

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810081356.7

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008年8月13日

[11] 公开号 CN 101239185A

[22] 申请日 1999.3.16

[21] 申请号 200810081356.7

分案原申请号 99805209.4

[30] 优先权

[32] 1998.3.17 [33] JP [31] 67250/1998

[71] 申请人 中外制药株式会社

地址 日本东京

共同申请人 岸本忠三

[72] 发明人 岸本忠三 伊藤裕章 山本光成

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商  
标事务所

代理人 陈昕

权利要求书 3 页 说明书 29 页

[54] 发明名称

一种包含 IL-6 拮抗剂活性成分的炎性肠道疾病的预防或治疗剂

[57] 摘要

一种炎性肠道疾病如节段性回肠炎和溃疡性结肠炎的预防或治疗剂，该药剂包含作为活性成分白细胞介素-6 (IL-6) 拮抗剂，如针对 IL-6 受体的抗体。

1. 一种包含白细胞介素-6 (IL-6) 拮抗剂作为活性成分的炎性肠道疾病的预防或治疗剂。
2. 根据权利要求1的预防或治疗剂, 其中IL-6拮抗剂为针对IL-6受体的抗体。
3. 根据权利要求2的预防或治疗剂, 其中针对IL-6受体的抗体为一种针对IL-6受体的单克隆抗体。
4. 根据权利要求3的预防或治疗剂, 其中针对IL-6受体的抗体为一种针对人IL-6受体的单克隆抗体。
5. 根据权利要求3的预防或治疗剂, 其中针对IL-6受体的抗体是一种针对小鼠IL-6受体的单克隆抗体。
6. 根据权利要求2~5中任何一项的预防或治疗剂, 其中针对IL-6受体的抗体是一种重组抗体。
7. 根据权利要求4的预防或治疗剂, 其中针对人IL-6受体的单克隆抗体是PM-1抗体。
8. 根据权利要求5的预防或治疗剂, 其中针对小鼠IL-6受体的单克隆抗体是MR16-1抗体。
9. 根据权利要求2~4中任何一项的预防或治疗剂, 其中针对IL-6受体的抗体为针对IL-6受体的嵌合抗体或人源化抗体。
10. 根据权利要求9的预防或治疗剂, 其中针对IL-6受体的人源化抗体为人源化PM-1抗体。
11. 根据权利要求1~10中任何一项的预防或治疗剂, 其中炎性肠道疾病为节段性回肠炎或溃疡性结肠炎。
12. 一种抑制炎性肠道疾病中体重减轻的药剂, 所述药剂包含IL-6拮抗剂作为活性成分。
13. 一种抑制炎性肠道疾病中体重减轻的药剂, 所述药剂包含针对IL-6受体的抗体作为活性成分。

14. 一种预防或治疗炎性肠道疾病的方法，该方法包含给对象施用白细胞介素-6 (IL-6) 拮抗剂。

15. 根据权利要求14的方法，其中IL-6拮抗剂为针对IL-6受体的抗体。

16. 根据权利要求15的方法，其中针对IL-6受体的抗体为一种针对IL-6受体的单克隆抗体。

17. 根据权利要求16的方法，其中针对IL-6受体的抗体为一种针对人IL-6受体的单克隆抗体。

18. 根据权利要求16的方法，其中针对IL-6受体的抗体为一种针对小鼠IL-6受体的单克隆抗体。

19. 根据权利要求15~18中任何一项的方法，其中针对IL-6受体的抗体是一种重组抗体。

20. 根据权利要求17的方法，其中针对人IL-6受体的单克隆抗体是PM-1抗体。

21. 根据权利要求18的方法，其中针对小鼠IL-6受体的单克隆抗体为MR16-1抗体。

22. 根据权利要求15~17中任何一项的方法，其中针对IL-6受体的抗体为针对IL-6受体的嵌合抗体或人源化抗体。

23. 根据权利要求22的方法，其中针对IL-6受体的人源化抗体为人源化PM-1抗体。

24. 根据权利要求14~23中任何一项的方法，其中炎性肠道疾病为节段性回肠炎或溃疡性结肠炎。

25. 一种抑制炎性肠道疾病中体重减轻的方法，该方法包含给对象施用IL-6拮抗剂。

26. 一种抑制炎性肠道疾病体重减轻的方法，该方法包含给对象施用针对IL-6受体的抗体。

27. 白细胞介素-6 (IL-6) 拮抗剂用于制备炎性肠道疾病预防或治疗剂的用途。

28. 根据权利要求27的用途，其中IL-6拮抗剂为针对IL

- 6 受体的抗体。

29. 根据权利要求 28 的用途，其中针对 IL-6 受体的抗体为针对 IL-6 受体的单克隆抗体。

30. 根据权利要求 29 的用途，其中针对 IL-6 受体的抗体为针对人 IL-6 受体的单克隆抗体。

31. 根据权利要求 29 的用途，其中针对 IL-6 受体的抗体为针对小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体。

32. 根据权利要求 28~31 中任何一项的用途，其中针对 IL-6 受体的抗体是一种重组抗体。

33. 根据权利要求 30 的用途，其中针对人 IL-6 受体的单克隆抗体为 PM-1 抗体。

34. 根据权利要求 31 的用途，其中针对小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体为 MR16-1 抗体。

35. 根据权利要求 28~30 中任何一项的用途，其中针对 IL-6 受体的抗体为针对 IL-6 受体的嵌合抗体或人源化抗体。

36. 根据权利要求 35 的用途，其中针对 IL-6 受体的人源化抗体为人源化 PM-1 抗体。

37. 根据权利要求 27~36 中任何一项的用途，其中炎性肠道疾病为节段性回肠炎或溃疡性结肠炎。

38. IL-6 拮抗剂用于生产抑制炎性肠道疾病中体重减轻的药剂的用途。

39. 针对 IL-6 受体的抗体用于生产抑制炎性肠道疾病中体重减轻的药剂的用途。

## 一种包含 IL-6 拮抗剂 活性成分的炎性肠道疾病的预防或治疗剂

本申请是同名中国专利申请第 99805209.4 号的分案申请, 原案国际申请号为 PCT/JP99/01298, 国际申请日为 1999 年 3 月 16 日。

### 技术领域

本发明涉及一种包含白细胞介素-6 (IL-6) 拮抗剂作为活性成分的炎性肠道疾病的预防或治疗剂。本发明还涉及一种包含 IL-6 拮抗剂活性成分的节段性回肠炎或溃疡性结肠炎的预防或治疗剂。

### 发明背景

IL-6 是一种细胞因子, 也称为 B 细胞刺激因子 2 (BSF2) 或干扰素 $\beta$ 2。IL-6 作为一种参与激活 B 淋巴细胞的分化因子被发现 (Hirano, T 等人, 自然 (Nature), (1986) 324, 73-76)。随后发现 IL-6 是一种影响细胞多种功能的多功能细胞因子 (Akira, S 等人, 免疫学进展 (Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78)。曾经报道 IL-6 诱导 T-淋巴细胞的成熟 (Lotz, M 等人, 实验医学杂志 (J.Exp.Med.) (1988) 167, 1253-1258)。

IL-6 通过细胞上两种蛋白质传递其生物学信号。其中一种是 IL-6 受体, 其为分子量约为 80kD 的 IL-6 结合蛋白 (Taga, T 等人, 实验医学杂志 (1987) 166, 967-981; Yamasaki, K 等人, 科学 (Science) (1987) 241, 825-828)。IL-6 受体不仅以膜结合形式存在, 具有表达于细胞表面的跨膜结构域, 而且可以是主要包括胞外区的可溶性 IL-6 受体。

另外一种蛋白质为分子量约 130kD 的膜结合蛋白 gp130, 它参与非配体结合的信号传导。IL-6 和 IL-6 受体形成 IL-6/IL-6 受体复合物, 在与 gp130 结合之后传递其生物学信号给细胞 (Taga, 7 等人, 细胞 (Cell) (1989) 58, 573-581)。

IL-6 的拮抗剂是指抑制 IL-6 生物学活性传导的物质。到目前为止已知的 IL-6 拮抗剂有抗 IL-6 抗体 (抗-IL-6 抗体)、

抗 IL-6 受体的抗体（抗-IL-6 受体抗体）、抗 gp130 抗体（抗-gp130 抗体）以及抗改构的 IL-6、IL-6 或 IL-6 受体的部分肽段的抗体等。

抗-IL-6 受体的抗体已有几篇报道描述（Novick D.等人，杂交瘤(Hybridoma)(1991) 10, 137-146; Huang, Y. W.等人，杂交瘤(1993) 12, 621-630; 国际专利公开文本 WO 95/1) 09673; 法国专利申请 FR 2694767; 美国专利 US 5216287）。已知人源化 PM-1 抗体可通过将小鼠 PM-1 抗体的互补决定区(CDR)（Hirata, Y 等人，免疫学杂志(J. Immunology) (1989) 143, 2900-2906）移植到一种人模板抗体中获得（国际专利公开文本 WO 92-19759）。

炎性肠道疾病（IBD）是一种非特异的炎症，表现为溃疡性结肠炎和节段性回肠炎。在疾病初期已有免疫学紊乱介入，但这并不能阐明其病原学。然而可以认为，聚集在损害部位的单核细胞和淋巴细胞也参与了粘膜的损害，并且炎性介质尤其是细胞因子（如 IL1 $\beta$ 、TNF $\alpha$ 和 IL-6）引起特别的关注。

由于 IL-6 属于炎性介质，因而它与疾病程度的关系或是否可作为 IBD 的特异指数的关系已经引起关注。在节段性回肠炎和溃疡性结肠炎病人中 IL-6 的血清水平均有增长，并且该水平与疾病的状态有关（Holtkamp, W.等人，临床胃肠病学杂志(J. Clin. Gastroenterology) (1995) 20, 1230126; Niederau, C.等人，肝-胃肠病学(Hepto-Gastroenterdogy)(1997) 44, 90-107）。以 PCR（聚合酶链式反应）产物作为对组织中 IL-6 mRNA 含量的测定表明，其含量与溃疡性结肠炎和节段性回肠炎的疾病程度密切相关（Stevens, C 等人，Dig. Dis. Sci. (1992) 37, 818-826）。关于 IBD 活动期 IL-6 的增长，分析其机制发现，当固有层的单核细胞受到商陆细胞分裂原的刺激之后，其产量与疾病状况有很好的相关性。（Reinecker, H-C 等人，临床实验免疫学(Clin. Exp. Immunol.) (1993) 94, 174-181）。

随后，在来自固有层的单核细胞培养物中以及病人粘膜的组织培养物中观察到 IL-6 产量与疾病程度的相关性。在前者的观

察中还显示出粘膜组织产生 IL-6 的细胞数目也有所增加。单核细胞中最重要的产 IL-6 的细胞为巨噬细胞，并且证实有大量的 CD68 阳性巨噬细胞在 IBD 病人活动期在固有层中大量产生 IL-6 (Kusugami, K. 等人, *Dig. Dis.Sci.* (1995), 40, 949-959)。

此外还发现 IL-6 的产生与节段性回肠炎病人的内窥镜观察相关 (Reinund, J.-M. 等人, *肠道(Gut)*(1996) 39, 684-689)。此外, 还有一些报道血清中不仅 IL-6 而且可溶性 IL-6 受体的浓度与疾病程度密切相关 (Mitsuyma, K 等人, *肠道* (1995) 36, 45-49)。

至于除了 IL-6 的其它炎性介质, IL-1 $\beta$  的产量也已知与疾病状况相关。另一方面, 这并不总是正确, 因为 TNF- $\alpha$  可能在疾病处于低活性时产量往往较高。(Reinecker, H.-C 等人, *临床实验免疫学*(1993) 94, 174-181; Reimund, J.-M. 等人, *肠道*(1996) 39, 684-639)。

当今治疗 IBD 的方法包括将饮食和所开的药物相结合, 如水杨酰偶氮磺胺吡啶、肾上腺皮质激素等。然而一些病人由于副作用无法耐受这些药物, 就长期用药而言会由此产生一些问题。

另一方面, 通过抑制细胞因子活性改善疾病状况作为一种新的 IBD 治疗方法正在进行尝试。其主要靶标为 IL-1 和 TNF- $\alpha$  (Van Deventer, S.J.H. *肠道*(1997) 40, 443-448); 对于 IL-1, 一种 IL-1 受体拮抗剂 (Comineui F. 等人, *胃肠病学*(1992) 103, 65-71) 和一种 IL-1 抑制剂 CGP 47969A (Casini-Raggi 等人, *胃肠病学*(1995) 109, 812-818) 等正在进行临床或实验动物水平的研究。对于 TNF- $\alpha$ , 已经给节段性回肠炎病人施用了特异的单克隆抗体, 并观察到细胞因子活性减弱以及溃疡治愈。(Van Dullemen, H. M. 等人, *胃肠病学*(1995) 109, 129-135)。然而, IL-6 拮抗剂能够治疗 IBD, 以特异地抑制 IL-6 的生物学活性并不为人所知。

## 发明公开

本发明的目的是提供一种无上述缺点的炎性肠道疾病的预防

或治疗剂。

因此，本发明提供（1）一种包含 IL-6 拮抗剂作为活性成分的炎性肠道疾病的预防或治疗剂。

本发明也提供（2）一种包含针对 IL-6 受体的抗体作为活性成分的炎性肠道疾病的预防或治疗剂。

本发明也提供（3）一种包含针对 IL-6 受体的单克隆抗体作为活性成分的炎性肠道疾病的预防或治疗剂。

本发明也提供（4）一种包含针对人 IL-6 受体的单克隆抗体作为活性成分的炎性肠道疾病的预防或治疗剂。该针对人 IL-6 受体的单克隆抗体优选为 PM-1 抗体。

本发明也提供（5）一种包含针对小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体作为活性成分的炎性肠道疾病的预防或治疗剂。该针对小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体优选为 MR16-1 抗体。

本发明也提供（6）一种包含针对 IL-6 受体的重组抗体作为活性成分的炎性肠道疾病的预防或治疗剂。该针对 IL-6 受体的重组抗体优选为具有人抗体的恒定区（C 区）。

本发明也提供（7）一种包含针对 IL-6 受体的嵌合或人源化抗体作为活性成分的炎性肠道疾病的预防或治疗剂。

本发明也提供（8）一种包含人源化 PM-1 抗体作为活性成分的炎性肠道疾病的预防或治疗剂。

本发明也提供（9）一种包含以上（1）-（8）描述的 IL-6 拮抗剂作为活性成分的节段性回肠炎或溃疡性结肠炎的预防或治疗剂。

本发明也提供（10）一种包含以上（1）-（8）所述的 IL-6 拮抗剂作为活性成分的抑制炎性肠道疾病病人体重减轻的药物。

本发明也提供（11）一种包含以上（3）-（8）所述的 IL-6 拮抗剂作为活性成分的抑制炎性肠道疾病病人体重减轻的药物。

## 本发明的实施方案

本发明中使用的 IL-6 拮抗剂可以是任何来源、任何种类、

任何形式，只要它们具有对炎性肠道疾病的预防或治疗效果，或者具有控制炎性肠道疾病病人体重减轻的效果。

IL-6拮抗剂阻抑IL-6介导的信号传导，抑制IL-6的生物学活性。作为IL-6拮抗剂，优先提到的为抗-IL-6抗体、抗-IL-6受体抗体、抗-gp130抗体、改构IL-6、改构的可溶性IL-6受体、IL-6或IL-6受体的部分肽段、以及具有以上相同活性的低分子量物质。

本发明中使用的抗-IL-6抗体可作为多克隆或单克隆抗体采用已知方法获得。用作本发明的抗-IL-6抗体，优选特别是哺乳动物来源的单克隆抗体。哺乳动物来源的单克隆抗体包括杂交瘤产生的单克隆抗体，以及由包含基因工程抗体基因的表达载体转化的宿主细胞生产的重组抗体。这些抗体通过与IL-6结合，阻断IL-6和IL-6受体的结合，并由此阻断IL-6生物学活性的信号传导至细胞内。

这些抗体的实施例包括MH 166(Matsuda等人，欧洲免疫学杂志(Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956)和SK2抗体(Sato, K等人，The 21<sup>st</sup> Nihon Mennekigakkai Soukai (日本免疫学会年会)，学术记录(1991) 21, 166)等抗体。

生产抗-IL-6抗体的杂交瘤可基本上采用以下已知的方法进行构建。因此，IL-6可用作免疫的传统方法中的致敏抗原。由此获得的免疫细胞在传统的细胞融合方法中与已知的亲本细胞融合，然后通过常规的筛选方法筛选出生产单克隆抗体的细胞，制备所需杂交瘤。

特别地，抗-IL-6抗体可按以下方式获得。例如，为获得抗体用作致敏抗原的人IL-6可运用IL-6基因/氨基酸序列获得，该序列发表在欧洲生物化学杂志(Eur. J. Biochem (1987) 168, 543-550; 免疫学杂志(1988) 140, 1534-1541; 或农业生物化学(Agr. Biol. Chem.) (1990) 54, 2685-2688)。

通过将IL-6基因插入一已知的表达载体系统，转化适宜的宿主细胞后，IL-6蛋白质可从宿主细胞或其培养上清液中纯化出

来。纯化的 IL-6 蛋白质可用作致敏抗原。或另外选择 IL-6 蛋白质与另一种蛋白质的融合蛋白用作致敏抗原。

本发明中使用的抗-IL-6 受体的抗体可作为多克隆或单克隆抗体采用已知的方法获得。用作本发明的抗-IL-6 抗体, 优选单克隆抗体尤其是哺乳动物来源的单克隆抗体。哺乳动物来源的单克隆抗体包括那些杂交瘤生产的, 以及那些由包含基因工程抗体基因的表达载体转化的宿主细胞所生产的单克隆抗体。这些抗体通过与 IL-6 受体结合, 抑制 IL-6 与 IL-6 受体的结合, 由此阻断 IL-6 的生物学活性向细胞内传导。

这种抗体的实例包括 MR16-1 抗体 (Tamura, T., 等人, 美国国家科学院院报 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924-11928), PM-1 抗体 (Hirata 等人, 免疫学杂志 (1989) 143, 2900-2906), 或 AUK12-20 抗体, AUK 64-7 抗体或 AUK 146-15 抗体 (国际专利公开号 WO 92-19759) 等等。其中 PM-1 抗体最为优选。

生产 PM-1 抗体的杂交瘤细胞系已遵照布达佩斯协议的条款于 1989 年 7 月 12 日以 PM-1 国际保藏于国家生物科学和人类技术研究所, 工业科学和技术机构 1-3 Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki pref. 日本, 保藏号 BP-2998。此外, 生产 MR16-1 抗体的杂交瘤细胞系已经遵照布达佩斯协议条款于 1997 年 3 月 13 日以 MR16-1 国际保藏于国家生物科学和人类技术研究所, 工业科学和技术机构 1-3 Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki pref. 日本保藏号 BP-5875。

生产抗-IL-6 受体的单克隆抗体的杂交瘤基本上可按照下面描述的已知方法进行构建。因此 IL-6 受体可按照免疫的常规方法用作致敏抗原。由此获得的免疫细胞以常规的细胞融合方法与亲本细胞融合, 然后通过常规的筛选方法筛选出单克隆抗体生产细胞, 以制备所需的杂交瘤。

特别地, 抗-IL-6 受体的抗体可按以下方式进行制备。例如, 为获得抗体用作致敏抗原的人 IL-6 受体可以采用欧洲专利

申请号 EP 325474 公开的 IL-6 受体基因序列/氨基酸序列而获得,小鼠 IL-6 受体可采用日本未审的专利公开号 3(1991)-155795 所公开的小鼠 IL-6 受体基因序列/氨基酸序列而获得。

有两种类型的 IL-6 受体蛋白质: 表达在细胞膜上的 IL-6 受体和脱离于细胞膜的 IL-6 受体(可溶性 IL-6 受体)(Yasukawa, K.等人, 生物化学杂志(J. Biochem.) (1990) 108, 673-676)。可溶性 IL-6 受体主要包括与细胞膜结合的 IL-6 受体的胞外区, 因此不同于膜结合的 IL-6 受体, 因为后者缺乏跨膜区或跨膜区和胞内区。任何 IL-6 受体均可用作 IL-6 受体蛋白质, 只要它可用于本发明中生产 IL-6 受体抗体的致敏抗原。

当 IL-6 受体的基因序列插入一已知的表达载体系统转化适宜的宿主细胞后, 所需的 IL-6 受体蛋白质可由已知方法从宿主细胞或其培养上清液中纯化出来。因而纯化的 IL-6 受体蛋白质可用作致敏抗原。另外可选择地, 表达 IL-6 受体或 IL-6 受体蛋白质与另一种蛋白质之融合蛋白的细胞可用作致敏抗原。

具有包含编码人 IL-6 受体的 cDNA 之质粒 pIBIBSF2R 的大肠杆菌, 已遵照布达佩斯协议的条款于 1989 年 1 月 9 日以 HB101 - pIBIBSF2R 国际保藏于国家生物科学和人类技术研究所, 保藏于工业科学和技术机构 1~3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki pref. 日本, 保藏号 BP-2232。

本发明采用的抗-gp 130 抗体可作为多克隆或单克隆抗体使用已知方法获得。用作本发明的抗-gp130 的抗体优选单克隆抗体尤其是哺乳动物来源的单克隆抗体。哺乳动物来源的单克隆抗体包括那些杂交瘤生产的, 以及那些经包含基因工程抗体基因的表达载体所转化的宿主细胞生产的单克隆抗体。这些抗体经与 gp130 结合, 抑制 IL-6/IL-6 受体复合物与 gp130 的结合, 由此阻断 IL-6 生物学活性向细胞内传导。

这样的抗体包括 AM64 抗体(日本未审专利公开号(kokai)3(1991)-219894)、4B11 抗体和 2H4 抗体(US 5571513)、B-S12 抗体和 B-P8 抗体(日本未审专利公开号

(kokai)B(1996)-291199)。

生产单克隆抗体的杂交瘤基本上可采用下面描述的方法建立。因而 gp130 可用作致敏抗原并以常规免疫方法用于免疫。由此获得的免疫细胞在常规细胞融合过程中与已知的亲本细胞融合，然后通过常规筛选方法筛选出所需的生产单克隆抗体的杂交瘤。

特别地，单克隆抗体可通过以下方式获得。例如，用作生产抗体的致敏抗原的 gp130 可通过欧洲专利申请号 EP 411946 公开的 gp130 基因序列/氨基酸序列获得。

当 gp130 基因插入一已知的表达载体系统后，转化一适宜的宿主细胞，gp130 蛋白质即可从宿主细胞或其培养上清液中纯化出来。纯化的 gp130 蛋白质可用作致敏抗原。另外可选择地，gp130 蛋白质和另一种蛋白质的融合蛋白可用作致敏抗原。

尽管对由致敏抗原免疫的哺乳动物并没有特别的限制，但选择应优先考虑其与用于细胞融合的亲本细胞的相容性，它们通常包括啮齿类动物例如小鼠、大鼠、仓鼠等等。

用致敏抗原免疫动物通常采用已知的方法进行。例如，一般的方法包括给哺乳动物腹膜内或皮下注射致敏抗原。特别地，已稀释并悬浮于适量磷酸缓冲盐液(PBS)或生理盐水中的致敏抗原，按需要与适宜量的传统佐剂混合，例如福氏完全佐剂。乳化后，优选地将其每 4 至 21 天分几次施用于哺乳动物。另外可选择地，在致敏抗原免疫哺乳动物时采用一种合适的载体。

免疫后证实血清中的所需抗体滴度确有增加，便从哺乳动物中取出免疫细胞进行细胞融合。优选的免疫细胞特别包括脾细胞。

与上述的免疫细胞进行细胞融合的另一亲本细胞哺乳动物骨髓瘤细胞，优选地包括多种已知的细胞系，例如 p3X63Ag 8.653(Kearney, J. F 等人, 免疫学杂志(1979) 123: 1548-1550)、p3X63Ag BU.1 (当今微生物学与免疫学专题(1978) 81:1-7)、NS-1 (Kohler, G. 和 Milstein, C., 欧洲免疫学杂志(1976) 6: 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. 等人, 细胞(1976) 8:

405~415)、SP2/0 (Shulman, M.等人, 自然(1978) 276:269-270)、FO(de st. Groth, S.F.等人, 免疫学方法(Immunol. Methods)(1980) 35:1~21, S194 (Trowbridge, I.S. 实验医学杂志, (1978)148: 313-323)、R210 (Galfré, G 等人, 自然(1979) 277:131-133) 等等。

上述经免疫的细胞和骨髓瘤细胞之间的细胞融合基本上可根据已知的方法进行, 例如 Milstein 等人描述的方法 (Kohler, G. 和 Milstein, C., 酶学方法(Methods Enzymol.) (1981) 73: 3-46) 等等。

更为特别地, 上述的细胞融合在常规的营养培养基中进行, 例如添加有细胞融合促进剂的液体培养基。可以用作细胞融合促进剂的例如聚乙二醇(PEG)、仙台病毒(HVJ)等等。此外, 可根据需要添加例如二甲基亚砷之类的佐剂以加强融合的效率。

采用的免疫细胞与骨髓瘤细胞优选的比例为, 例如免疫细胞比骨髓瘤细胞多 1 至 10 倍。用于上述细胞融合的培养基包括例如适宜以上骨髓瘤细胞系生长的 RPMI 1640 培养基和 MEM 培养基, 以及用于此类细胞培养的常规培养基, 并且可添加如胎牛血清(FCS)的血清添加剂。

细胞融合时, 将上述指定量的免疫细胞和骨髓瘤细胞在上述培养基中充分混匀, 并加入预热至约 37°C 的 PEG 溶液, 例如平均分子量约 1000 至 6000 的 PEG 溶液, 加至终浓度 30% 至 60% (w/v) 并混匀, 以获得所需的融合细胞(杂交瘤)。然后通过重复顺序添加适宜的培养基并离心, 可以去除不适合杂交瘤生长的上清液、融合剂等因素。

该杂交瘤通过在常规的选择培养基中培养进行选择, 例如, 选择培养基 HAT 培养基(一种包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的培养基)。一般在 HAT 培养基中持续培养一段时期, 通常几天至几星期, 这期间足以杀死除所需杂交瘤以外的细胞(非融合细胞)。采用常规的有限稀释法筛选并克隆产生所需抗体的杂交瘤。

除了通过用抗原免疫除人以外的动物获得上述杂交瘤, 还可

能用所需抗原或表达所需抗原的细胞体外致敏人淋巴细胞，所得的致敏 B 淋巴细胞与人骨髓瘤细胞（例如 U266）融合，以获得具有结合所需抗原或表达所需抗原细胞的活性的所需人抗体。（见日本已审专利公开号(kokoku)1(1989)-59878）。此外，一种具有一整套人抗体基因的转基因动物经抗原或表达抗原的细胞免疫后，可获得上述方法中的所需人抗体。（见国际专利公开号 WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 94/25585、WO 96/34096 和 WO 96/33735）。

由此建立的生产单克隆抗体的杂交瘤可以在常规培养基中培养，或可在液氮中长期保存。

为了从该杂交瘤中获得单克隆抗体，可采用以下方法：以常规方法培养该杂交瘤并从上清液中获得抗体，或者将该杂交瘤注入与其相容的哺乳动物腹腔中生长并从腹水中获得抗体。前者方法适于获得高纯度的抗体，而后者方法适于大批量生产抗体。

特别地，生产抗-IL-6 受体的抗体的杂交瘤可通过使用日本未审专利公开号(kokai)3(1989)-139293 中的方法建立。一种方法为，将生产 PM-1 抗体的杂交瘤腹膜内注射 BALB/C 小鼠，以获得从腹水中纯化的 PM-1 抗体，其杂交瘤已于 1990 年 7 月 10 日遵照布达佩斯协议的条款国际保藏于日本国家生物科学和人类技术研究所、工业科学和技术机构，1-3Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki pref., 保藏号为 BP-2998。另一种方法为该杂交瘤培养于适宜的培养基，例如含 10% 胎牛血清和 5% BM-Condimed H1(宝灵曼公司生产)的 RPMI 1640 培养基、杂交瘤 SFM 培养基(GIBCO-BRL 公司生产)、PFHM-II 培养基(GIBCO-BRL 公司生产)等等，然后从上清液中纯化 PM-1 抗体。

通过基因重组技术生产的重组抗体可以用作本发明中的单克隆抗体，该技术中来自杂交瘤的抗体基因克隆并整合入一适合的载体中，重组的载体再转化宿主细胞。参见（例如 Borrebaeck C.A.K.和 Larrick J. W.著作的“治疗用的单克隆抗体”，由 MACMILLAN 出版有限公司 1990 年发表于英国）。

特别地，编码所需抗体可变区（V）的 mRNA 从生产抗体的细胞如杂交瘤中分离出来。通过采用例如胍-超离心方法（Chirgwin, J. M.等人，生物化学(1979) 18, 5294-5299）、AGPC 方法（Chomczynski, P.等人，分析生物化学(Anal. Biochem.) (1987) 162, 156-159)制备总 RNA，然后用 mRNA 纯化试剂盒等（Pharmacia 生产）从总 RNA 中纯化分离 mRNA。另外可选择地，mRNA 可直接用快速制备 mRNA 纯化试剂盒(Pharmacia 生产)制备。

抗体可变区 cDNA 可用反转录酶由 mRNA 合成。cDNA 可用 AMV 反转录酶第一链 cDNA 合成试剂盒等进行合成。另外可选择地，为合成和扩增 cDNA，可使用应用聚合酶链反应（PCR）的 5'-扩增 RACE 试剂盒(Clontech 生产)和 5'-RACE 方法(Frohman, M. A.等人，美国国家科学院院报(1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A 等人，核酸研究(Nucleic Acids Res.) (1989) 17, 2919-2932)。目的 DNA 片段从获得的 PCR 产物中纯化出并可与载体 DNA 连接。此外，由此构建重组载体并转化大肠杆菌，并从中挑选克隆以制备所需的重组载体。目的 DNA 的核苷酸序列可通过已知方法如双脱氧法确定。

一旦获得编码所需抗体可变区的 DNA，就可与编码所需抗体恒定区（C 区）的 DNA 连接，然后整合入一表达载体中。另外可选择地，编码抗体 V 区的 DNA 整合入一个已经包含编码抗体 C 区的 DNA 的表达载体中。

为了生产本发明中使用的抗体，将抗体基因如下述方法整合入一表达载体中，以便在表达调控区例如增强子和/或启动子的控制下表达。随后，表达载体可以转化宿主细胞并在其中进行表达。

根据本发明，人工改构的重组抗体，例如嵌合抗体和人源化抗体可用于降低对人的异源抗原性。这些改构抗体可用已知方法生产。

获得嵌合抗体可通过，如下方法，将由此获得的编码抗体可变区的 DNA 与编码人抗体恒定区的 DNA 连接，然后整合入一表

达载体中并转化宿主细胞从中生产抗体（参见欧洲专利申请号 EP 125023 和国际专利申请号 WO 92/19759）。使用这种已知方法可获得本发明中有用的嵌合抗体。

例如，包含编码嵌合 PM-1 抗体的 L 链 V 区或 H 链 V 区 DNA 的质粒分别命名为 pPM-K3 或 pPM-h1，含有质粒的大肠杆菌已遵照布达佩斯协议的条款于 1991 年 2 月 12 日分别以保藏号 NCIMB 40366 和 NCIMB 40362 国际保藏于国家工业和海洋微生物保藏有限公司。

人源化抗体也称为重构人抗体，已通过将除人以外哺乳动物抗体（如小鼠抗体）的互补决定区（CDR）移植入一人抗体的 CDR 制造出来。制备这种抗体的一般重组 DNA 技术也已所知（参见欧洲专利申请号 EP 125023 和国际专利公开号 WO 92-19759）。

特别地，设计用于将鼠抗体的 CDR 和人抗体的框架区（FR）连接起来的 DNA 序列已经合成，该序列来自几段分开的寡核苷酸，并含有与另一段末端重叠的部分。如此获得的 DNA 与编码人抗体 C 区的 DNA 连接，然后整合入表达载体中，再转化宿主细胞以生产抗体（参见欧洲专利申请号 EP 239400 和国际专利公开号 WO 92-19759）。

针对连接 CDR 的人抗体的框架区，选择形成有利的抗原结合结构的互补决定区。如果需要，抗体可变区的框架区氨基酸可被替换，以便重构人抗体的互补决定区可形成适宜的抗原结合结构（Sato, K 等人，癌症研究(Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

例如，嵌合抗体或人源化抗体均采用了人抗体的 C 区。作为人抗体的 C 区可能提到 C $\gamma$ ，例如，可采用 C $\gamma$ 1、C $\gamma$ 2、C $\gamma$ 3 和 C $\gamma$ 4。修饰人抗体的 C 区可促进抗体的稳定性及产率。

嵌合抗体由除人以外哺乳动物抗体的可变区和人抗体的 C 区构成，而人源化抗体由来源于除人以外哺乳动物抗体的互补决定区和来源于人抗体的框架区和 C 区构成。因此，这些抗体在人体中的抗原性降低，以便用作本发明中的抗体。

本发明中应用的人源化抗体的优选实施方案包括人源化的

PM01 抗体。（参见国际专利公开号 WO 92 - 19759）。

上述构建的抗体基因可用已知的方法表达并获得产物。对于哺乳动物细胞，完成表达可采用，包含常规使用的有用的启动子、待表达的抗体基因和 3'下游有效连接多聚 A 信号的 DNA 载体或者包含上述 DNA 的载体。启动子/增强子的实例包括人巨细胞病毒立即早期启动子/增强子。

此外，可用于本发明的表达抗体的启动子/增强子有病毒启动子/增强子，例如逆转录病毒、多瘤病毒、腺病毒和类人猿病毒 40 (SV40)，以及来源于哺乳动物细胞的启动子/增强子，例如人延伸因子 $\alpha$ (HEF1 $\alpha$ )。

例如，通过 Mulligan 等人的方法动物 SV40 启动子/增强子 (Mulligan, R. C.等人, 自然, (1979) 277, 108-114)，或者 Mizushima 等人的方法使用 HEF 1 $\alpha$ 启动子/增强子 (Mizushima, S 和 Nagata, S.,核酸研究(1990) 18, 5322)，可容易地完成表达。

对于大肠杆菌，通过有效地连接常规使用的有用的启动子，抗体分泌的信号序列和将要表达的抗体基因进行表达。作为启动子，例如，可能会提到 LacZ 启动子和 araB 启动子。当使用 LacZ 启动子时，可采用 Ward 等人的方法 (Ward, E.S.等人, 自然, (1989) 341, 544-546; Ward, E. S.等人, FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)；当使用 araB 启动子时，可采用 Better 等人的方法 (Better, M. 等人, 科学(1988) 240, 1041~1043)。

当抗体分泌并产生于大肠杆菌周质空间时，可采用 pelB 信号序列 (Lei, s.p.等人, 细菌学杂志(1987) 169, 4379-4383)。分离出聚集于周质空间的抗体之后，抗体结构在使用前适当地重新折叠 (例如参见 WO 96/30394)。

那些来源于 SV40、多瘤病毒、腺病毒、牛乳头瘤病毒 (BPV) 等的复制起点可用作复制起点。此外，关于宿主细胞系统中基因拷贝数的扩增，表达载体可包括氨基糖苷磷酸转移酶 (APH) 基因、胸苷激酶 (TK) 基因、大肠杆菌黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (Ecogpt) 基因、二氢叶酸还原酶 (dhfr) 基因等作为选择性

标记。

至于本发明使用的抗体的生产，可使用任何生产体系。抗体制品的生产体系包括体外或体内生产体系。作为体外生产体系，可能提及使用真核细胞的生产体系和使用原核细胞的生产体系。

当使用真核细胞时，有选用了动物细胞、植物细胞和真菌细胞的生产体系。已知的动物细胞包括(1)哺乳动物细胞例如 CHO 细胞、COS 细胞、骨髓瘤细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、Hela 细胞和 Vero 细胞；(2)两栖类动物细胞，例如非洲爪蟾属(Xenopus)卵细胞，或(3)昆虫细胞例如 sf9、sf21 和 Tn5。已知的植物细胞包括：例如烟草(Nicotiana tabacum)，其可经受愈伤组织培养。已知的真菌细胞包括：酵母，例如酵母属，更具体的酿酒酵母(Saccharomyces cereviceae)，或丝状真菌，例如曲霉属(Aspergillus)，更具体的黑曲霉(Aspergillus niger)。

当使用原核细胞时，有选用了细菌细胞的生产体系。已知的细菌细胞包括大肠杆菌和枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)。

通过将所需抗体基因转化进这些细胞，并体外培养转化细胞，便可获得抗体。按已知方法进行培养。例如，DMEM、MEM、RPMI1640 和 IMDM 可以用作培养基，并且血清添加剂如胎牛血清(FCS)可结合使用。此外，还可通过将抗体基因转化的细胞注入动物等腹腔以体内方式生产抗体。

作为体内生产体系，将提及那些使用动物和使用植物的生产体系。当使用动物时，有采用哺乳动物和昆虫的生产体系。

山羊、猪、绵羊、小鼠和牛可用作哺乳动物生产体系(Vicki Glaser, 生物技术应用(SPECTRUM Biotechnology Applications)(1993))。同样蚕可以用作昆虫。

当使用植物时，例如可采用烟草。

抗体基因转入这些动物或植物，并从这些动物或植物中产生抗体并回收。例如，抗体基因插入编码乳汁中固有产生的蛋白(如山羊 $\beta$ 酪蛋白)的基因中间，制备融合基因。将包含插入抗体基因的融合基因之 DNA 片段注入山羊胚，胚转变成一只母山羊。接受

胚产生的转基因山羊或其后代，从其乳汁中可获得所需的抗体。为了增加转基因山羊生产的包含所需抗体的乳汁量，可给转基因山羊适量的激素（Ebert, K.M.等人，生物/技术(Bio/Technology) (1994) 12, 699-702）。

当使用蚕时，用插入所需抗体基因的杆状病毒感染蚕，便可从蚕的体液中获得所需的抗体（Maeda, S.等人，自然(1985) 315, 592-594）。而且，当使用烟草时，所需的抗体基因插入植物表达载体，例如 pMON 530，并且载体感染细菌如根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)。然后细菌感染烟草(如 *Nicotiana tabacum*)烟草并从烟草叶中获得所需抗体（Julian, K.-C. Ma 等人，欧洲免疫学杂志(1994) 24. 131-138）。

当体外或体内生产体系生产抗体时，如上所述，编码抗体的重链（H链）或轻链（L链）的DNA可分别整合入一个表达载体并同时转化宿主，或者编码H链和L链的DNA可整合入单个表达载体中并以此转化宿主(参见国际专利公开号 WO 94-11523)。

本发明中使用的抗体可以是抗体片段或是其修饰的版本，只要它们可优选使用即可。例如，Fab、F(ab')<sub>2</sub>、Fv，或是Fv的H链和L链由一适合的连接物连接的单链Fv(ScFv)，都可作为抗体片段提及。

特别地，抗体由酶处理（如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶）产生抗体片段，或者编码这些抗体片段的基因构建后整合入表达载体中，并在适合的宿主细胞中表达（参见，例如 CO, M.S.等人，免疫学杂志(1994) 152, 2968-2976; Better, M.和 Horwitz, A. H., 酶学方法(1989) 178, 476-496; Plueckthun, A.和 Skerra, A., 酶学方法(1989) 178, 476-496; Lamoyi, E., 酶学方法(1986) 121, 652-663; Rousseaux, J.等人，酶学方法(1986) 123, 663-669; Bird, R. E.等人，TIBTECH(1991) 9, 131-137）。

scFv可通过连接抗体的H链V区与L链V区获得。scFv中H链的V区和L链的V区优选地由连接物连在一起，这连接物优选为肽连接物（Huston, J. S.等人，美国国家科学院院报(1988) 85,

5879-5883)。scFv 中 H 链的 V 区和 L 链的 V 区可来源于任何上述的抗体。任何包含 12~19 个氨基酸残基的单链肽都可以用作连接 V 区的肽连接物。

编码 ScFv 的 DNA 可以这样获得：使用编码上述抗体 H 链或 H 链 V 区的 DNA 和编码上述抗体 L 链或 L 链 V 区的 DNA 作为模板；通过 PCR 技术使用与其两末端相特异的引物对，扩增上述序列中编码目的氨基酸序列的部分 DNA；进一步扩增编码肽连接的部分的 DNA，以及确定了该 DNA 的两端可分别与 H 链和 L 链连接的引物对。

一旦建立了编码 scFv 的 DNA，就可通过常规方法获得包含该 DNA 的表达载体和由该表达载体转化的宿主，并且可利用常规方法使用转化的宿主获得 scFv。

通过与上述的方法相似的方式获得抗体基因并允许在宿主中表达，即可获得这些抗体片段。在本申请的权利要求书中使用的“抗体”包括这些抗体片段。

与例如聚乙二醇 (PEG) 的多种分子结合的抗体可用作修饰抗体。本申请的权利要求书中使用的“抗体”包含这些修饰抗体。这些修饰抗体可通过对如此获得的抗体进行化学修饰而获得。本领域中已经建立了这些方法。

如上述生产和表达的抗体可从宿主细胞内部或外部分离出来，并可纯化至均一。本发明中使用的抗体的分离和纯化可通过亲和层析完成。这种亲和层析使用的柱可以是蛋白 A 柱和蛋白 G 柱。蛋白 A 柱使用的载体范例为 Hyper D、POROS、Sephacrose F、F 等等。或者，可无任何限制地使用常规应用的分离纯化蛋白质的方法。本发明中使用的抗体的分离和纯化，可适当地结合除上述亲和层析以外的层析、过滤、超滤、盐析、透析等方法来完成。层析包括例如离子交换层析、疏水层析、凝胶过滤等等。这些层析可应用于高效液相层析 (HPLC)。或者，可应用反相 HPLC。

以上获得抗体的浓度可通过测定光吸收值或者酶联免疫吸附实验 (ELISA) 等方法确定。因此，当进行测定光吸收值时，将

样品用 PBS ( - ) 适当地稀释, 然后测定 280nm 时的光吸收值, 并用光吸收系数  $1.35 \text{ OD}=1\text{mg/ml}$  进行计算。当使用 ELISA 方法时, 按以下方法进行测定。因此, 100 $\mu\text{l}$  由 0.1M 碳酸氢盐缓冲液 (pH 9.6) 稀释至 1 $\mu\text{g/ml}$  的山羊抗人 IgG (TAGO 生产) 加至 96 孔板 (Nunc 生产), 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜以固定抗体。封闭后, 每孔加入 100 $\mu\text{l}$  适当稀释的本发明的抗体或包含抗体的样品, 或 100 $\mu\text{l}$  作为标准物的人 IgG (CAPPEL 生产), 室温孵育 1 小时。

清洗后, 加入 100 $\mu\text{l}$  稀释 5000 倍的碱性磷酸酶标记的抗 - 人 IgG 抗体 (BIO SOURCE 生产), 室温孵育 1 小时。清洗后加入底物溶液并孵育, 随后用 3550 型微板读数仪 (Bio-Rad 生产) 测定 405nm 时的光吸收值, 并计算目的抗体的浓度。

本发明中改构的 IL - 6 具有与 IL - 6 受体结合的活性, 但并不传递 IL - 6 的生物学活性。因而, 尽管改构的 IL - 6 与 IL - 6 竞争性结合 IL - 6 受体, 却并不传递 IL - 6 的生物学活性, 由此便阻断了 IL - 6 的信号传导。

通过替换 IL - 6 氨基酸序列中的氨基酸残基引入突变可以构建改构的 IL - 6。改构 IL - 6 的来源 IL - 6 可以具有任何起源, 但考虑到其抗原性, 优选人 IL - 6。

特别地, 使用已知的氨基酸序列分子建模程序, 例如 WHATIF (Vriend 等人, 分子图谱杂志 (J. Mol. Graphics (1990), 8, 52-56) 预测 IL - 6 的二级结构, 并评价待替换的氨基酸残基的整体效果。当适宜的氨基酸残基确定之后, 通过常规的聚合酶链式反应 (PCR) 方法, 使用包含编码人 IL - 6 基因的核苷酸序列的载体, 并由此获得编码改构 IL - 6 的基因。该基因然后在需要时整合进适宜的表达载体, 根据上述重组抗体的表达、生产和纯化方法从中获得改构的 IL - 6。

改构 IL - 6 的具体实例公开于 Brakenhoff 等人, 生物化学杂志 (1994) 269, 86-93 和 Savino 等人, EMBO 杂志 (1994) 13, 1357-1367, WO96-18648 和 WO 96 - 17869。

本发明中使用的 IL - 6 或 IL - 6 受体的部分肽段分别具有与

IL-6 受体结合或与 IL-6 结合的活性，但不能传递 IL-6 的生物学活性。因此 IL-6 或 IL-6 受体分别与 IL-6 受体或 IL-6 结合并由此将其捕捉。结果，它们并不传递 IL-6 的生物学生，并阻断 IL-6 的信号传导。

IL-6 或 IL-6 受体的部分肽是这样的肽，其包含 IL-6 或 IL-6 受体氨基酸序列中参与结合 IL-6 受体和 IL-6 的区域中的部分或全部氨基酸序列。这种肽段一般包含 10~80、优选 20~50、更优选 20~40 个氨基酸残基。

IL-6 或 IL-6 受体的部分肽段的构建可通过明确 IL-6 或 IL-6 受体氨基酸序列中参与结合 IL-6 受体和 IL-6 的区域，并通过如遗传工程技术或肽合成方法等常规方法生产一些或全部氨基酸序列来完成。

为了用遗传工程技术生产 IL-6 或 IL-6 受体的部分肽，将编码目的肽之 DNA 序列整合入表达载体，并通过表达、生产和纯化该重组抗体获得其肽段。

IL-6 或 IL-6 受体部分肽的生产可通过肽合成方法实现，即：使用肽合成普遍使用的方法例如固相合成或液相合成。

特别地，可使用的方法参见 *Zoku-Iyakuhin no Kaihatsu* (药品进展序集，14 卷，*Peputido Gousei*(肽合成)，Haruaki Yajima、Hirokawa Shoten 编著，1991。例如，使用的固相合成方法包括例如：一个反应，其中待合成肽 C 末端相应的氨基酸与一个不溶于有机溶剂的支持物结合，然后氨基酸（其中 $\alpha$ -氨基基团或侧链官能团由一个适宜的保护基团保护）每次从 C-末端向 N-末端方向缩合一个氨基酸。另一个反应中与树脂结合的氨基酸或肽的 $\alpha$ -氨基基团的上述保护基团被去除。这两个反应交替重复以延伸肽链。依赖使用的保护基团的类型可将固相肽合成方法分为 Boc 方法和 Fmoc 方法。

完成目的肽合成之后，进行去保护反应和从支持物上切除肽链的反应。关于肽链的切除，通常在 Boc 方法中使用氟化氢或三氟甲烷磺酸，在 Fmoc 方法中使用 TFA。例如在 Boc 方法中，上

述肽树脂在存在苯甲醚时在氟化氢中处理。随后，去除保护基团，通过从支持物上切除回收合成肽。通过冻干合成的肽可获得粗肽。另一方面，例如在 Fmoc 方法中，按照同上相似的方式完成去保护反应和从支持物上切除肽的反应。

由此获得的粗肽可应用 HPLC 进行分离和纯化。肽的洗脱可在优化条件下在通常用于蛋白质纯化的水 - 乙腈溶剂体系中进行。将色谱曲线中峰值所对应的级分收集并冻干。如此纯化的肽级分通过质谱分析分子量、分析氨基酸组分、或分析氨基酸序列等进行鉴定。

IL - 6 部分肽或 IL - 6 受体部分肽的具体实施例公开于日本未审专利公开号 (kokai) 7(1995)-324097、日本未审专利公开号 (kokai)8(1996)-311098 和美国专利 US 5210075。

本发明中使用的 IL - 6 拮抗剂的活性可用已知的常规方法进行评价。特别地，培养 IL - 6 依赖型细胞 MH 60. BSF2，加入 IL - 6，并在与 IL - 6 拮抗剂共存条件下通过向 IL - 6 依赖型细胞中掺入  $H^3$  - 胸苷以评价其活性。或者，同时向表达 IL - 6 受体的 U266 细胞中加入  $^{125}I$  标记的 IL - 6 和 IL - 6 拮抗剂，通过测定与 IL - 6 受体表达细胞所结合的  $^{125}I$  标记的 IL - 6，评价其活性。在以上分析系统中，除了有 IL - 6 受体拮抗剂的实验组以外，还建立了不包含 IL - 6 拮抗剂的阴性对照组，并且比较它们获得的结果以评价 IL - 6 受体拮抗剂抑制 IL - 6 的活性。

为了证实本发明完成的效果，将本发明中使用的 IL - 6 拮抗剂施用于形成了炎性肠道疾病的动物，炎性肠道疾病的形成是通过注射 CD4 阳性和 CD45RB 强阳性的细胞 ( $CD4^+CD45RB^{high}$  细胞)，并可评价 IL - 6 拮抗剂抑制体重减轻和改善炎性肠道疾病病情得分的效果。作为本发明额外的效果，其可抑制厌食，减轻腹痛，改善腹泻，或防止炎性肠道疾病的复发。

使用例如以下实施例描述的方法，可以分离通过 IL - 6 拮抗剂转入动物的  $CD4^+CD45RB^{high}$  细胞。 $CD4^+CD45RB^{high}$  细胞来源的动物可以是实验中普遍使用的动物，如小鼠和大鼠。

如下面实施例所述，在形成炎性肠道疾病的动物中施用 IL-6 受体抗体，导致体重减轻的抑制和改善炎性肠道疾病程度得分，因此表明如抗-IL-6 受体抗体的 IL-6 拮抗剂发挥了治疗炎性肠道疾病的效果。

本发明处理的对象为哺乳动物。处理对象优选为人。

本发明的预防或治疗剂可以口服或非肠道途径、系统地或局部地施用。例如，静脉注射如滴注、肌肉注射、腹膜内注射、皮下注射、栓剂、洗肠剂、口服肠溶衣药片等以及给药方式可以根据病人的年龄和状况适当地选择。选择有效剂量的范围为每次每 kg 体重给药 0.01mg~100mg。或者可选择剂量范围为每个病人 1~1000mg，优选 5~50mg。

本发明的炎性肠道疾病的预防或治疗剂依据给药途径可包含药学可接受的载体或添加剂。这些载体或添加剂的例子包括水、药物可接受的有机溶剂、胶原蛋白、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧基乙烯聚合物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、藻酸钠、水溶性葡聚糖、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯胶、酪蛋白、明胶、琼脂、甘油二酯、丙二醇、聚乙二醇、凡士林、石蜡、十八烷醇、硬脂酸、人血清白蛋白(HSA)、甘露醇、山梨醇、乳糖、药物可接受的表面活性剂等等。根据剂型可选择上述的添加剂或其组合，但不局限于此。

本发明治疗的疾病对象为炎性肠道疾病。炎性肠道疾病包括溃疡性结肠炎和节段性回肠炎。这些疾病主要发生于 20 岁左右的青年，但至今对其致病抗原或炎症病理学机制了解很少。然而，目前正在采用多种细胞和细胞因子进行广泛的研究以阐明其机制。

过去的几年中在对引起炎性肠道疾病的细胞的分析中观察到一些进展。因此，很显然通过将纯化的 CD4 阳性、CD45RB 强阳性细胞 (CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>high</sup>) 转入免疫缺陷小鼠 (SCID 小鼠) 就可建立炎性肠道疾病的动物模型。(Morrissey, P. J. 等人, 实验医学杂志(1993) 178, 237-244; Leach, M. W. 等人, 美国病理学杂志

(*Am. J. Pathol.*) (1996) 148, 1503-1515; Aranda, R 等人, 免疫学杂志(1997) 158, 3464-3473) 。

另一方面已有显示, CD<sub>4</sub> 阳性、CD45RB 弱阳性细胞 (CD<sub>4</sub><sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup>) 不能诱导炎性肠道疾病, 反而抑制由 CD<sub>4</sub> 阳性、CD45RB 强阳性细胞诱导产生的炎性肠道疾病 (Powrie, F. R. 等人, 实验医学杂志(1994) 179, 589-600)。已知每个细胞 CD45RB 的表达与细胞因子产生模式有关。因此认为, CD<sub>4</sub> 阳性、CD45RB 强阳性细胞为 1 型辅助 (Th1) 样细胞, 产生 IFN- $\gamma$  和 TNF- $\alpha$ , 而 CD<sub>4</sub> 阳性、CD45RB 弱阳性细胞为 2 型辅助 (Th2) 样细胞, 产生 IL-4、IL-10 等等 (Lee, W. 等人, 免疫学杂志(1990) 144, 3288-3295)。

因此认为炎性肠道疾病的发病主要与 Th1 和 Th2 的平衡紊乱有关, 并由另一事实所证实, 即由基因打靶方法生产的 IL-10 缺陷小鼠产生类似于人溃疡性结肠炎的慢性炎性肠道疾病 (Kuhn, R. 等人, 细胞(1993) 75, 263-274)。

实施例中使用的动物模型其结肠的组织学特征非常类似于溃疡性结肠炎和节段性回肠炎病人 (Leach, M.W. 等人, 美国病理学杂志, (1996) 148, 1503-1515)。溃疡性结肠炎中经常可看到从直肠开始大面积连续损伤, 并且粘膜上皮也特别地受到损伤。本发明的模型中临床病理学非常相似, 即尽管损伤主要位于结肠和延伸腺体里但其损伤部位覆盖广泛。

另一方面, 节段性回肠炎是一种深度炎症, 并不定位于粘膜, 而是分散于消化道任何部位, 从口腔到肛门。从组织学角度其特征为非干酪性坏死肉芽肿炎症。这一模型非常类似于节段性回肠炎, 即发现炎症并不定位于巨噬细胞、淋巴细胞和多核巨细胞聚集的粘膜层, 并且通常为肉芽肿形式, 很少发现隐窝囊肿。

因此, 临床研究早已报道了有关溃疡性结肠炎和节段性回肠炎特征共存的病例 (Tanaka, M. 等人, 肝脏-胃肠病学(1990) 37, 18-31)。在炎性肠道疾病中发现上皮内主要组织相容性复合体 II 的表达增强 (Trejdosiewicz, L.K. 等人, *Dig. Dis. Sci.*, (1989) 34,

1449-1456), 并且本发明模型情况也如此。本模型中, 出现上皮组织特征性加厚, 并认为与溃疡性结肠炎病人中所见的细胞生长增强有关 (Serafini, E. P.等人, 肠(1981) 22, 648-652)。

本模型与临床炎性肠道疾病非常相似, 严重病例中可诱发体重减轻。在使用本模型的实验中, 组织学损坏显著好转并且未观察到体重减轻, 表明 IL-6 拮抗剂对炎性肠道疾病(如溃疡性结肠炎或节段性回肠炎)有治疗效果。

#### 实施例:

参照实施例、参考实施例和实验实施例现在将更加详细地解释本发明。然而应该注意的是本发明无论如何并不局限于此。

#### 实施例

从雄性 BALB/C 小鼠中无菌取出脾脏, 匀浆后充分吹吸制成单细胞悬液。然后为了去除红细胞用裂解液(0.16M  $\text{NH}_4\text{Cl}$  和 0.17M Tris 缓冲液 9:1 的混合物, pH7.2) 处理细胞沉淀, 进而用磷酸缓冲盐液洗 2 次以获得小鼠脾细胞。

将洗过的小鼠脾细胞悬浮于含 2% FCS 的 RPMI 1640 培养基, 细胞计数后调整为  $1.1 \times 10^8/\text{ml}$ 。向其中加入 1/9 体积抗鼠 CD4 抗体(L3T4 微珠, Miltenyi Biotec 生产), 并在冰上与细胞结合 15 分钟(细胞密度  $1 \times 10^8/\text{ml}$ )。下一步使用 Mini MACS 分离系统(Miltenyi Biotec 生产)进行柱处理, 收集 CD4 阳性细胞级分。细胞计数后悬浮于加有 2% FCS 的磷酸缓冲盐液中, 并调节细胞密度为  $4 \times 10^7/\text{ml}$ 。

在 CD4 阳性细胞悬液中加入 1/100 体积 PE 标记的大鼠抗 - 小鼠 CD4 (L3T4) 抗体(0.2mg/ml, 克隆 RM4-5, Pharmingen 生产)和 1/100 体积 FITC 标记的大鼠抗 - 小鼠 CD45RB 抗体(0.5mg/ml, 克隆 16A, Pharmingen 生产)。冰上保持 20 分钟后使抗体结合到细胞上。向标记细胞中加入加有 2% FCS 的 RPMI 1640 培养基, 离心冲洗后重悬于含 2% FCS 的磷酸缓冲盐

液中，贮存于阴冷黑暗处。

从标记的 CD4 阳性细胞中使用流式细胞仪 (FACS Vantage, Becton Dickinson 生产) 选出 CD4 阳性和 CD45RB 强阳性细胞群 (CD4<sup>+</sup> CD45RB<sup>high</sup> 细胞)。该细胞群相应于在 CD4 和 CD45RB 阳性细胞中相应具有 CD45RB 的高表达的上 50% 细胞群。离心后获得的细胞重悬于磷酸缓冲盐液至浓度  $4 \times 10^6/\text{ml}$ 。CD45RB 阳性细胞的纯度为 97%，其存活率为 98%。

将这种高度纯化的细胞以  $4 \times 10^5/\text{ml}$  ( $4 \times 10^6/\text{ml}$ , 每只 100 $\mu\text{l}$ ) 浓度腹膜内注射入 C.B-17scid 小鼠以制备炎性肠道疾病模型 (Leach, M. W. 等人, 美国病理学杂志(1996) 148, 1503-1515, Aranda, R. 等人, 免疫学杂志(1997) 158, 3464, 3473)。按照处理方法分以下三组进行实验: (1) 细胞转移、未施用抗-IL-6 受体抗体组, 5 只小鼠; (2) 细胞转移、施用抗-IL-6 受体抗体组, 3 只小鼠; (3) 细胞非转移组, 3 只小鼠。

抗-IL-6 受体抗体 MR16-1 如下给药。首先, 用磷酸缓冲盐液将抗体调至 20mg/ml, 在注射上述细胞前 15~30 分钟腹膜内注射抗体, 每只小鼠 100 $\mu\text{l}$ 。一星期以后, 用磷酸缓冲盐液调至 10mg/ml, 每只小鼠腹膜内给药 100 $\mu\text{l}$ 。每星期重复一次直到细胞转移后第 8 个星期。未施用抗体组以相似方式注射磷酸缓冲盐液。

细胞转移 8 至 9 周后给小鼠称重, 取出结肠组织 (降结肠部分) 浸入 OCT 化合物中。样品于  $-80^\circ\text{C}$  冷冻。用切片机(cytostat)将样品块切成 6 $\mu\text{m}$  厚的冷冻片, 固定于 10% 福尔马林溶液。固定部分由苏木精-伊红方法双重染色用于组织学分析。

通过在细胞转移导入以诱导炎性肠道疾病之前和细胞转移 8~9 星期之后测定体重变化 (细胞转移前后比率) 和组织学分析, 进行药效的评价。关于组织学分析, 根据以下 4 阶段炎性肠道疾病的得分对每只小鼠的组织进行评估 (这里指肠道疾病的得分) (Ito, H. 等人, 自身免疫学杂志(J. Autoimmunity)(1997) 10, 455-459)。

炎性肠道疾病的得分:

0级（无病症）：与正常 BALB/C 小鼠无显著差别，

1级（轻度）：观察到上皮组织轻微肥大，

2级（中度）：介于1级和3级之间，

3级（重度）：上皮组织明显肥大，伴随大范围炎性细胞浸润和杯形细胞缺陷。

图1显示了体重变化和炎性肠道疾病得分的结果。

植入 CD4 阳性和 CD45RB 强阳性细胞的小鼠产生炎性肠道疾病，并观察到明显的组织学炎症。它们还显示出与疾病开始有关的乏力，平均体重减少 11%。另一方面，抗-IL-6 受体抗体施用组中观察到统计学上明显的抑制体重减轻，并且维持与细胞转移前相同的体重。此外，炎性肠道疾病的组织学得分也显示出炎性肠道疾病的改善。

关于体重变化的统计学检验首先进行 ANOVA（方差分析，SPSS for Windows 版本 6，SPSS 公司）分析，以确证显著性，随后用 Bonferroni 方法进行多重比较，其中观察到显著性水平为 5%。

这种模型与人炎性肠道疾病非常相似，因此表明抗-IL-6 受体的抗体作为炎性肠道疾病（如溃疡性结肠炎或节段性回肠炎）的预防或治疗剂是有效的。

表 1 抗-IL-6 受体的抗体抑制体重减轻和炎性肠道疾病恶化

注射的细胞	处理	动物数	体重变化(%)	炎性肠道疾病分值
CD <sup>4+</sup> CD45RB <sup>high</sup>	磷酸缓冲盐液	5	88.8±6.7	2.4
CD <sup>4+</sup> CD45RB <sup>high</sup>	抗-IL-6 受体的抗体	3	100.9±4.5	1.0
无	磷酸缓冲盐液	3	107.7±0.9	0.3

体重变化由均值 = 群体标准差表示。

炎性肠道疾病分值由群体均值表示

### 参考实施例 1. 人可溶性 IL-6 受体的制备

通过 PCR 方法, 使用包含编码根据 Yamasaki 等人方法获得的 IL-6 受体 (Yamaski, K. 等人, 科学(1988)241, 825-828) 的 cDNA 之质粒 pBSF2R. 236, 制备可溶性 IL-6 受体。质粒 pBSF2R.236 由限制酶 SphI 消化, 获得 IL-6 受体的 cDNA, 然后插入 mp18 (Amersham 公司生产)。使用设计插入 IL-6 受体 cDNA 一个终止密码子的合成寡聚引物, 采用体外突变系统 (Amershan 生产) 通过 PCR 方法, 在 IL-6 受体 cDNA 中产生一个突变。该方案导致在氨基酸 345 位插入一个终止密码子。并产生编码可溶性 IL-6 受体的 cDNA。

为了在 CHO 细胞中表达可溶性 IL-6 受体的 cDNA, 将其连接到质粒 pSV(Pharmacia 生产) 中获得质粒 pSVL 344。由 HindIII-Sal I 酶切的可溶性 IL-6 受体 cDNA 插入包含 dhfr cDNA 的质粒 pECEdhfr 中, 以获得能在 CHO 细胞中表达的质粒 pECEdhfr 344。

使用磷酸钙沉淀法 (Chen C. 等人, 分子细胞生物学 (Mol. Cell. Biol.) (1987) 7, 2745-2751) 将 10 $\mu$ g 质粒 pECEdhfr 344 转染到 dhfr-CHO 细胞系 DXB-11 (Urland 等人, 美国国家科学院院报 (1980) 77, 4216-4220)。转染的 CHO 细胞在无核苷的  $\alpha$ MEM 选择培养基中培养 3 星期, 该培养基中含有 1mM 谷氨酰胺、10% 透析的 FCS、100U/ml 青霉素和 100 $\mu$ g/ml 链霉素。

选择的 CHO 细胞通过有限稀释法筛选获得单个 CHO 细胞克隆。CHO 细胞克隆在 20nM-200nM 氨甲喋呤 (MTX) 中扩增获得生产人可溶性 IL-6 受体的 CHO 细胞系 5E27。CHO 细胞系 5E27 培养在含 5% FBS 的 Iscov 改良 Dulbecco's 培养基 (IMDM, Gibco 生产) 中。收集培养上清液, 并用 ELISA 测定培养上清液中可溶性 IL-6 受体的浓度。结果证实培养上清液中含有可溶性 IL-6 受体。

### 参考实施例 2. 人 IL-6 抗体的制备

用 10 $\mu$ g 重组 IL-6(Hirano 等人, 免疫学信件(Immunol. Lett.) 17:41, 1988)和福氏完全佐剂免疫 BALB/C 小鼠, 并且每星期重复一次直到血清中可检测出抗-IL-6 抗体。从局部淋巴结中取出免疫细胞, 然后用聚乙二醇 1500 与骨髓瘤细胞系 P3U1 融合。根据 Oi 等人应用 HAT 培养基的方法(细胞免疫学中的筛选方法, W. H. Freeman 和 Co., 旧金山, 351, 1980) 筛选杂交瘤, 建立生产人 IL-6 抗体的杂交瘤。

生产人 IL-6 抗体的杂交瘤按以下方法进行 IL-6 结合实验。因此, 由柔韧的聚乙烯制造的 96 孔微量滴定板(Dynatech 实验室公司, Alexandria, VA) 包被 100 $\mu$ l 山羊抗小鼠 Ig(10 $\mu$ l/ml, Cooper 生物学公司生产, Malvern, PA), 4 $^{\circ}$ C 过夜。随后用含 1% 牛血清白蛋白(BSA)的 PBS 室温处理 2 小时。

PBS 冲洗后每孔加入 100 $\mu$ l 杂交瘤培养上清液, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。洗板后每孔加入  $^{125}$ I 标记的重组 IL-6 至浓度为 2000cpm/0.5ng/孔, 然后用  $\gamma$  计数器(Beckman Gamma 9000, Beckman 仪器, Fullerton, CA) 在洗板后测定每孔的放射性。216 个杂交瘤克隆中 32 个为 IL-6 结合实验阳性。最终从这些克隆中获得稳定的 MH166.BSF2。由该杂交瘤生产的抗-IL-6 抗体 MH166 具有 IgG1 $\kappa$  亚型。

然后采用 IL-6 依赖型小鼠杂交瘤克隆 MH60.BSF2 检测 MH166 抗体对杂交瘤生长的中和活性。分散 MH60.BSF2 细胞至  $1 \times 10^4$ /200 $\mu$ l/孔, 并加入含 MH166 抗体的样品, 培养 48 小时, 加入 0.5 $\mu$ Ci/孔  $^3$ H-胸苷(New England Nuclear, 波士顿, MA) 继续培养 6 小时。将细胞置于玻璃滤纸上用自动收获器(Labo Mash 科学公司, Tokyo, Japan) 处理。兔抗-IL-6 抗体用作对照。

结果, MH166 抗体以剂量依赖的方式抑制了由 IL-6 诱导的 MH60.BSF2 细胞对  $^3$ H-胸苷的掺入。由此表明 MH166 抗体中和了 IL-6 的活性。

### 参考实施例 3. 人抗-IL-6 受体的抗体的制备

由 Hirata 等人的方法 (Hirata, Y.等人, 免疫学杂志 143, 2900-2906, 1989) 制备的抗-IL-6 受体的抗体根据吸附原则与 CNBr 活化的 Sepharose 4B (Pharmacia 精细化工生产, Piscataway, NJ) 结合, IL-6 受体 (Yamasaki, K.等人, 科学(1988) 241, 825-828) 获得纯化。人骨髓瘤细胞系 U266 用含 1% 毛地黄皂苷 (Wako 化工生产)、10mM 三乙醇胺(pH7.8)和 0.15M NaCl (毛地黄皂苷缓冲液)的 1mM 盐酸对氨基苯甲烷磺酸氟溶解, 并与结合在 Sepharose 4B 珠上的 MT18 抗体混合。然后用毛地黄皂苷缓冲液冲洗珠体 6 次以制备部分纯化的 IL-6 受体。

用以上从  $3 \times 10^9$  U266 细胞中获得的部分纯化的 IL-6 受体每隔 10 天免疫一次 BALB/C 小鼠, 共免疫 4 次, 然后用标准方法制备杂交瘤。根据以下描述的方法检测阳性生长孔杂交瘤培养上清液与 IL-6 受体结合的活性。 $5 \times 10^7$  U266 细胞用  $^{35}\text{S}$ -蛋氨酸 (2.5mCi) 标记, 并用以上毛地黄皂苷缓冲液溶解。溶解的 U266 细胞与 0.04ml 与 Sepharose 4B 珠结合的 MT18 抗体混合, 然后用毛地黄皂苷缓冲液洗 6 次。用 0.25ml 毛地黄皂苷缓冲液(pH3.4)洗脱  $^{35}\text{S}$ -蛋氨酸标记的 IL-6 受体, 并用 0.025ml 1M Tris(pH7.4)中和。

0.05ml 杂交瘤培养上清液与 0.01ml 蛋白 G Sepharose (Pharmacia 生产)混合。冲洗后 Sepharose 与上述制备的 0.005ml  $^{35}\text{S}$ -标记的 IL-6 受体溶液孵育。用 SDS-PAGE 方法分析免疫沉淀, 并查找与 IL-6 受体反应的杂交瘤培养上清液。结果建立了阳性杂交瘤克隆 PM-1。由 PM-1 杂交瘤生产的抗体具有 IgG1 $\kappa$ 亚型。

使用人骨髓瘤细胞系 U266 研究杂交瘤 PM-1 生产的抗体其抑制 IL-6 与人 IL-6 受体结合的活性。从大肠杆菌制备的人重组 IL-6 (Hirano 等人, 免疫学通信(7:41-45, 1988)采用 Bolton-Hunter 试剂(New England Nuclear, Boston, MA) (Taga, T.等人, 实验医学杂志(1987) 166, 967-981)用  $^{125}\text{I}$  标记。 $4 \times 10^5$  U266

细胞与 70% (V/V) PM-1 杂交瘤培养上清液以及  $14,000\text{cmp}^{125}\text{I}$  - 标记的 IL-6 室温共培养 1 小时。70 $\mu\text{l}$  样品铺在一个 400 $\mu\text{l}$  聚乙烯微量离心管中 300 $\mu\text{l}$  FCS 上。离心后测定细胞的放射性。

结果显示杂交瘤 PM-1 产生的抗体抑制 IL-6 与 IL-6 受体的结合。

#### 参考实施例 4. 小鼠抗-IL-6 受体的抗体制备

根据 Saito, 等人, 免疫学杂志(1993) 147, 168-173 中描述的方法制备抗小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体。

生产小鼠可溶性 IL-6 受体的 CHO 细胞培养于包含 10% FCS 的 IMDM 培养基。用小鼠可溶性 IL-6 受体抗体 RS12(参见 Saito 等人, 出处同上) 和装有 Affigel 10 凝胶(Biorad 生产)的亲和柱从培养上清液中纯化小鼠可溶性 IL-6 受体。

小鼠可溶性 IL-6 受体(50 $\mu\text{g}$ )与福氏完全佐剂混合后注射到 Wistar 大鼠的腹腔内。施用 2 星期后用福氏不完全佐剂对动物增强免疫。45 天时处死大鼠, 以约  $2 \times 10^8$  脾细胞与  $1 \times 10^7$  小鼠骨髓瘤细胞 P3U1 用 50% 的 PEG1500(Boehringer Mannheim)按常规方法融合, 然后用 HAT 培养基筛选。

将杂交瘤培养上清液加至用兔抗大鼠 IgG 抗体(Cappel 生产)包被的板上之后, 加入小鼠可溶性 IL-6 受体。随后用兔抗小鼠 IL-6 受体的抗体和碱性磷酸酶标记的绵羊抗兔 IgG, 通过 ELISA 筛选出生产抗-小鼠可溶性 IL-6 受体的抗体的杂交瘤。当确证生产目的抗体后, 对杂交瘤克隆亚筛选 2 次, 直到获得单一杂交瘤克隆。该克隆命名为 MR16-1。

杂交瘤生产的抗体对小鼠 IL-6 信号转导的中和活性, 通过掺使用 MH60.BSF2 细胞检测  $^3\text{H}$ -胸苷的掺入(Matsuda, T. 等人, 免疫学杂志(1988) 18, 951-956) 得到检验。MH60.BSF2 细胞以  $1 \times 10^4$  细胞/200 $\mu\text{l}$ /孔在 96 孔微量板上制备。10pg/ml 小鼠 IL-6 和 MR16-1 抗体或 RS12 抗体以 12.3~1000ng/ml 加至每孔, 然后在 5%  $\text{CO}_2$  及 37 $^\circ\text{C}$  条件下培养 44 小时, 之后加入 1 $\mu\text{Ci}$ /孔  $^3\text{H}$ -胸苷。

4 小时后测定掺入的  $^3\text{H}$ -胸苷。结果 MR16-1 抗体抑制了 MH60.BSF2 细胞对  $^3\text{H}$ -胸苷的掺入。

因此证明杂交瘤 MR16-1 生产的抗体抑制 IL-6 与 IL-6 受体的结合。

#### 工业应用性

根据本发明，表明 IL-6 拮抗剂如抗-IL-6 受体的抗体对炎性肠道疾病有治疗效果。因此表明 IL-6 拮抗剂可用作对节段性回肠炎和溃疡性结肠炎的治疗剂。