缓冲液 ;(b) 血浆样品、标准或 QC ;(c) 与检测基质中抗 IL-6 捕获抗体共轭的微珠。最终检测体积为 75μl 且最终检测基质为 25% IL-6 的耗尽的正常猕猴 EDTA 血浆中的 133.3μg/ml 候选药物（抗体 18 或抗体 18E)。将板密封并在 4℃过夜培养。在使用洗涤缓冲液洗涤两次后，加入 25μl/ 孔的生物素化抗 IL-6 检测抗体。培养 30 分钟后，将 25μl/ 孔的 SA-PE 加入孔中并使板额外培养 30 分种。洗涤板两次且微珠重新悬浮于 150μl/ 孔的 Luminex Sheath Fluid。通过 Luminex200 酶标仪测定微珠荧光强度。因为存在抗体 18 或抗体 18E 时，捕获和检测抗 IL-6 抗体能与 IL-6 结合，荧光强度与样品中的总 IL-6 浓度成正比。通过使用 BeadView 软件 (Upstate Cell Signaling Solutions) 绘制的标准曲线推测 IL-6 浓度。在 100%猕猴血浆中 IL-6 的检测范围是 1.8pg/ml 至 5769pg/ml。

[0619] 本说明书任何地方引用的所有参考文献，包括以上任何地方引用的文献，它们的全部内容通过引用并入本文。

[0620] 序列表

[0621] SEQ ID NO :1 ;Ab 18 VH CDR1

[0622] SNYMI

[0623] SEQ ID NO :2 ;Ab 18 VH CDR2

[0624] DLYYYAGDTYYADSVKG

[0625] SEQ ID NO :3 ;Ab 18 VH CDR3

[0626] WADDHPPWIDL

[0627] SEQ ID NO :4 ;Ab 18 VL CDR1

[0628] RASQGISSWLA

[0629] SEQ ID NO :5Ab 18 VL CDR2

[0630] KASTLES

[0631] SEQ ID NO:6Ab 18 VL CDR3.

[0632] QQSWLGGS

[0633] SEQ ID NO:7Ab 18 VH

[0634] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSNYMIWVRQAPGKGLEWVSDLYYYAGDTYYADSVKG

[0635] RFTMSRDISKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARWADDHPPWIDLWGRGTLVTVSS

[0636] SEQ ID NO:8Ab 18 VL

[0637] DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKVLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGT

[0638] EFTLTISSLQPDDFATYYCQQSWLGGSFGQGTKLEIK

[0639] SEQ ID NO:9Ab 18E HC

[0640] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSNYMIWVRQAPGKGLEWVSDLYYYAGDTYYADSVKG

[0641] RFTMSRDISKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARWADDHPPWIDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAP

[0642] SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI

[0643] CNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSH

[0644] EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK

[0645] TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG

[0646] SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0647] SEQ ID NO:10Ab 18ELC

[0648] DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKVLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGT

[0649] EFTLTISSLQPDDFATYYCQQSWLGGSFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY

[0650] PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK

[0651] SFNRGEC

[0652] SEQ ID NO:11Ab 18 优化的 VH

[0653] GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGCGGCTGTCCTG

[0654] CGCCGCCTCCGGCTTCACCATCTCCTCCAACTACATGATTTGGGTCCGCCAGGCACCTGGCAAGGG

[0655] GCTCGAGTGGGTGTCCGACCTGTACTACTACGCCGGCGACACCTACTACGCTGACTCCGTGAAGG

[0656] GCCGGTTCACCATGTCCAGGGACATCTCCAAGAACACCGTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGG

[0657] GCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGATGGGCCGACGACCACCCTCCTTGGATCGACCT

[0658] GTGGGGCAGGGGCACCCTGGTCACCGTCAGCTCC

[0659] SEQ ID NO:12Ab 18 优化的 VL

[0660] GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCTGTCCGCCAGCGTCGGCGACAGAGTGACCATCAC

[0661] CTGCCGGGCCTCCCAGGGCATCTCCAGCTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCC

[0662] CTAAGGTGCTGATCTACAAGGCCAGCACCCTGGAGTCCGGCGTGCCTTCCCGGTTCTCCGGCTCCG

[0663] GCAGCGGCACCGAGTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCTGACGACTTCGCCACCTACTACT

[0664] GCCAGCAGTCCTGGCTGGGCGGCTCCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAG

[0665] SEQ ID NO:13Ab 18E 优化的 HC

[0666] GAGGTGCAGCTGGTCGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCTCCCTGCGGCTGTCCTG

[0667] CGCCGCCTCCGGCTTCACCATCTCCTCCAACTACATGATTTGGGTCCGCCAGGCACCTGGCAAGGG

[0668] GCTCGAGTGGGTGTCCGACCTGTACTACTACGCCGGCGACACCTACTACGCTGACTCCGTGAAGG

[0669] GCCGGTTCACCATGTCCAGGGACATCTCCAAGAACACCGTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGCGG

[0670] GCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGATGGGCCGACGACCACCCTCCTTGGATCGACCT

[0671] GTGGGGCAGGGGCACCCTGGTCACCGTCAGCTCCGCCTCCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCCCC

[0672] TGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCTCCGGCGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTAC

[0673] TTCCCCGAACCGGTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGCGCTCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCC

[0674] CGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACAGTGCCCAGCAGCAGC

[0675] CTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGA

[0676] GAGTGGAGCCCAAGAGCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCTGCCCCTGAGCTGCTG

[0677] GGCGGACCTAGCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGTACATCACCAGGGAGCC

[0678] CGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAGGACCCTGAGGTGAAGTTCAATTGGTACG

[0679] TGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTA

[0680] CAGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAATACAAGTGC

[0681] AAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCTGCCCCCATCGAAAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC

[0682] CTCGGGAGCCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTAGCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCC

[0683] CTGACCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCA

[0684] GCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACA

[0685] GCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCA

[0686] CGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG

[0687] SEQ ID NO:14Ab 18E 优化的 LC

[0688] GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCTGTCCGCCAGCGTCGGCGACAGAGTGACCATCAC

[0689] CTGCCGGGCCTCCCAGGGCATCTCCAGCTGGCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCCC

[0690] CTAAGGTGCTGATCTACAAGGCCAGCACCCTGGAGTCCGGCGTGCCTTCCCGGTTCTCCGGCTCCG

[0691] GCAGCGGCACCGAGTTCACCCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCTGACGACTTCGCCACCTACTACT

[0692] GCCAGCAGTCCTGGCTGGGCGGCTCCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACGGTG

[0693] GCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCTCCGT

[0694] GGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCC

[0695] TGCAGTCCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCT

[0696] GAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTG

[0697] ACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACAGGGGCGAGTGC

[0698] SEQ ID NO:15 人 IL-6

[0699] MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKET

[0700] CNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCFQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEEQ

[0701] ARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLR

[0702] ALRQM

[0703] SEQ ID NO:16 成人 IL-6

[0704] VPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEK

[0705] DGCFQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTP

[0706] DPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM

[0707] SEQ ID NO:17sIL-6Ra

[0708] MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCPGVEPEDNATVHWVLRKPA

[0709] AGSHPSRWAGMGRRLLLRSVQLHDSGNYSCYRAGRPAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRKSPLSNVVCE

[0710] WGPRSTPSLTTKAVLLVRKFQNSPAEDFQEPCQYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGSKF

[0711] SKTQTFQGCGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYRLRFELRYRAERSKTFTTWM

[0712] VKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQGEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALT

[0713] TNKDDDNILFRDSANATSLPVQD

[0714] SEQ ID NO:18IL-6Ra 的跨膜结构域

[0715] MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCPGVEPEDNATVHWVLRKPA

[0716] AGSHPSRWAGMGRRLLLRSVQLHDSGNYSCYRAGRPAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRKSPLSNVVCE

[0717] WGPRSTPSLTTKAVLLVRKFQNSPAEDFQEPCQYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGSKF

[0718] SKTQTFQGCGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYRLRFELRYRAERSKTFTTWM

[0719] VKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQGEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALT

[0720] TNKDDDNILFRDSANATSLPVQDSSSVPLPTFLVAGGSLAFGTLLCIAIVLRFKKTWKLRALKEGKTSM

[0721] HPPYSLGQLVPERPRPTPVLVPLISPPVSPSSLGSDNTSSHNRPDARDPRSPYDISNTDYFFPR

[0722] SEQ ID NO:19Gp130

[0723] MLTLQTWLVQALFIFLTTESTGELLDPCGYISPESPVVQLHSNFTAVCVLKEKCMDYFHVNANYIVWK

[0724] TNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDIASLNIQLTCNILTFGQLEQNVYGITIISGLPPEKPKNLSCIVNEGKK

[0725] MRCEWDGGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKRDTPTSCTVDYSTVYFVNIEVWVEAENALGKV

[0726] TSDHINFDPVYKVKPNPPHNLSVINSEELSSILKLTWTNPSIKSVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTAS

[0727] TRSSFTVQDLKPFTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEASGITYEDRPSKAPSFWYKIDPSHTQGYRTV

[0728] QLVWKTLPPFEANGKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNATKLTVNLTNDRYLATLTVRNLVGKSDAAV

[0729] LTIPACDFQATHPVMDLKAFPKDNMLWVEWTTPRESVKKYILEWCVLSDKAPCITDWQQEDGTVHR

[0730] TYLRGNLAESKCYLITVTPVYADGPGSPESIKAYLKQAPPSKGPTVRTKKVGKNEAVLEWDQLPVDV

[0731] QNGFIRNYTIFYRTIIGNETAVNVDSSHTEYTLSSLTSDTLYMVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTTPKFAQ

[0732] GEIEAIVVPVCLAFLLTTLLGVLFCFNKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMYS

[0733] DGNFTDVSVVEIEANDKKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSS

[0734] TVQYSTVVHSGYRHQVPSVQVFSRSESTQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGDGILPRQQYFKQNCSQHE

[0735] SSPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMKMFQEVSAADAFGPGTEGQVERFETVG

[0736] MEAATDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQ

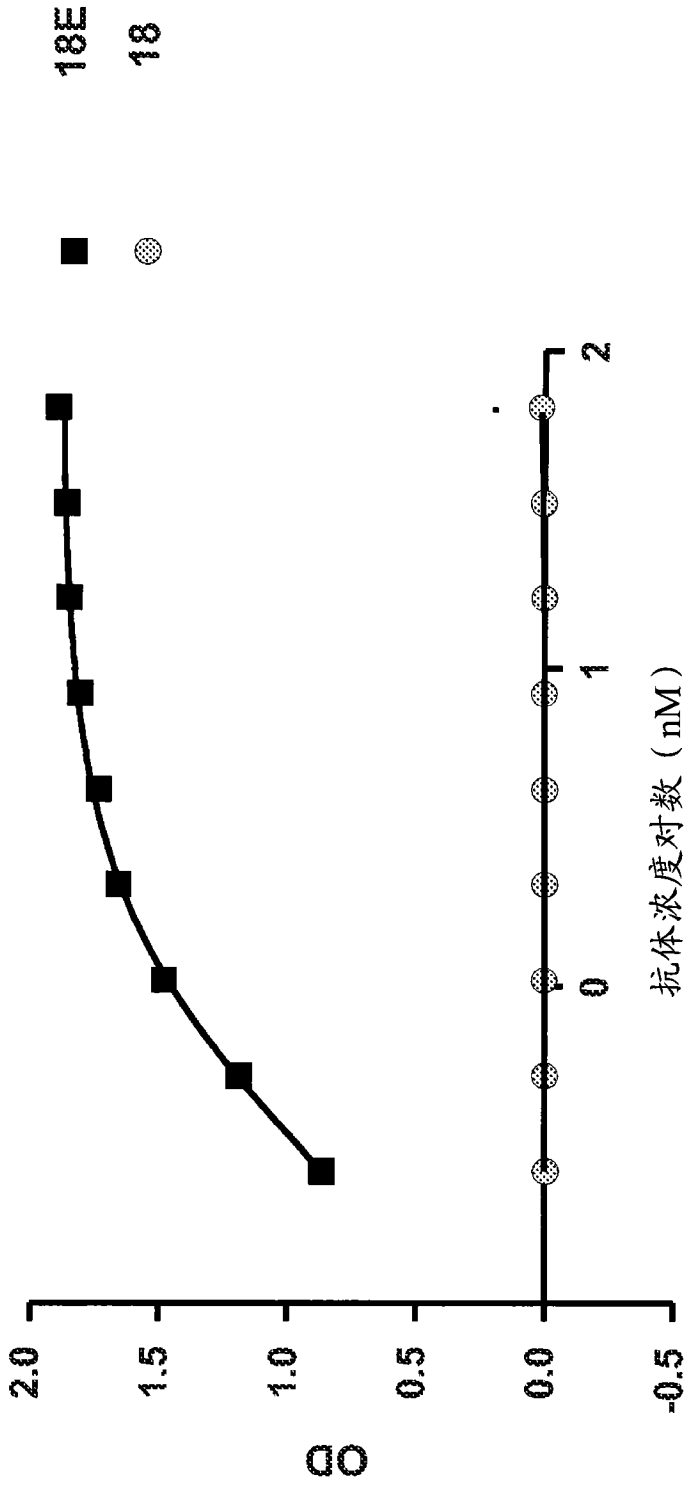
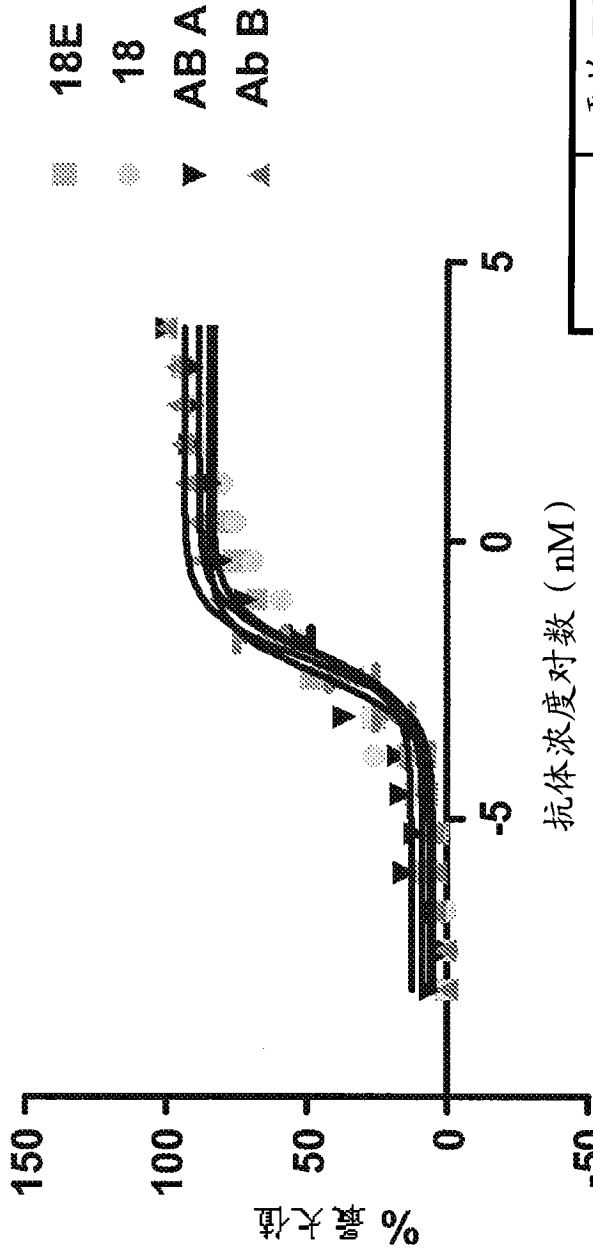
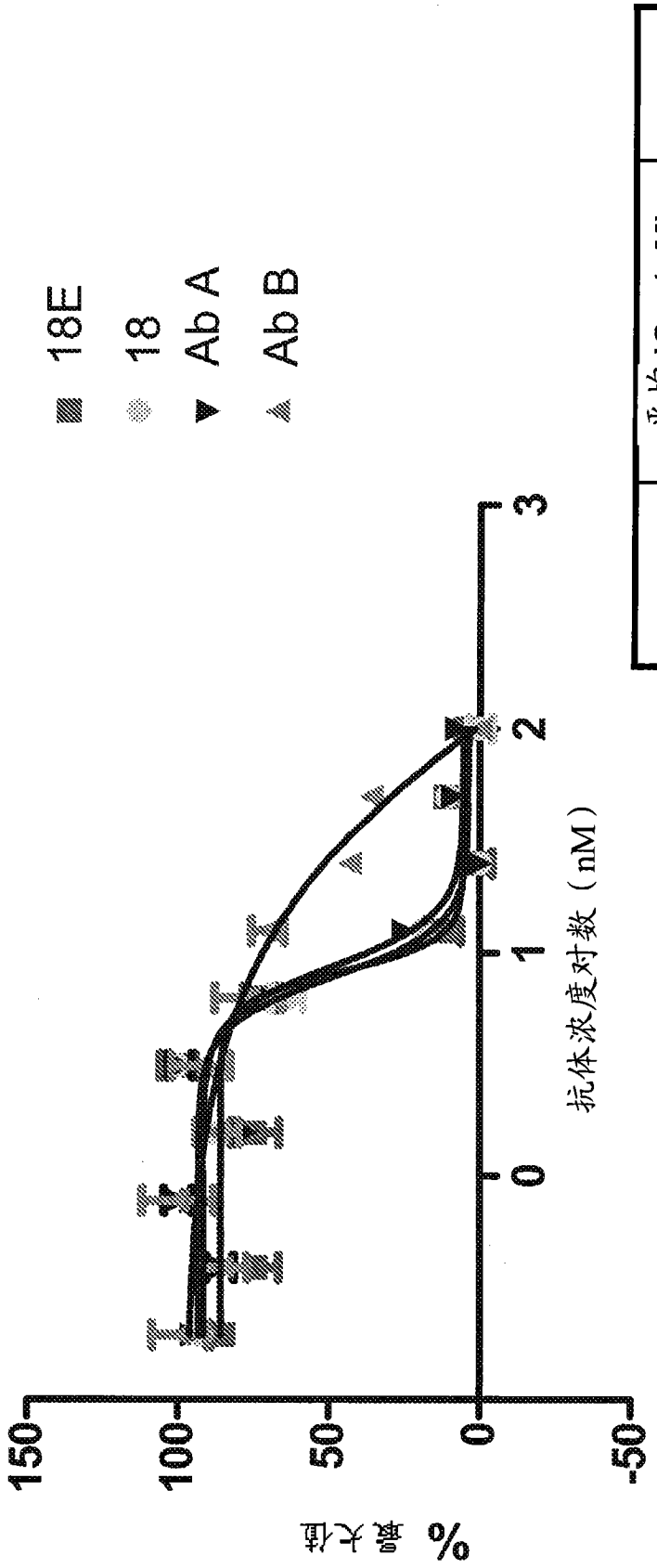


图 1



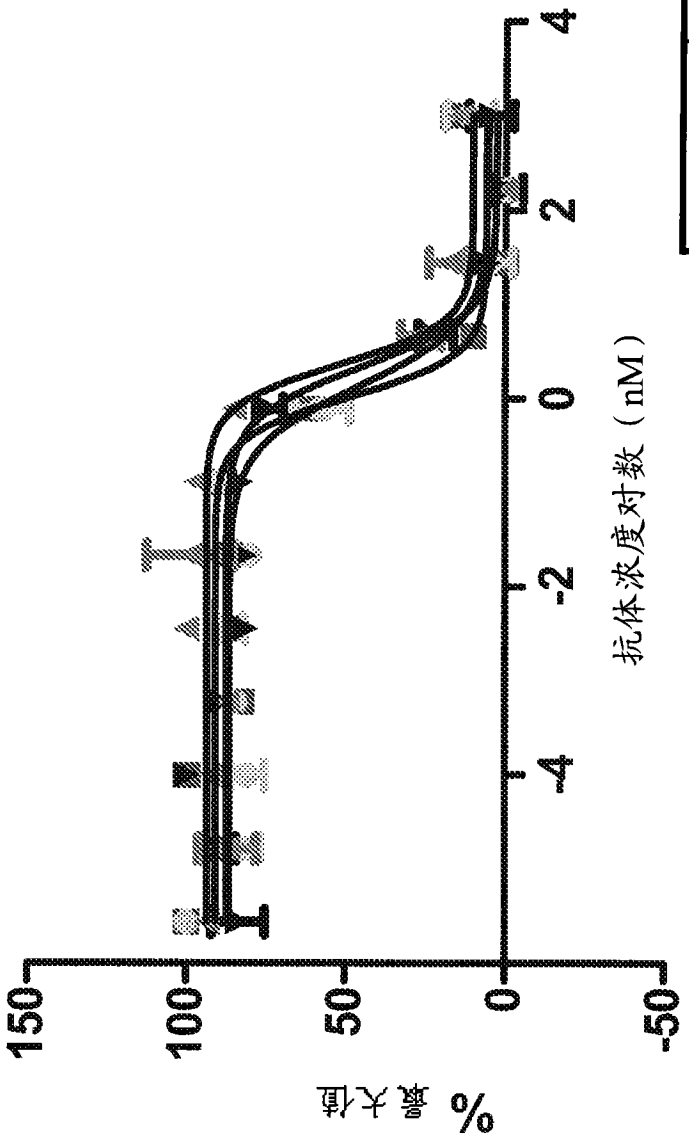
	平均 EC_{50} (pM)	n
18E	6.5	4
18	6.1	3
Ab A	7.8	4
Ab B	14.1	4

图 2



	平均 IC_{50} (pM)	n
18E	5.2	3
18	4.5	3
Ab A	5.9	3
Ab B	78.1	3

图 3



	平均 IC_{50} (nM)	n
18E	1.2	3
18	1.3	3
Ab A	2.8	3
Ab B	2.2	3

图 4

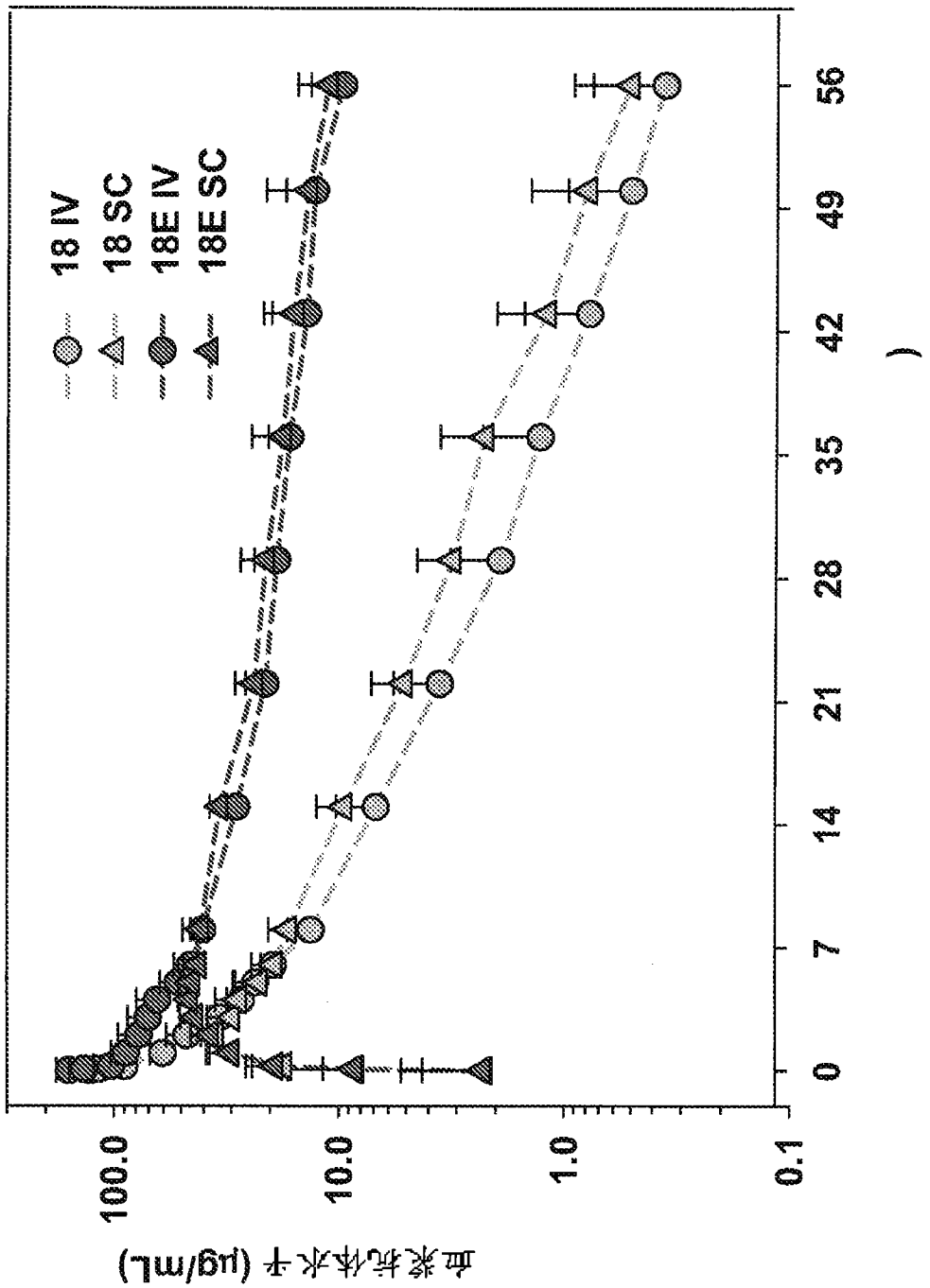

18 IV
18 SC
18E IV
18E SC
100.0
10.0
1.0
0.1
0
7
14
21
28
35
42
49
56
)
血浆抗体水平 (μg/mL)

图 5

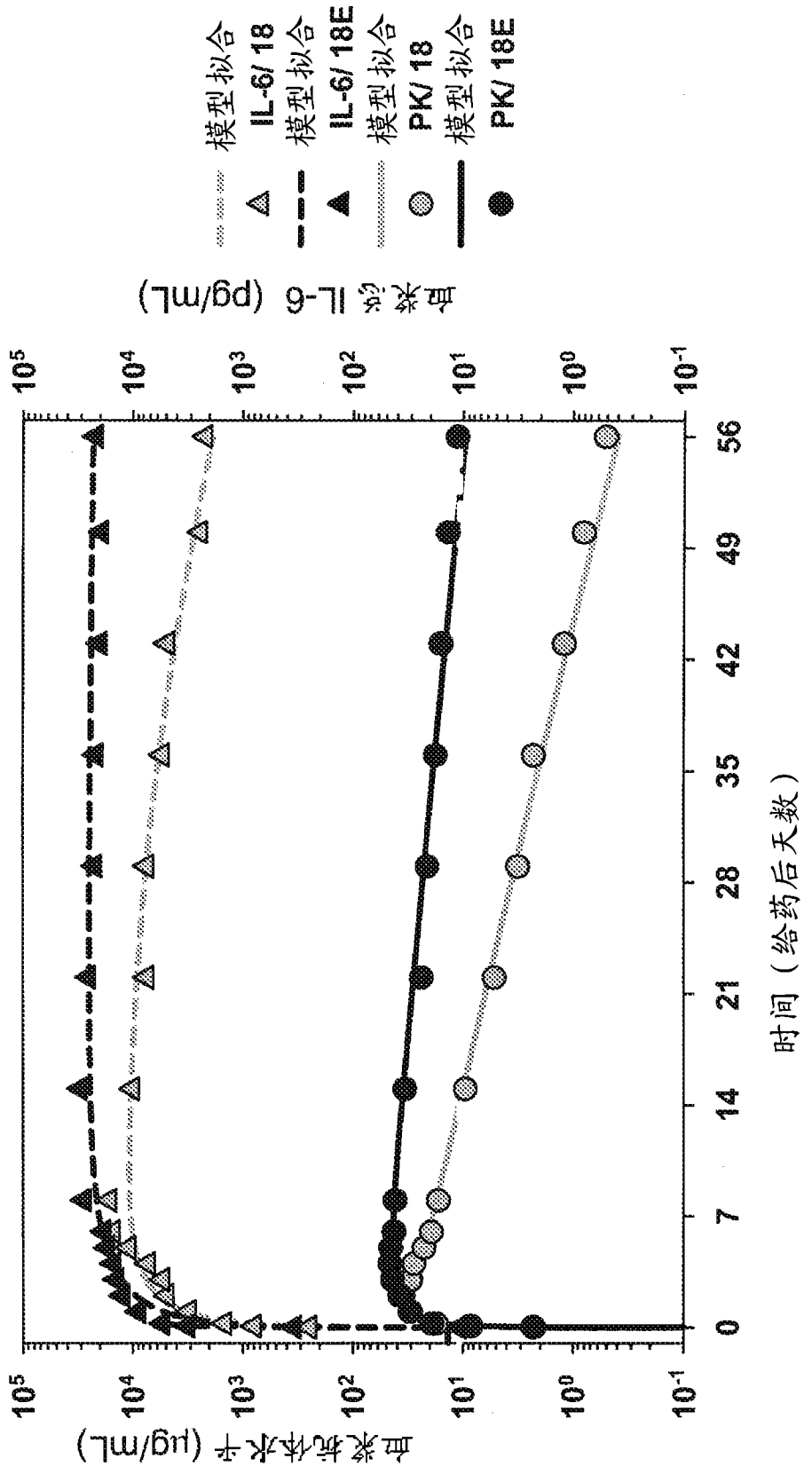

模型拟合
IL-6/ 18
模型拟合
IL-6/ 18E
模型拟合
PK/ 18
模型拟合
PK/ 18E
血浆 IL-6 (pg/mL)
血浆抗体水平 (μg/mL)
时间（给药后天数）
0
7
14
21
28
35
42
49
56

图 6

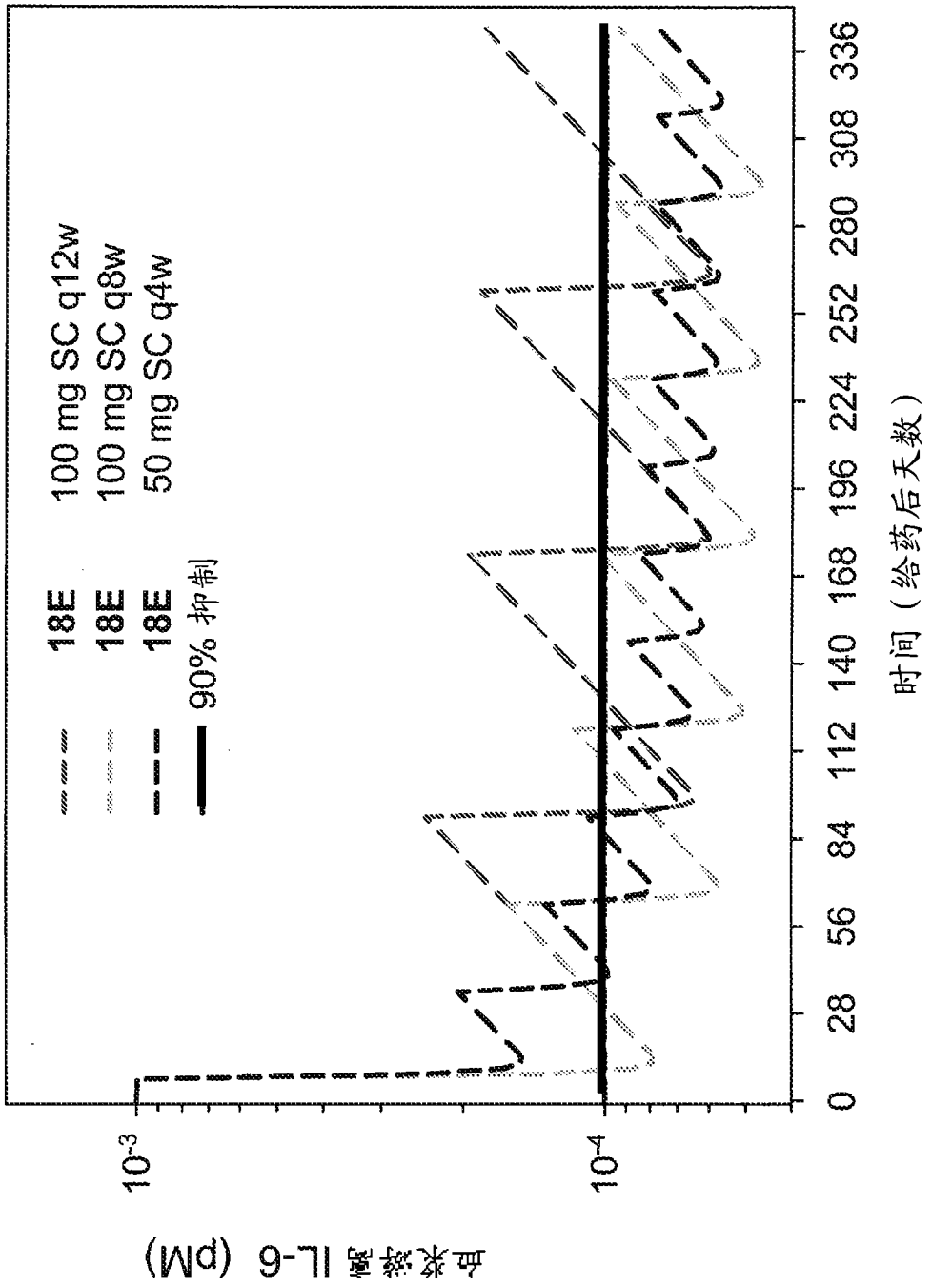

18E 100 mg SC q12w
18E 100 mg SC q8w
18E 50 mg SC q4w
90% 抑制
血浆游离 IL-6 (pM)
10^{-3}
10^{-4}
0 28 56 84 112 140 168 196 224 252 280 308 336
时间（给药后天数）

图 7

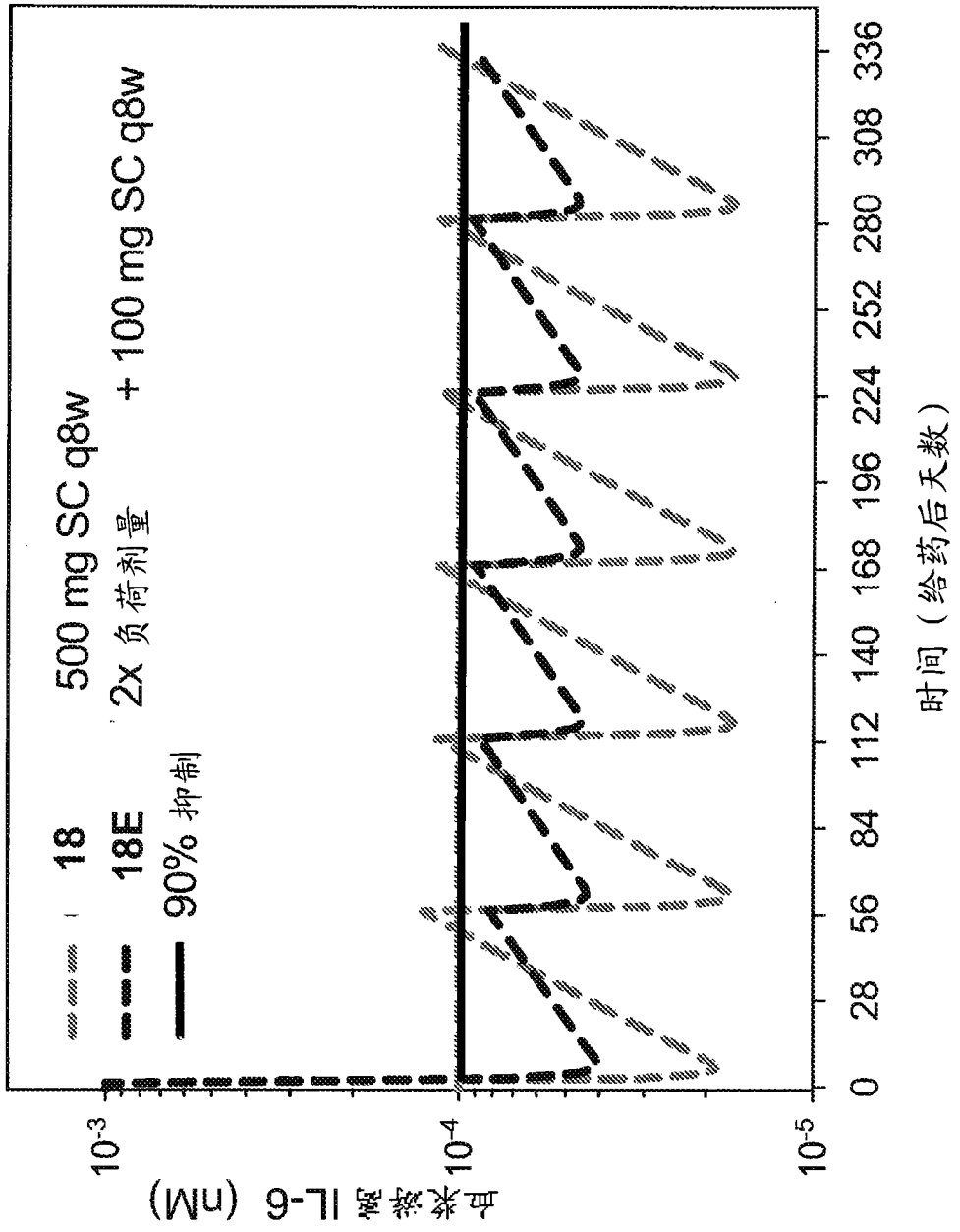

18
18E
90% 抑制
500 mg SC q8w
2x 负荷剂量
+ 100 mg SC q8w
血浆游离 IL-6 (nM)
10^{-3}
10^{-4}
10^{-5}
0
28
56
84
112
140
168
196
224
252
280
308
336
时间（给药后天数）

图 8

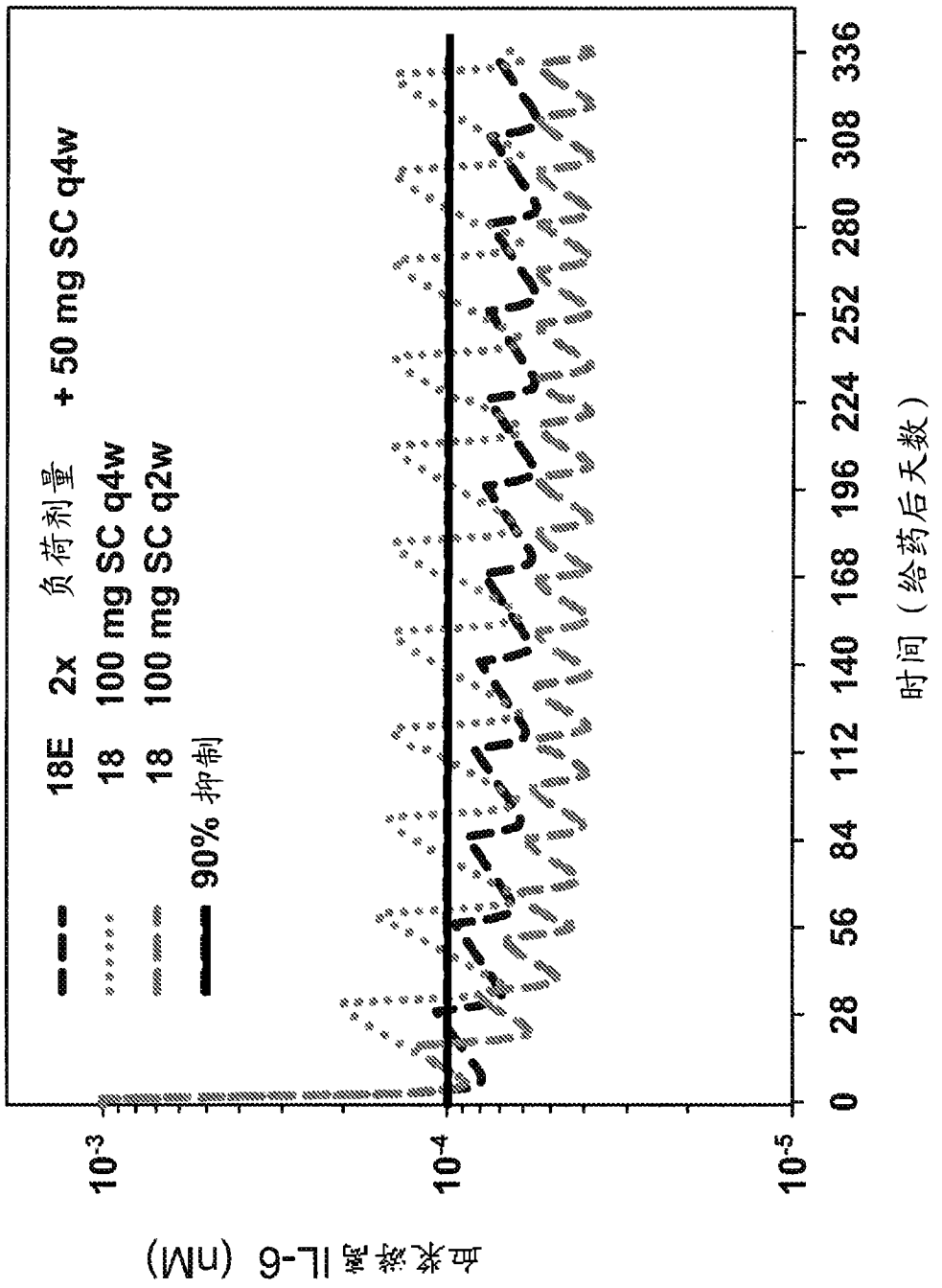

18E 2x 负荷剂量 + 50 mg SC q4w
18 100 mg SC q4w
18 100 mg SC q2w
90% 抑制
血浆游离 IL-6 (nM)
10-3
10-4
10-5
0 28 56 84 112 140 168 196 224 252 280 308 336
时间（给药后天数）

图 9

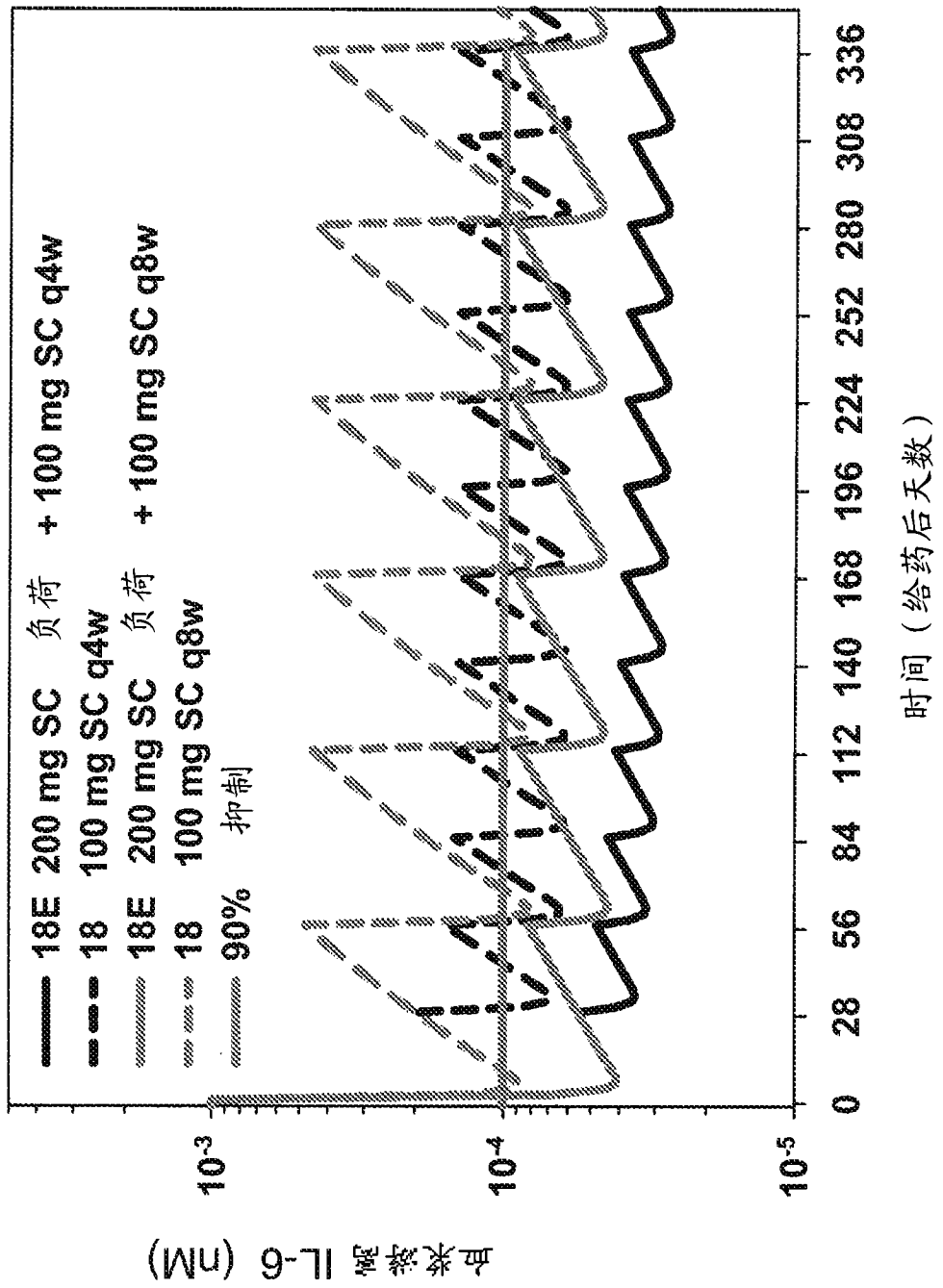

18E 200 mg SC 负荷 + 100 mg SC q4w
18 100 mg SC q4w
18E 200 mg SC 负荷 + 100 mg SC q8w
18 100 mg SC q8w
90% 抑制
血浆游离 IL-6 (nM)
10-3
10-4
10-5
0 28 56 84 112 140 168 196 224 252 280 308 336
时间（给药后天数）

图 10

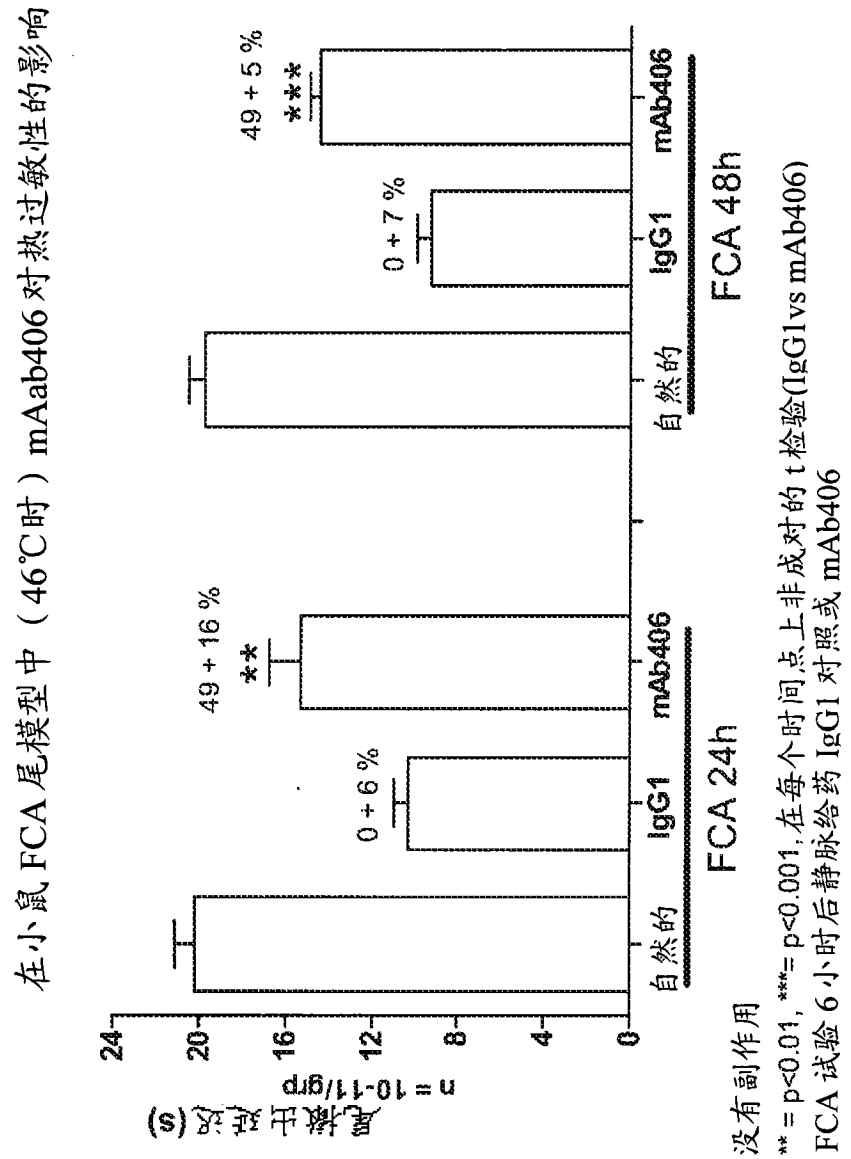

在小鼠 FCA 尾模型中（46℃时）mAab406 对热过敏性的影响
n = 10-11/grp
0
4
8
12
16
20
24
自然的
IgG1
mAb406
0 + 6 %
49 + 16 %
**
FCA 24h
自然的
IgG1
mAb406
0 + 7 %
49 + 5 %
***
FCA 48h
没有副作用
** = p<0.01, *** = p<0.001, 在每个时间点上非成对的 t 检验(IgG1vs mAb406)
FCA 试验 6 小时后静脉给药 IgG1 对照或 mAb406

图 11

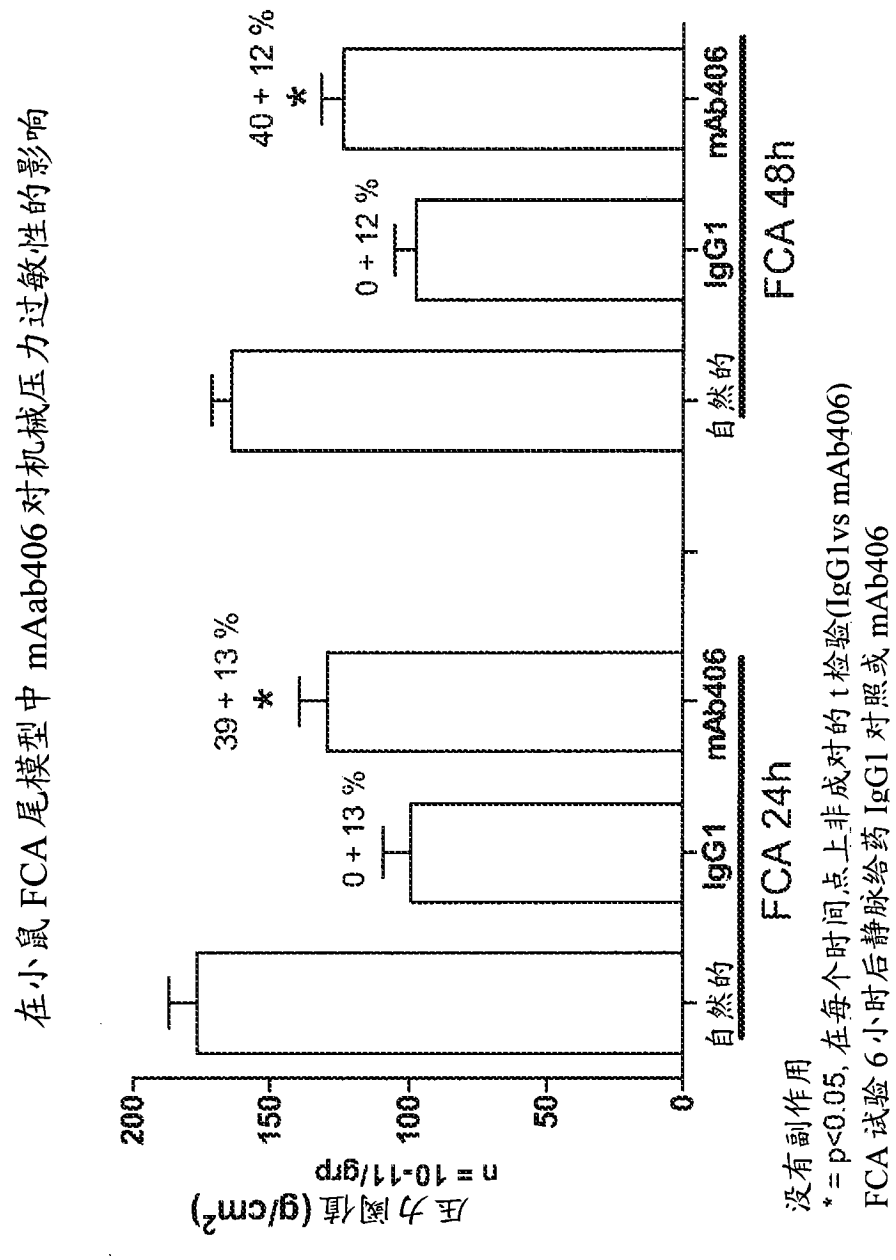

在小鼠 FCA 尾模型中 mAab406 对机械压力过敏性的影响
压力阈值 (g/cm²)
n = 10-11/grp
200
150
100
50
0
0 + 13 %
39 + 13 %
*
0 + 12 %
40 + 12 %
*
自然的
IgG1
mAb406
自然的
IgG1
mAb406
FCA 24h
FCA 48h
没有副作用
* = p<0.05, 在每个时间点上非成对的 t 检验(IgG1vs mAb406)
FCA 试验 6 小时后静脉给药 IgG1 对照或 mAb406

图 12

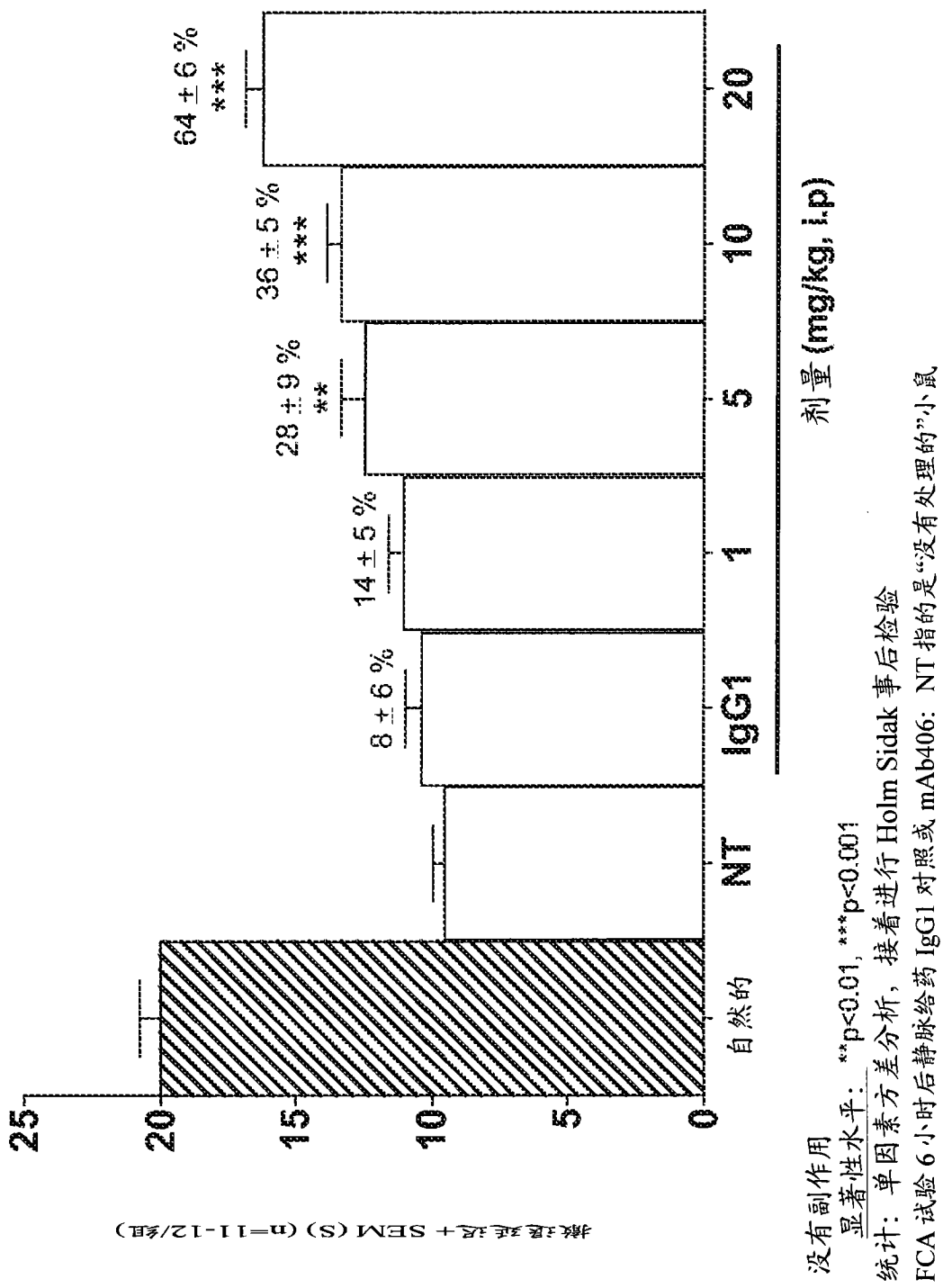

在小鼠 FCA24 小时模型中 mAab406 对热过敏性的影响
体温降低值 + SEM (S) (n=11-12/组)
25
20
15
10
5
0
自然的
NT
IgG1
1
5
10
20
剂量 (mg/kg, i.p)
8 ± 6 %
14 ± 5 %
28 ± 9 %
**
36 ± 5 %
***
64 ± 6 %
***
没有副作用
显著性水平：**p<0.01, ***p<0.001
统计：单因素方差分析，接着进行 Holm Sidak 事后检验
FCA 试验 6 小时后静脉给药 IgG1 对照或 mAb406: NT 指的是“没有处理的”小鼠

图 13

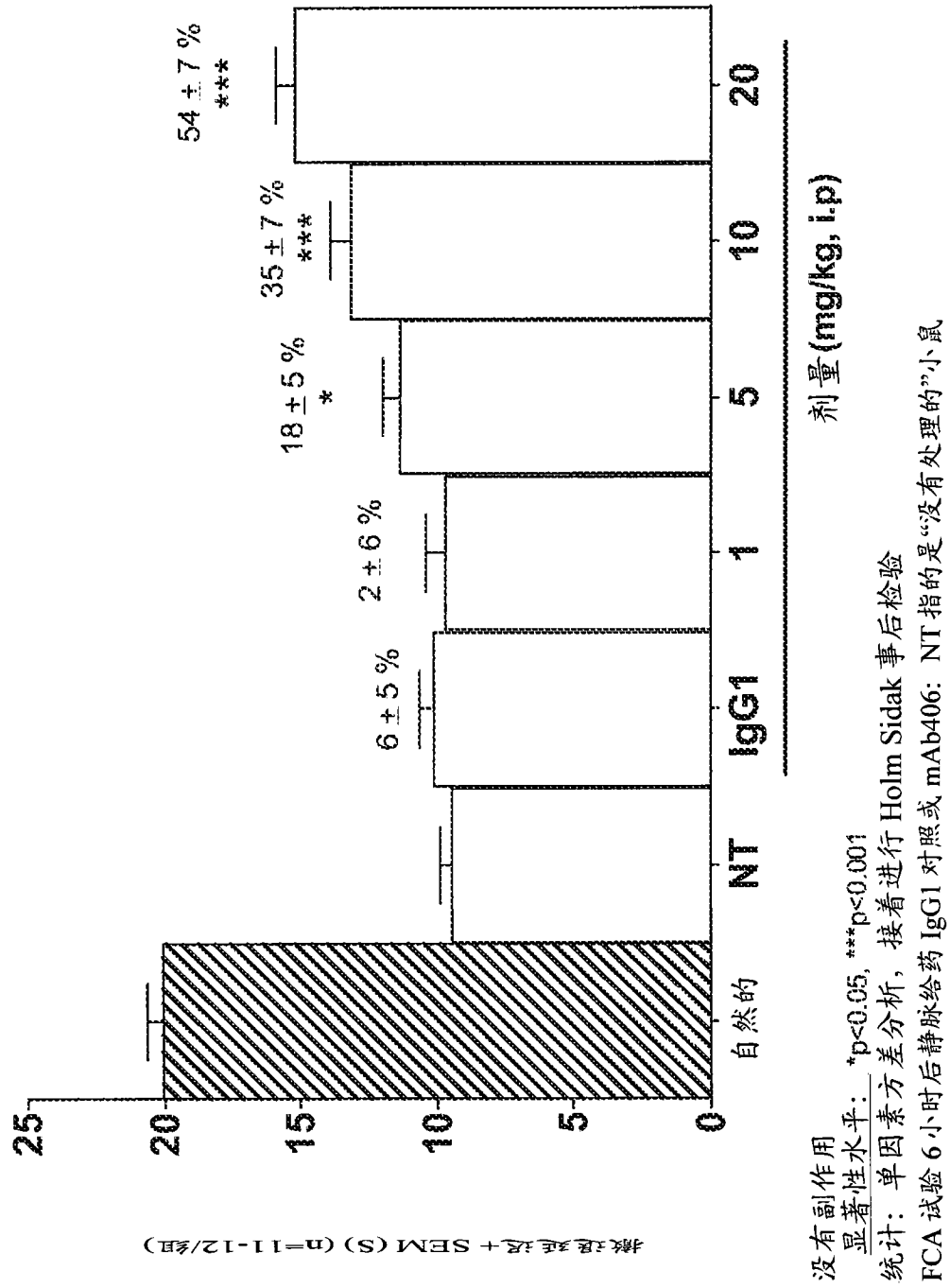

在小鼠 FCA48 小时模型中 mAb406 对热过敏性的剂量依赖型影响
热痛觉基线 + SEM (S) (n=11-12/组)
25
20
15
10
5
0
自然的
NT
IgG1
1
5
10
20
剂量(mg/kg, i.p)
6 ± 5 %
2 ± 6 %
18 ± 5 %
*
35 ± 7 %
***
54 ± 7 %
***
没有副作用
显著性水平：*p<0.05, ***p<0.001
统计：单因素方差分析，接着进行 Holm Sidak 事后检验
FCA 试验 6 小时后静脉给药 IgG1 对照或 mAb406: NT 指的是“没有处理的”小鼠

图 14

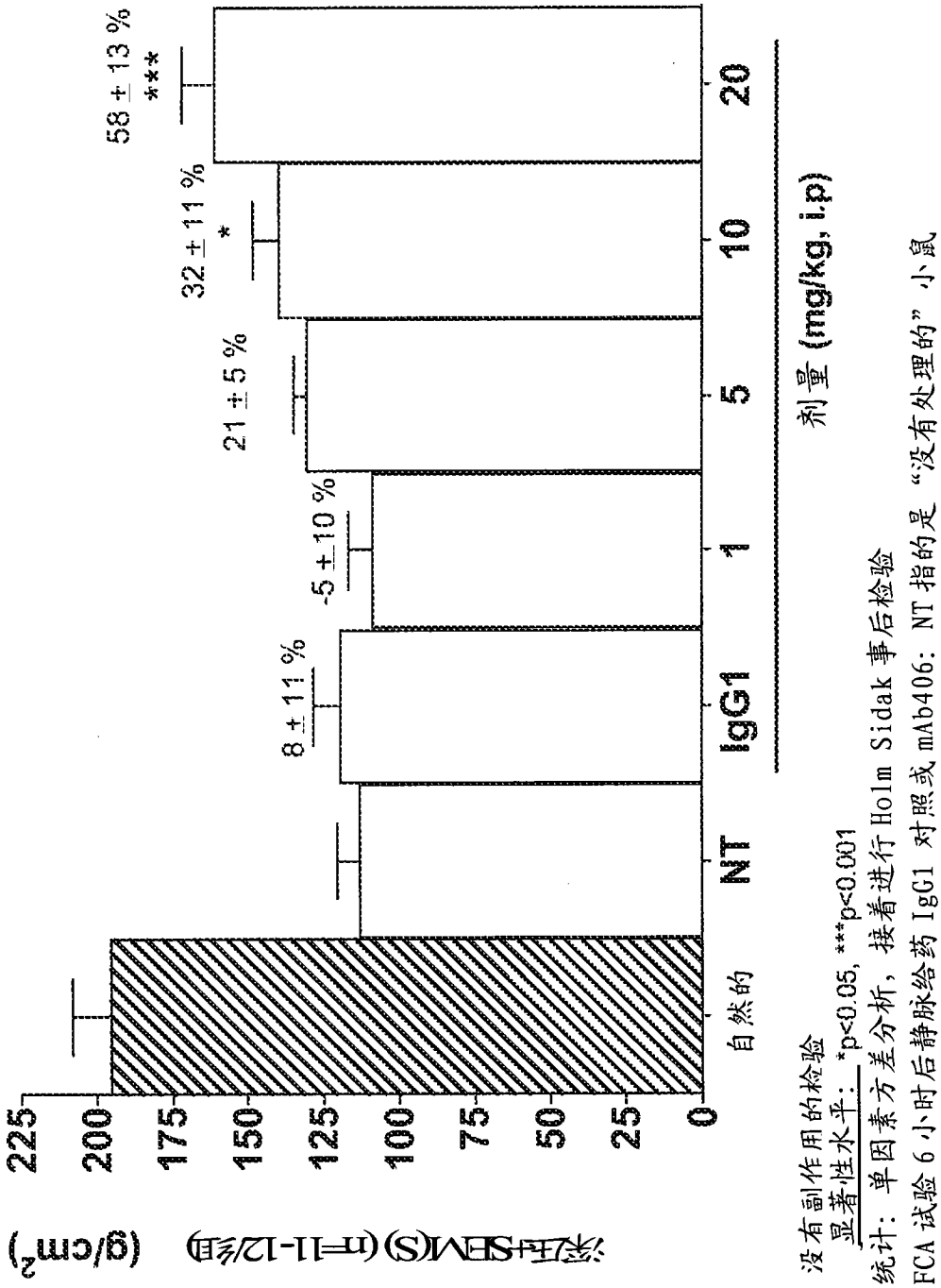

在小鼠 FCA24 小时模型中 mAb406 对机械压力过敏性的剂量依赖型影响
没有副作用的检验
显著性水平：*p<0.05, ***p<0.001
统计：单因素方差分析，接着进行 Holm Sidak 事后检验
FCA 试验 6 小时后静脉给药 IgG1 对照或 mAb406：NT 指的是“没有处理的”小鼠
剂量 (mg/kg, i.p)
自然的
NT
IgG1
1
5
10
20
0
25
50
75
100
125
150
175
200
225
8 ± 11 %
-5 ± 10 %
21 ± 5 %
32 ± 11 %
58 ± 13 %
*
***

图 15

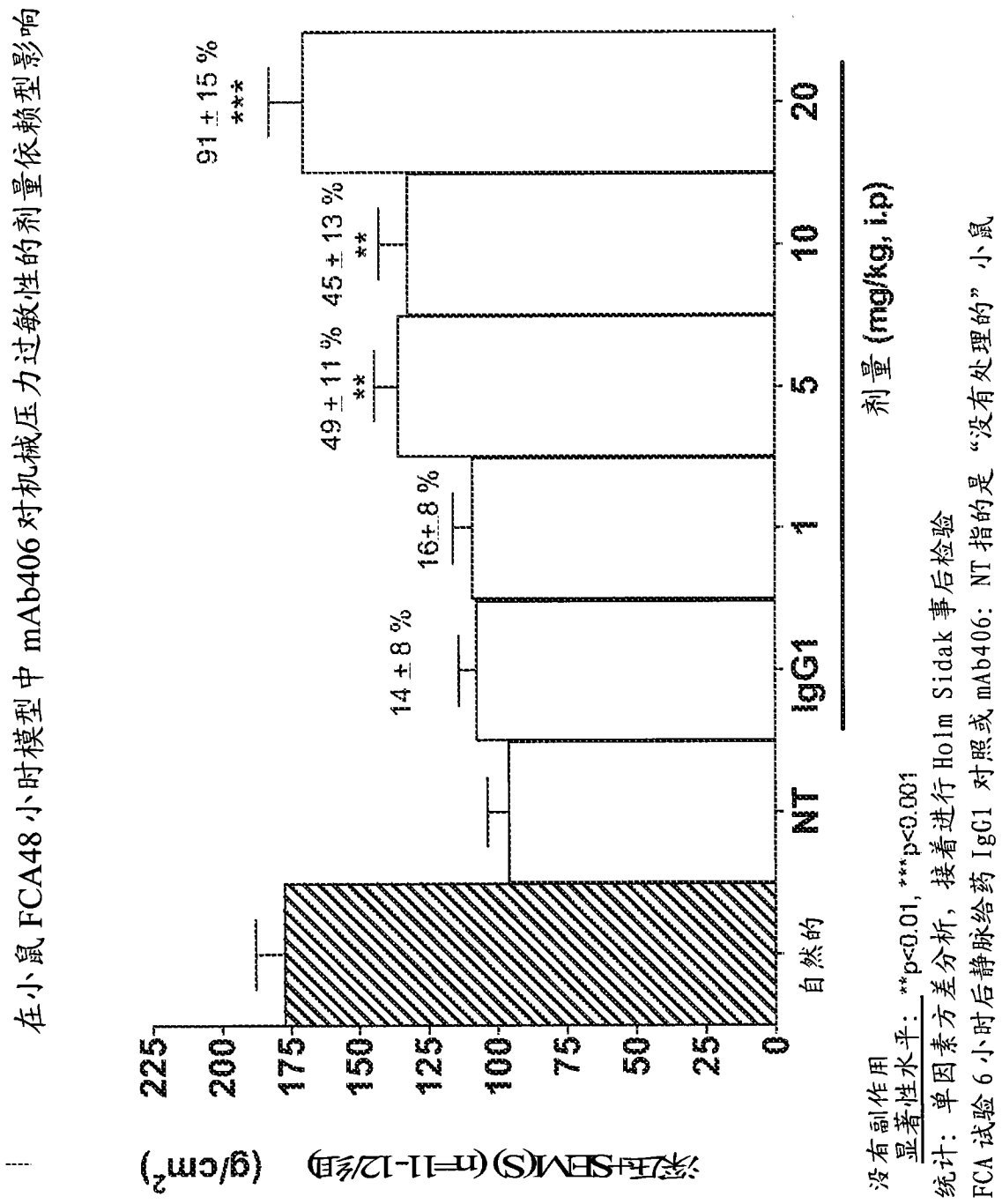

在小鼠 FCA48 小时模型中 mAb406 对机械压力过敏性的剂量依赖型影响
没有副作用
显著性水平：**p<0.01, ***p<0.001
统计：单因素方差分析，接着进行 Holm Sidak 事后检验
FCA 试验 6 小时后静脉给药 IgG1 对照或 mAb406：NT 指的是“没有处理的”小鼠
剂量 (mg/kg, i.p)
自然的
NT
IgG1
1
5
10
20
0
25
50
75
100
125
150
175
200
225
14 ± 8 %
16± 8 %
49 ± 11 %
45 ± 13 %
91 ± 15 %
**
**
***

图 16

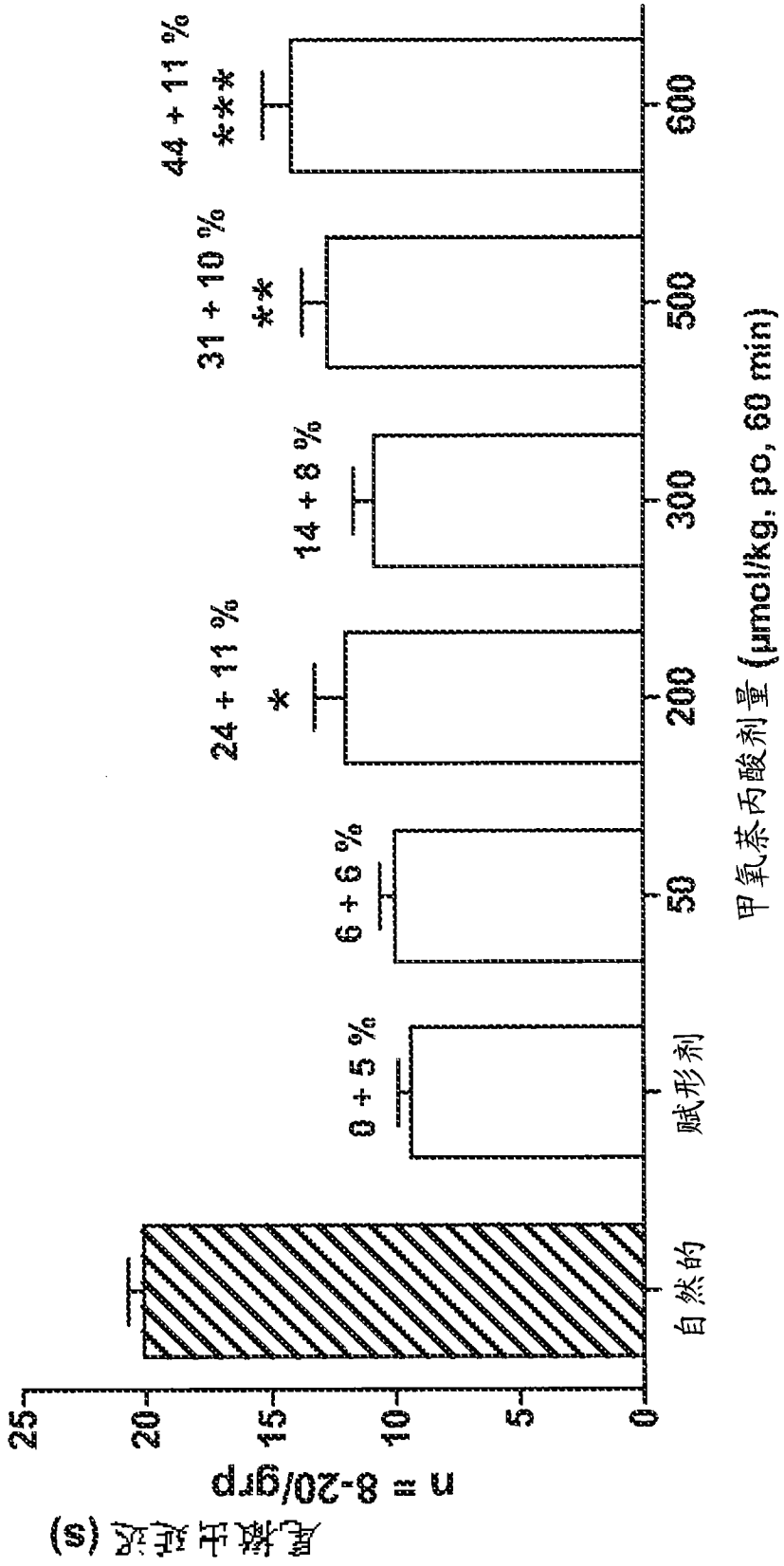

在 48 小时在小鼠 FCA 尾模型中，小分子甲氧苯丙酸对热过敏性的影响
爪舔出现潜伏期 (s)
n = 8-20/grp
25
20
15
10
5
0
自然的
赋形剂
3 + 5 %
6 + 6 %
24 + 11 %
14 + 8 %
31 + 10 %
44 + 11 %
*
**
***
50
200
300
500
600
甲氧苯丙酸剂量 (µmol/kg, po, 60 min)
副作用：无
* = p<0.05, ** = p<0.01, ***p<0.001, 单因素方差分析一侧的 Holm Sidak 事后检验

图 17

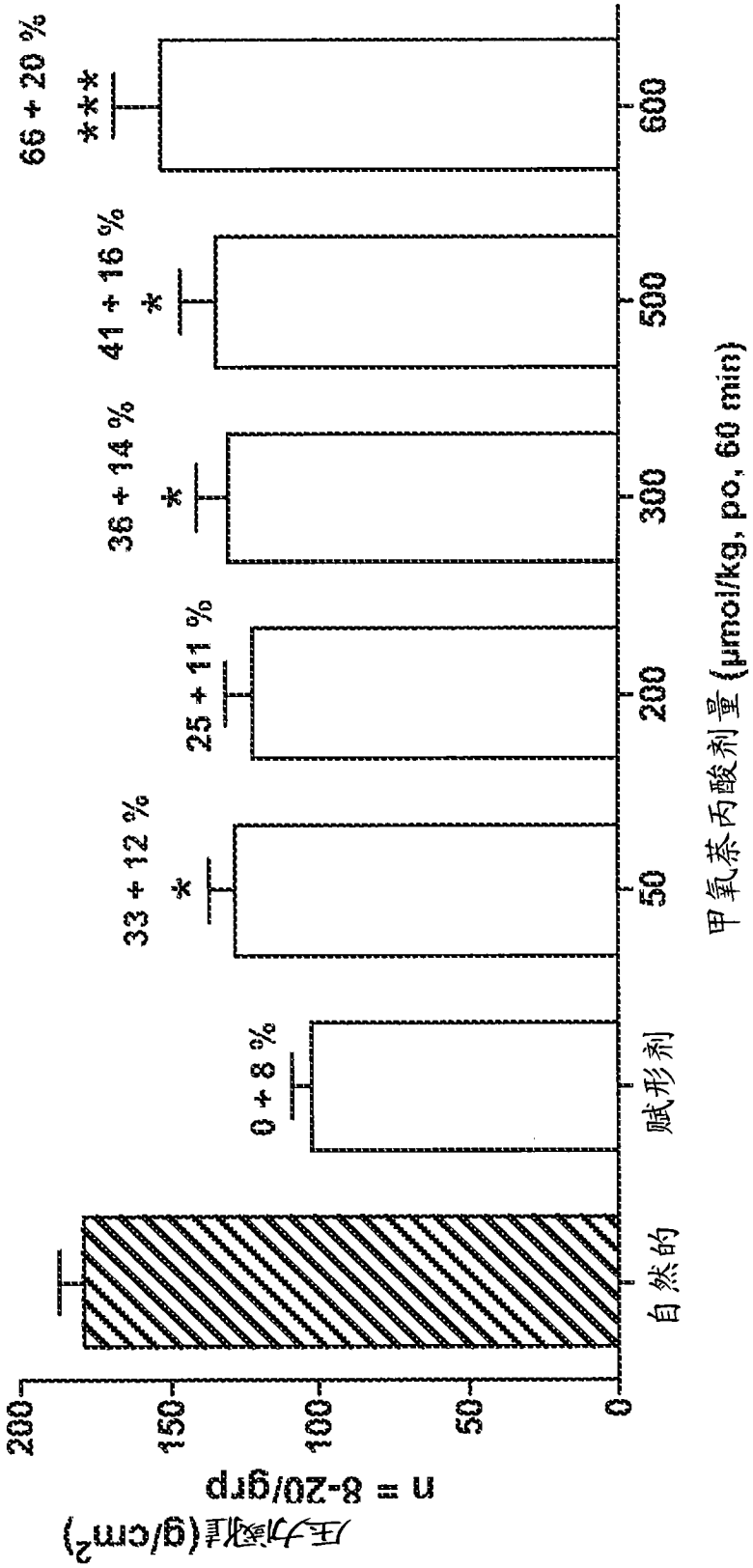

在 48 小时在小鼠 FCA 尾模型中，小分子甲氧萘丙酸对机械压力过敏性的影响
压力阈值(g/cm²)
n = 8-20/grp
200
150
100
50
0
自然的
赋形剂
0 + 8 %
33 + 12 %
*
25 + 11 %
36 + 14 %
*
41 + 16 %
*
66 + 20 %
***
0
50
200
300
500
600
甲氧萘丙酸剂量 (µmol/kg, po, 60 min)
副作用：无
* = p<0.05, ***p<0.001, 单因素方差分析一侧的 Holm Sidak 事后检验

图 18