

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-172493

(P2020-172493A)

(43) 公開日 令和2年10月22日(2020.10.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/519 (2006.01)	A 6 1 K 31/519	4 C 0 8 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 U	4 C 0 8 6
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 I O 1	
審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 27 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2020-108867 (P2020-108867)	(71) 出願人	000003311 中外製薬株式会社
(22) 出願日	令和2年6月24日(2020.6.24)		東京都北区浮間5丁目5番1号
(62) 分割の表示	特願2018-200134 (P2018-200134) の分割	(74) 代理人	100099759 弁理士 青木 篤
原出願日	平成16年4月28日(2004.4.28)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(31) 優先権主張番号	0309619.5	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成15年4月28日(2003.4.28)	(74) 代理人	100087413 弁理士 古賀 哲次
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英国 (GB)	(72) 発明者	奥田 修 東京都中央区京橋2丁目1-9 中外製薬株式会社内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 インターロイキン-6関連疾患の治療方法

(57) 【要約】

【課題】免疫抑制剤を含んで成る新規な医薬組成物。

【解決手段】IL-6アンタゴニストによるIL-6関連疾患の治療の際のアレルギー反応の予防又は軽減のための、免疫抑制剤を含んで成る医薬組成物。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

インターロイキン - 6 アンタゴニスト (IL-6アンタゴニスト) と免疫抑制剤とを含んで成る、IL-6関連疾患の治療用医薬組成物。

【請求項 2】

IL-6関連疾患の治療のためのIL-6アンタゴニストの使用における作用増強のための、免疫抑制剤を含んで成る医薬組成物。

【請求項 3】

IL-6アンタゴニストによるIL-6関連疾患の治療の際のアレルギー反応の予防又は軽減のための、免疫抑制剤を含んで成る医薬組成物。

10

【請求項 4】

IL-6アンタゴニストを含んで成る、高投与量投与用の治療剤。

【請求項 5】

IL-6関連疾患の治療の際のアレルギー反応の予防又は軽減のための、高用量のIL-6アンタゴニストを含んで成る医薬組成物。

【請求項 6】

前記IL-6アンタゴニストが、抗 - インターロイキン - 6 レセプター抗体 (IL-6R抗体) である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

前記抗IL-6R抗体が、IL-6Rに対するモノクローナル抗体である、請求項 6 に記載の医薬組成物。

20

【請求項 8】

前記抗IL-6R抗体が、ヒトIL-6Rに対するモノクローナル抗体である、請求項 6 又は 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記抗IL-6R抗体が、マウスIL-6Rに対するモノクローナル抗体である、請求項 6 又は 7 に記載の医薬組成物。

【請求項 10】

前記抗IL-6R抗体が、組換え型抗体である、請求項 6 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 11】

前記ヒト抗IL-6Rモノクローナル抗体がPM-1抗体である、請求項 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

前記マウスIL-6Rモノクローナル抗体がMR16-1抗体である、請求項 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 13】

前記抗IL-6R抗体がIL-6Rに対するキメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である、請求項 6 ~ 12のいずれか 1 項に記載の、医薬組成物。

【請求項 14】

前記IL-6Rに対するヒト型化抗体がヒト化PM-1抗体である、請求項13に記載の医薬組成物。

40

【請求項 15】

前記IL-6関連疾患が、関節リウマチ、プラズマサイトーシス、高イムノグロブリン症、貧血、腎炎、悪液質、多発性骨髄腫、キャッスルマン病、メサングリウム増殖性腎炎、全身性エリテマトーデス、クローン病、潰瘍性大腸炎、腓炎、乾癬、小児慢性関節炎、または全身型若年性特発性関節炎、血管炎、川崎病である、請求項 1 ~ 14のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

前記の、免疫抑制剤を含んで成る医薬組成物又は前記抗体と免疫抑制剤とを含んで成る

50

医薬組成物であって、抗IL-6R抗体の投与量が、0.02～150mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である、請求項1～3及び6～15のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項17】

抗IL-6R抗体の投与量が、0.5～30mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である、請求項16に記載の医薬組成物。

【請求項18】

抗IL-6R抗体の投与量が、2～8mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である、請求項17に記載の医薬組成物。

【請求項19】

前記の、抗IL-6R抗体を含んで成る、高投与量投与用のIL-6関連疾患治療剤又は高用量の抗IL-6R抗体を含んで成る医薬組成物であって、抗IL-6R抗体の投与量が、4mg/kg/4週以上又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である、請求項4～15のいずれか1項に記載の医薬組成物。

10

【請求項20】

抗IL-6R抗体の投与量が、6～16mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である、請求項19に記載の医薬組成物。

【請求項21】

抗IL-6R抗体の投与量が、6～10mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である、請求項20に記載の医薬組成物。

20

【請求項22】

前記免疫抑制剤がメトトレキセート(MTX)である、請求項1～3及び6～21のいずれか1項に記載の医薬組成物。

【請求項23】

前記MTXの投与量が、1～100mg/body/週である、請求項22に記載の医薬組成物。

【請求項24】

前記MTXの投与量が、4～50mg/body/週である、請求項23に記載の医薬組成物。

【請求項25】

前記MTXの投与量が、7.5～25mg/body/週である、請求項24に記載の医薬組成物。

【請求項26】

前記抗IL-6R抗体と前記免疫抑制剤とを同時投与するための、請求項1～3及び6～25に記載の医薬組成物。

30

【請求項27】

前記抗IL-6R抗体と前記免疫抑制剤とを時間を隔てて投与するための、請求項1～3及び6～25に記載の医薬組成物。

【請求項28】

IL-6関連疾患の治療用医薬組成物の製造のための、インターロイキン-6アンタゴニスト(IL-6アンタゴニスト)と免疫抑制剤との使用。

【請求項29】

IL-6関連疾患の治療のためのIL-6アンタゴニストの使用における作用増強のための、免疫抑制剤を含んで成る医薬組成物の製造のための、IL-6アンタゴニストの使用。

40

【請求項30】

IL-6アンタゴニストによるIL-6関連疾患の治療の際のアレルギー反応の予防又は軽減のための、免疫抑制剤を含んで成る医薬組成物の製造のためのIL-6アンタゴニストの使用。

【請求項31】

IL-6アンタゴニストを含んで成る、高投与量投与用のIL-6関連疾患治療剤の製造のための、IL-6アンタゴニストの使用。

【請求項32】

IL-6関連疾患の治療の際のアレルギー反応の予防又は軽減のための、高用量の抗IL-6R抗体を含んで成る医薬組成物の製造における、IL-6アンタゴニストの使用。

50

- 【請求項 3 3】
前記IL-6アンタゴニストが、抗 - インターロイキン - 6レセプター抗体 (IL-6R抗体) である、請求項28~32のいずれか1項に記載の使用。
- 【請求項 3 4】
前記抗IL-6R抗体が、IL-6Rに対するモノクローナル抗体である、請求項28~33のいずれか1項に記載の使用。
- 【請求項 3 5】
前記抗IL-6R抗体が、ヒトIL-6Rに対するモノクローナル抗体である、請求項28~34のいずれか1項に記載の使用。
- 【請求項 3 6】 10
前記抗IL-6R抗体が、マウスIL-6Rに対するモノクローナル抗体である、請求項28~34のいずれか1項に記載の使用。
- 【請求項 3 7】
前記抗IL-6R抗体が、組換え型抗体である、請求項28~36のいずれか1項に記載の使用。
- 【請求項 3 8】
前記ヒト抗IL-6Rモノクローナル抗体がPM-1抗体である、請求項35に記載の使用。
- 【請求項 3 9】
前記マウス抗IL-6Rモノクローナル抗体がMR16-1抗体である、請求項36に記載の使用。
- 【請求項 4 0】 20
前記抗IL-6R抗体がIL-6Rに対するキメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である、請求項32~39のいずれか1項に記載の使用。
- 【請求項 4 1】
前記IL-6Rに対するヒト化抗体がヒト化PM-1抗体である、請求項40に記載の使用。
- 【請求項 4 2】
前記IL-6関連疾患が、慢性関節リウマチ、プラズマサイトーシス、高イムノグロブリン症、貧血、腎炎、悪液質、多発性骨髄腫、キャスルマン病、メサングيوم増殖性腎炎、全身性エリテマトーデス、クローン病、膵炎、乾癬、小児慢性関節炎、または全身型若年性突発性関節炎である、請求項21~41のいずれか1項に記載の使用。
- 【請求項 4 3】 30
前記の、免疫抑制剤を含んで成る医薬組成物又は抗IL-6R抗体と免疫抑制剤とを含んで成る医薬組成物の製造のための使用であって、抗IL-6R抗体の投与量が、0.02~150mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である、請求項28~30及び33~42のいずれか1項に記載の使用。
- 【請求項 4 4】
抗IL-6R抗体の投与量が、0.5~30mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である、請求項43に記載の使用。
- 【請求項 4 5】
抗IL-6R抗体の投与量が、2~8mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である、請求項44に記載の使用。 40
- 【請求項 4 6】
前記の、抗IL-6R抗体を含んで成る、高投与量投与用のIL-6関連疾患治療剤又は高用量の抗IL-6R抗体を含んで成る医薬組成物の製造のための使用であって、抗IL-6R抗体の投与量が、4mg/kg/4週以上又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である、請求項31~45のいずれか1項に記載の使用。
- 【請求項 4 7】
抗IL-6R抗体の投与量が、6~16mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である、請求項46に記載の使用。
- 【請求項 4 8】
抗IL-6R抗体の投与量が、6~10mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示 50

す投与量である、請求項47に記載の使用。

【請求項 4 9】

前記免疫抑制剤がメトトレキサート (MTX) である、請求項28～30及び33～48のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 5 0】

前記MTXの投与量が、1～100mg/body/週である、請求項49に記載の医薬組成物。

【請求項 5 1】

前記MTXの投与量が、4～50mg/body/週である、請求項50に記載の医薬組成物。

【請求項 5 2】

前記MTXの投与量が、7.5～25mg/body/週である、請求項51に記載の医薬組成物。

10

【請求項 5 3】

前記抗IL-6R抗体と前記免疫抑制剤とを同時投与するための、請求項28～30及び34～52に記載の使用。

【請求項 5 4】

前記抗IL-6R抗体と前記免疫抑制剤とを時間を隔てて投与するための、請求項28～30及び34～52に記載の使用。

【請求項 5 5】

IL-6関連疾患の治療方法において、そのような治療を必要とする患者に、IL-6アンタゴニストと免疫抑制剤とを投与することを含んで成る方法。

【請求項 5 6】

IL-6関連疾患の治療のためのIL-6アンタゴニストの使用における作用増強のための方法であって、そのような治療を必要とする患者に、免疫抑制剤とIL-6アンタゴニストとを投与することを含んで成る方法。

20

【請求項 5 7】

IL-6アンタゴニストによるIL-6関連疾患の治療の際のアレルギー反応の予防又は軽減のための方法であって、そのような治療を必要とする患者に、免疫抑制剤とIL-6アンタゴニストとを投与することを含んで成る方法。

【請求項 5 8】

IL-6アンタゴニストの高投与量投与によりIL-6関連疾患を治療する方法において、そのような治療を必要とする患者に、高投与量のIL-6アンタゴニストを投与することを含んで成る方法。

30

【請求項 5 9】

IL-6関連疾患の治療の際のアレルギー反応の予防又は軽減のための方法であって、そのような治療を必要とする患者に、高用量のIL-6アンタゴニストを投与することを含んで成る方法。

【請求項 6 0】

前記IL-6アンタゴニストが、抗IL-6抗体である、請求項55～59のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記抗IL-6R抗体が、ヒトIL-6Rに対するモノクローナル抗体である、請求項55～59のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項 6 2】

前記抗IL-6R抗体が、マウスIL-6Rに対するモノクローナル抗体である、請求項55～59のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記抗IL-6R抗体が、組換え型抗体である、請求項55～62のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記ヒト抗IL-6Rモノクローナル抗体がPM-1抗体である、請求項61に記載の方法。

【請求項 6 5】

50

前記マウス抗IL-6Rモノクローナル抗体がMR16-1抗体である、請求項62に記載の方法。

【請求項66】

前記抗IL-6R抗体がIL-6Rに対するキメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体である、請求項59～64のいずれか1項に記載の方法。

【請求項67】

前記抗IL-6Rに対するヒト化抗体がヒト化PM-1抗体である、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

前記IL-6関連疾患が、慢性関節リウマチ、プラズマサイトーシス、高イムノグロブリン症、貧血、腎炎、悪液質、多発性骨髄腫、キャッスルマン病、メサンギウム増殖性腎炎、全身性エリテマトーデス、クローン病、膵炎、乾癬、小児慢性関節炎、または全身型若年性突発性関節炎である、請求項55～67のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項69】

前記の、免疫抑制剤又は抗IL-6R抗体と免疫抑制剤とを投与する治療方法であって、抗IL-6R抗体の投与量が、0.02～150mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である、請求項55～57及び60～68のいずれか1項に記載の方法。

【請求項70】

抗IL-6R抗体の投与量が、0.5～30mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である、請求項69に記載の方法。

【請求項71】

抗IL-6R抗体の投与量が、2～8mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である、請求項70に記載の方法。

20

【請求項72】

前記の、高投与量の抗IL-6R抗体を投与することを含んで成る、IL-6関連疾患治療方法又は高用量の抗IL-6R抗体を投与する治療方法であって、抗IL-6R抗体の投与量が、4mg/kg/4週以上又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である、請求項58～68のいずれか1項に記載の方法。

【請求項73】

抗IL-6R抗体の投与量が、6～16mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である、請求項72に記載の方法。

【請求項74】

抗IL-6R抗体の投与量が、6～10mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である、請求項73に記載の方法。

30

【請求項75】

前記免疫抑制剤がメトトレキセート(MTX)である、請求項55～57及び60～74のいずれか1項に記載の方法。

【請求項76】

前記MTXの投与量が、1～100mg/body/週である、請求項75に記載の方法。

【請求項77】

前記MTXの投与量が、4～50mg/body/週である、請求項76に記載の方法。

【請求項78】

前記MTXの投与量が、7.5～25mg/body/週である、請求項77に記載の方法。

40

【請求項79】

前記抗IL-6R抗体と前記免疫抑制剤とを同時投与するための、請求項55～57及び60～78のいずれか1項に記載の方法。

【請求項80】

前記抗IL-6R抗体と前記免疫抑制剤とを時間を隔てて投与するための、請求項55～57及び60～78のいずれか1項に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

50

本発明は、インターロイキン - 6 アンタゴニスト (IL-6アンタゴニスト)、特にインターロイキン - 6 レセプター (IL-6R) に対する抗体 (抗IL-6R抗体) と免疫抑制剤の併用、および高用量の抗IL-6R抗体投与による、インターロイキン - 6 (IL-6) 関連疾患の治療方法に関する。

【背景技術】

【0002】

IL-6はB細胞刺激因子2 (BSF2)あるいはインターフェロン 2とも呼称されたサイトカインである。IL-6は、Bリンパ球系細胞の活性化に関与する分化因子として発見され (Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76)、その後、種々の細胞の機能に影響を及ぼす多機能サイトカインであることが明らかになった (Akira, S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78)。IL-6は、Tリンパ球系細胞の成熟化を誘導することが報告されている (Lotz, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258)。

10

【0003】

IL-6は、細胞上で二種の蛋白質を介してその生物学的活性を伝達する。一つは、IL-6が結合する分子量約80kDのリガンド結合性蛋白質のIL-6受容体である (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981, Yamasaki, K. et al., Science (1987) 241, 825-828)。IL-6受容体は、細胞膜を貫通して細胞膜上に発現する膜結合型の他に、主にその細胞外領域からなる可溶性IL-6受容体としても存在する。

【0004】

国際公開WO92/19759には、抗IL-6R抗体の種々の形態、例えばヒト型化抗IL-6R抗体、キメラ抗IL-6R抗体、などが記載されている。WO96/11020には、抗IL-6R抗体などのIL-6アンタゴニストを活性成分とする慢性関節リウマチ治療剤及び滑膜細胞増殖抑制剤が記載されている。WO96/12503には、プラズマサイトーシス、高イムノグロブリン血症、貧血、腎炎、悪液質、リウマチ、キャスルマン病、メサングウム増殖性腎炎、などのIL-6の生産に起因する疾患の治療について記載されている。WO98/42377には、抗IL-6R抗体を有効成分とする、感作T細胞関与疾患、たとえば多発性硬化症、ブドウ膜炎、慢性甲状腺炎、遅延性過敏症、接触性皮膚炎、アトピー性皮膚炎などの予防・治療剤が記載されている。

20

【0005】

WO98/42377には、抗IL-6R抗体を有効成分とする、全身性エリテマトーデス治療剤が記載されている。WO99/47170には、抗IL-6R抗体を有効成分とするクローン病の治療剤が記載されている。WO00/10607には、抗IL-6R抗体を有効成分とする膵炎の治療剤が記載されている。WO02/3492には、抗IL-6R抗体を有効成分とする乾癬の治療剤が記載されている。更に、WO02/080969には、抗IL-6R抗体を有効成分とする小児慢性関節炎の治療剤が記載されている。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記の如く、抗IL-6R抗体を有効成分とする種々の予防又は治療剤は知られていたが、抗IL-6R抗体と、メトトレキセート (MTX) の如き免疫抑制剤との併用によりIL-6関連疾患の治療において相乗効果が得られること、メトトレキセート (MTX) の如き免疫抑制剤により、抗IL-6R抗体によるリウマチの治療の際のアレルギー反応を軽減又は予防することが出来ること、及び抗IL-6R抗体によるリウマチの治療の際のアレルギー反応が、抗IL-6R抗体の高用量の投与で軽減又は予防することが出来ることは知られていなかった。

40

【課題を解決するための手段】

【0007】

従って、本発明は、インターロイキン - 6 アンタゴニスト (IL-6アンタゴニスト) と免疫抑制剤とを含んで成る、IL-6関連疾患の治療用医薬組成物を提供する。

本発明はまた、IL-6関連疾患の治療のためのIL-6アンタゴニストの使用における作用増強のための、免疫抑制剤を含んで成る医薬組成物を提供する。

本発明はまた、IL-6アンタゴニストによるIL-6関連疾患の治療の際のアレルギー反応の

50

予防又は軽減のための、免疫抑制剤を含んで成る医薬組成物を提供する。

【0008】

本発明は更に、IL-6アンタゴニストを含んで成る、高投与量投与用のIL-6関連疾患治療剤を提供する。

本発明は更に、IL-6関連疾患の治療の際のアレルギー反応の予防又は軽減のための、高用量のIL-6アンタゴニストを含んで成る医薬組成物を提供する。

【0009】

前記IL-6アンタゴニストは、好ましくは抗IL-6R抗体である。前記抗IL-6R抗体は、好ましくは、IL-6Rに対するモノクローナル抗体である。好ましくは、前記抗IL-6R抗体は、ヒトIL-6Rに対するモノクローナル抗体である。あるいは、好ましくは、前記抗IL-6R抗体は、マウスIL-6Rに対するモノクローナル抗体である。好ましくは、前記抗IL-6R抗体は組換え型抗体である。好ましくは、前記ヒト抗IL-6Rモノクローナル抗体は例えばPM-1抗体である。好ましくは、前記マウス抗IL-6Rモノクローナル抗体は、例えばMR16-1抗体である。前記抗体は更に、IL-6Rに対するキメラ抗体、ヒト型化抗体またはヒト抗体であってもよい。具体的な好ましい抗IL-6R抗体は、例えば、ヒト型化PM-1抗体である。

【0010】

IL-6アンタゴニスト、特に抗IL-6R抗体と、免疫抑制剤とを併用する場合、IL-6アンタゴニスト、特に抗IL-6抗体の投与量は、例えば、0.02～150mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量であり、好ましくは0.5～30mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量であり、そして更に好ましくは2～8mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である。

【0011】

IL-6アンタゴニスト、特に抗IL-6R抗体を高投与量で投与する場合、IL-6アンタゴニスト、特に抗IL-6R抗体の投与量は、例えば、4mg/kg/4週以上又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量であり、好ましくは6～16mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量であり、そして特に好ましくは6～10mg/kg/4週又はこれと同等の血中抗IL-6R抗体濃度を示す投与量である。

【0012】

免疫抑制剤としてMTXを使用する場合、MTXの投与量は、例えば、1～100mg/body/週又はこれと同等の血中MTX濃度を示す投与量であり、好ましくは4～50mg/body/週又はこれと同等の血中MTX濃度を示す投与量であり、そして特に好ましくは10～25mg/body/週又はこれと同等の血中MTX濃度を示す投与量である。

ここで血中薬物（抗IL-6R抗体MTXなど）濃度を示す投与量とは、同等の治療効果を有する投与量を意味し、たとえば静脈内注射、皮下注射などの投与方法の違いによる血中濃度の推移の違いがある場合でも治療効果が同等である場合には、血中薬物（抗IL-6R抗体MTXなど）濃度を示す投与量ということとする。

【0013】

前記IL-6関連疾患の例としては、

急性、慢性炎症性疾患、自己免疫疾患：

腎炎、メサングリウム増殖性腎炎、クローン病、潰瘍性大腸炎、膵炎、小児慢性関節炎、または全身型若年性特発性関節炎、血管炎、川崎病、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、乾癬、シェーグレン症候群、成人スチル病

腫瘍性疾患：

多発性骨髄腫、キャッスルマン病、悪性リンパ腫、腎癌、

感染症：

HIV感染症、EBV感染症

悪液質：

悪液質

その他：

プラズマサイトーシス、高イムノグロブリン症、貧血

などがあげられ、好ましくは、

慢性関節リウマチ、プラズマサイトーシス、高イムノグロブリン症、貧血、腎炎、悪液質、多発性骨髄腫、キャッスルマン病、メサングيوم増殖性腎炎、全身性エリテマトーデス、クローン病、膵炎、乾癬、小児慢性関節炎、または全身型若年性突発性関節炎である。

【0014】

本発明の医薬組成物は、経口的にまたは非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、坐薬、注腸、経口性腸溶剤などを選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。実際の投与量の下限上限は、投与間隔が長い場合には1回あたりの投与量は多くなり、投与間隔が短い場合には1回当たりの投与量が少なくなるなど、投与頻度に影響を受ける。

10

【0015】

抗IL-6レセプター抗体の好ましい投与量、投与方法は、たとえば、血中にフリーの抗体が存在する程度の量が有効投与量であり、具体的な例としては、1回から数回に分けて、例えば2回/週、1回/週、1回/2週、1回/4週、1回/6週、1回/8週などの投与スケジュールで点滴などの静脈内注射、皮下注射などの方法で、投与する方法などである。投与スケジュールは、病状の観察および血液検査値の動向を観察しながら2回/週あるいは1回/週から1回/2週、1回/3週、1回/4週、1回/6週、1回/8週のように投与間隔を延ばしていくなど調整することも可能である。

20

【0016】

MTX併用投与の場合、前記抗IL-6R抗体の投与量は、例えばリウマチ治療の場合には、通常、1週間あたりの投与量が0.5 mg/kgを超える投与量または同等以上の抗リウマチ効果を示す投与量である。たとえば、静脈投与を4週に1回行う場合には、0.02~150mg/kgであり、好ましくは0.5~30mg/kg、更に好ましくは2~8mg/kgである。

【0017】

前記抗IL-6R抗体と前記免疫抑制剤とは同時投与され、あるいは時間を隔てて投与される。

前記免疫抑制剤としては、抗リウマチ薬、副腎皮質ホルモン剤なども含み、例えば以下のような薬剤があげられる。

30

A. 免疫抑制剤、抗リウマチ薬、副腎皮質ホルモン剤

【0018】

【表1】

表1

免疫抑制剤

アルキル化剤

シクロフォスファミド

代謝拮抗剤

アザチオプリン、メトトレキサート、ミゾリピン

40

T細胞活性阻害剤

シクロスポリン、タクロリムス

抗リウマチ薬

ハイドロキシクロロキン、サルファサラジン、レフルノマイド、エタネルセプト、インフリキシマブ、アダリムマブ、D-ペニシラミン、経口金剤、注射金剤（筋注）、ミノサイクリン、金チオリンゴ酸ナトリウム、オーラノフィン、D-ペニシラミン、ロベンザリット、プシラミン、アクタリット、

【0019】

50

【表 2】

表 2

副腎皮質ホルモン：

コルチゾン、ヒドロコルチゾン類

酢酸コルチゾン、ヒドロコルチゾン、リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム、コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム、酢酸フルドロコルチゾン

プレドニゾン、プレドニゾン類

プレドニゾン、コハク酸プレドニゾンナトリウム、リン酸プレドニゾンナトリウム、酢酸ハロプレドン

メチルプレドニゾン類

メチルプレドニゾン、酢酸メチルプレドニゾン、コハク酸メチルプレドニゾンナトリウム、

トリアムシノロン類

トリアムシノロン、酢酸トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド

デキサメタゾン類

デキサメタゾン、酢酸デキサメタゾン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、バルミチン酸デキサメタゾン

ベタメタゾン類

ベタメタゾン（リン酸ベタメタゾンナトリウム）、ベタメタゾン、リン酸ベタメタゾンナトリウム

パラメタゾン類

酢酸パラメタゾン

10

20

【 0 0 2 0 】

前記免疫抑制剤の投与量は、例えばリウマチ治療に M T X を併用する場合には、M T X の投与量は、たとえば経口投与する場合には、1 週間あたり 1 ~ 1 0 0 m g / body であり、好ましくは 4 ~ 5 0 m g / body であり、更に好ましくは 7 . 5 ~ 2 5 m g / body である。

30

また、抗 IL-6R 抗体の高投与量とは、IL-6 関連疾患の治療に有効な最低投与量と同等か又はそれ以上の投与量でアレルギー反応を予防または軽減しうる投与量を意味し、例えばリウマチ治療において、4 週間隔で点滴静脈内投与する場合には 4mg/kg 以上の投与量、好ましくは 6 ~ 1 6 mg/kg、さらに好ましくは 6 ~ 1 0 mg/kg があげられる。

【 0 0 2 1 】

上記投与方法、投与間隔、投与量は好ましい例の一例を示すものであり、同様の治療効果を示す投与方法、投与間隔、投与量を適宜選択することができる。たとえば各薬剤の血中濃度を測定することにより上記好ましい例と同様の効果を示す投与方法、投与間隔、投与量を選択することが可能であり、上記例と同等の血中濃度を達成する投与方法、投与間隔、投与量も本発明に含まれる。

40

【発明を実施するための形態】

【 0 0 2 2 】

本発明で使用される IL-6 アンタゴニストは、IL-6 関連疾患の予防又は治療効果を示すものであれば、その由来、種類、形状を問わない。

IL-6 アンタゴニストは、IL-6 の生化学的活性を阻害する物質である。IL-6 アンタゴニストは、好ましくは IL-6、IL-6R 又は gp130 のいずれかの結合に対する阻害作用を有する物質である。IL-6 アンタゴニストとしては、抗 IL-6 抗体、抗 IL-6R 抗体、抗 gp130 抗体、IL-6 改変体、可溶性 IL-6R 改変体、あるいは IL-6 又は IL-6R の部分ペプチド、ならびにこれらと同様の活性を示す低分子物質が挙げられる。

50

【0023】

本発明で使用される抗IL-6抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗IL-6抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はIL-6と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

【0024】

このような抗体としては、MH166 (Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956) やSK2 抗体 (Sato, K. et al., 第21回 日本免疫学会総会、学術記録(1991) 21, 166) 等が挙げられる。

10

抗IL-6抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0025】

具体的には、抗IL-6抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6は、Eur. J. Biochem (1987) 168, 543-550、J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541、あるいはAgr. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688 に開示されたIL-6遺伝子/アミノ酸配列を用いることによって得られる。

20

IL-6の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のIL-6蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6蛋白質を感作抗原として用いればよい。また、IL-6蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質を感作抗原として用いてもよい。

【0026】

本発明で使用される抗IL-6受容体抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗IL-6受容体抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はIL-6受容体と結合することにより、IL-6のIL-6受容体への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

30

【0027】

このような抗体としては、MR16-1抗体 (Tamura, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U SA (1993) 90, 11924-11928)、PM-1抗体 (Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906)、AUK12-20抗体、AUK64-7 抗体あるいはAUK146-15 抗体 (国際特許出願公開番号WO 92-19759) などが挙げられる。これらのうちで、特に好ましい抗体としてPM-1抗体が挙げられる。

40

【0028】

なお、PM-1抗体産生ハイブリドーマ細胞株は、PM-1として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) に、平成元年7月12日に、FERM BP-2998としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。また、MR16-1 抗体産生ハイブリドーマ細胞株は、Rat-mouse hybridoma MR16-1として、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター (茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6) に、平成9年3月13日に、FERM BP-5875としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

【0029】

抗IL-6受容体モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し

50

、以下のようにして作製できる。すなわち、IL-6受容体有感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

【0030】

具体的には、抗IL-6受容体抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトIL-6受容体は、欧州特許出願公開番号EP 325474 及び日本特許出願公開番号特開平3-155795に開示されたIL-6受容体遺伝子/アミノ酸配列を用いることによって得られる。

IL-6受容体蛋白質は、細胞膜上に発現しているものと細胞膜より離脱しているもの(可溶性IL-6受容体)(Yasukawa, K. et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676)との二種類がある。可溶性IL-6受容体抗体は細胞膜に結合しているIL-6受容体の実質的に細胞外領域から構成されており、細胞膜貫通領域あるいは細胞膜貫通領域と細胞内領域が欠損している点で膜結合型IL-6受容体と異なっている。IL-6受容体蛋白質は、本発明で用いられる抗IL-6受容体抗体の作製の感作抗原として使用されうる限り、いずれのIL-6受容体を使用してもよい。

【0031】

IL-6受容体の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のIL-6受容体蛋白質を公知の方法で精製し、この精製IL-6受容体蛋白質有感作抗原として用いればよい。また、IL-6受容体を発現している細胞やIL-6受容体蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質有感作抗原として用いてもよい。

ヒトIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpIBBSF2R を含有する大腸菌(E. coli)は、平成元年(1989年)1月9日付で独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6)に、HB101-pIBBSF2R として、受託番号FERM BP-2232としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

【0032】

本発明で使用される抗gp130抗体は、公知の手段を用いてポリクローナル又はモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗gp130抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものがある。この抗体はgp130と結合することにより、IL-6/IL-6受容体複合体のgp130への結合を阻害してIL-6の生物学的活性の細胞内への伝達を遮断する。

このような抗体としては、AM64抗体(特開平3-219894)、4B11抗体および2H4抗体(US 5571513)B-S12抗体およびB-P8抗体(特開平8-291199)などが挙げられる。

【0033】

抗gp130モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、gp130有感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナル抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原として使用されるgp130は、欧州特許出願公開番号EP 411946に開示されたgp130遺伝子/アミノ酸配列を用いることによって得られる。

【0034】

gp130の遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中又は、培養上清中から目的のgp130蛋白質を公知の方法で精製し、この精製gp130蛋白質有感作抗原として用いればよい。また、gp130を発現している細胞やgp130蛋白質と他の蛋白質との融合蛋白質有感作抗原として用いてもよい。

【0035】

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内又は、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

10

【0036】

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

【0037】

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローム細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3X63Ag8.653 (Kearney, J. F. et al. J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133)等が適宜使用される。

20

【0038】

前記免疫細胞とミエローム細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

30

【0039】

免疫細胞とミエローム細胞との使用割合は、例えば、ミエローム細胞に対して免疫細胞を1~10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローム細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

【0040】

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローム細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37 程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1000~6000程度のPEG溶液を通常、30~60% (w/v)の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

40

【0041】

当該ハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えば、HAT培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間、通常数日~数週間継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、目的とす

50

る抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよびクローニングが行われる。

【0042】

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を *in vitro* で所望の抗原蛋白質又は抗原発現細胞で感作し、感作Bリンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、所望の抗原又は抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子のレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原又は抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 94/25585、WO 96/34096、WO 96/33735参照）。

【0043】

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

【0044】

例えば、抗IL-6受容体抗体産生ハイブリドーマの作製は、特開平3-139293に開示された方法により行うことができる。独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター（茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6）に、平成元年7月12日に、FERM BP-2998としてブタベスト条約に基づき国際寄託されたPM-1抗体産生ハイブリドーマをBALB/cマウスの腹腔内に注入して腹水を得、この腹水からPM-1抗体を精製する方法や、本ハイブリドーマを適当な培地、例えば、10%ウシ胎児血清、5%BM-Condimed H1（Boehringer Mannheim製）含有RPMI1640培地、ハイブリドーマSFM培地（GIBCO-BRL製）、PFHM-II培地（GIBCO-BRL製）等で培養し、その培養上清からPM-1抗体を精製する方法で行うことができる。

【0045】

本発明には、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる（例えば、Borrebaeck C. A. K. and Larrick J. W. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990参照）。

【0046】

具体的には、目的とする抗体を産生する細胞、例えばハイブリドーマから、抗体の可変（V）領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299）、AGPC法（Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159）等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit（Pharmacia製）等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit（Pharmacia製）を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

【0047】

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDER RACE Kit（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932）を使用することができる。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の

10

20

30

40

50

方法、例えば、デオキシ法により確認する。

【0048】

目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。又は、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでよい。

本発明で使用される抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

【0049】

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ（Chimeric）抗体、ヒト型化（Humanized）抗体、ヒト（human）抗体を使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 92-19759参照）。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

【0050】

例えば、キメラPM-1抗体のL鎖およびH鎖のV領域をコードするDNAを含むプラスミドは、各々pPM-k3およびpPM-h1と命名され、このプラスミドを有する大腸菌は、National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limitedに、1991年2月12日に、各々NCIMB 40366及びNCIMB40362としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

ヒト型化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域（CDR）をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている（欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 92-19759参照）。

【0051】

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域（FR; framework region）を連結するように設計したDNA配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドからPCR法により合成する。得られたDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる（欧州特許出願公開番号EP 239400、国際特許出願公開番号WO 92-19759参照）。

【0052】

CDRを介して連結されるヒト抗体のFRは、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい（Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

キメラ抗体、ヒト型化抗体には、ヒト抗体C領域が使用される。ヒト抗体C領域としては、Cが挙げられ、例えば、C1、C2、C3又はC4を使用することができる。また、抗体又はその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

【0053】

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明に使用される抗体として有用である。

本発明に使用されるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化PM-1抗体が挙げられる（国際特許出願公開番号WO 92-19759参照）。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 4 】

また、ヒト抗体の取得方法としては先に述べた方法のほか、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体 (scFv) としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択することもできる。選択されたファージの遺伝子を解析すれば、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原に結合するscFvのDNA配列が明らかになれば、当該配列をを適当な発現ベクターを作製し、ヒト抗体を取得することができる。これらの方法は既に衆知であり、WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, WO 95/15388を参考にすることができる。

10

【 0 0 5 5 】

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その3'側下流にポリA シグナルを機能的に結合させたDNA あるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター/エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウイルス前記プロモーター/エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げる事ができる。

【 0 0 5 6 】

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター/エンハンサーとして、レトロウイルス、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、シミアンウイルス40 (SV 40) 等のウイルスプロモーター/エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター1 (HEF1) などの哺乳類細胞由来のプロモーター/エンハンサーを用いればよい。

20

例えば、SV 40 プロモーター/エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Mulligan, R. C. et al., Nature (1979) 277, 108-114)、また、HEF1 プロモーター/エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Mizushima, S. and Nagata, S. Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

【 0 0 5 7 】

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げる事ができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Ward, E. S. et al., Nature (1989) 341, 544-546 ; Ward, E. S. et al. FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Better, M. et al. Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

30

【 0 0 5 8 】

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、peIBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383) を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド (refold) して使用する (例えば、WO96/30394を参照)。

【 0 0 5 9 】

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

40

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、in vitroおよびin vivo の産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

【 0 0 6 0 】

50

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、又は真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO、COS、ミエローマ、BHK (baby hamster kidney)、HeLa、Veroなど、(2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9、sf21、Tn5などが知られている。植物細胞としては、ニコチアナ・タバクム (*Nicotiana tabacum*)由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サッカロミセス (*Saccharomyces*) 属、例えばサッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、糸状菌、例えばアスペルギルス属 (*Aspergillus*) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などが知られている。

【0061】

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (*E. coli*)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、*in vivo* にて抗体を産生してもよい。

【0062】

一方、*in vivo* の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系などがある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシなどを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。また、昆虫としては、カイコを用いることができる。植物を使用する場合、例えばタバコを用いることができる。

【0063】

これらの動物又は植物に抗体遺伝子を導入し、動物又は植物の体内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギカゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ又はその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい。(Ebert, K.M. et al., *Bio/Technology* (1994) 12, 699-702)。

【0064】

また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Maeda, S. et al., *Nature* (1985) 315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えばpMON 530に挿入し、このベクターを *Agrobacterium tumefaciens* のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えば *Nicotiana tabacum* に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24, 131-138)。

【0065】

上述のように *in vitro* 又は *in vivo* の産生系にて抗体を産生する場合、抗体重鎖 (H鎖) 又は軽鎖 (L鎖) をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい (国際特許出願公開番号WO 94-11523 参照)。

本発明で使用される抗体は、本発明に好適に使用され得るかぎり、抗体の断片やその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv又はH鎖とL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv (scFv) が挙げられる。

【0066】

具体的には、抗体を酵素、例えば、パパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させる

10

20

30

40

50

か、又は、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる（例えば、Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-666、Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照）。

【0067】

scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域を連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域はリンカー、好ましくは、ペプチドリナーを介して連結される（Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883）。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、上記抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結するペプチドリナーとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

【0068】

scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖又は、H鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖又は、L鎖V領域をコードするDNAを鋳型とし、それらの配列のうちの所望のアミノ酸配列をコードするDNA部分を、その両端を規定するプライマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリナー部分をコードするDNAおよびその両端を各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

【0069】

また、一旦scFvをコードするDNAが作製されれば、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることができ、また、その宿主を用いて常法に従って、scFvを得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本発明でいう「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

【0070】

抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール（PEG）等の各種分子と結合した抗体を使用することもできる。本発明でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

【0071】

前記のように産生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインAカラム、プロテインGカラムが挙げられる。プロテインAカラムに用いる担体として、例えば、Hyper D、POROS、Sephacryl S4B等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。

【0072】

例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用される抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。これらのクロマトグラフィーはHPLC（High performance liquid chromatography）に適用し得る。また、逆相HPLC（reverse phase HPLC）を用いてもよい。

【0073】

上記で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定又はELISA等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、PBS(-)で適当に希釈した後、280 nmの吸光度を

10

20

30

40

50

測定し、1 mg/ml を1.35 OD として算出する。また、ELISA による場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M重炭酸緩衝液 (pH9.6) で 1 μ g /mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG (TAG製) 100 μ l を96穴プレート (Nunc製) に加え、4 で一晩インキュベーションし、抗体を固相化する。ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用される抗体又は抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG (CAPPEL製)100 μ l を添加し、室温にて1時間インキュベーションする。

【0074】

洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100 μ l を加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 製) を用いて405nm での吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

10

本発明で使用されるIL-6改変体は、IL-6受容体との結合活性を有し、且つIL-6の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、IL-6改変体はIL-6受容体に対しIL-6と競合的に結合するが、IL-6の生物学的活性を伝達しないため、IL-6によるシグナル伝達を遮断する。

【0075】

IL-6改変体は、IL-6のアミノ酸配列のアミノ酸残基を置換することにより変異を導入して作製される。IL-6改変体のもととなるIL-6はその由来を問わないが、抗原性等を考慮すれば、好ましくはヒトIL-6である。

【0076】

具体的には、IL-6のアミノ酸配列を公知の分子モデリングプログラム、たとえば、WHAT IF (Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56) を用いてその二次構造を予測し、さらに置換されるアミノ酸残基の全体に及ぼす影響を評価することにより行われる。適切な置換アミノ酸残基を決定した後、ヒトIL-6遺伝子をコードする塩基配列を含むベクターを鋳型として、通常行われるPCR 法によりアミノ酸が置換されるように変異を導入することにより、IL-6改変体をコードする遺伝子が得られる。これを必要に応じて適当な発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、産生及び精製方法に準じてIL-6改変体を得ることができる。

20

【0077】

IL-6改変体の具体例としては、Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93、及びSavino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367、WO 96-18648、WO96-17869に開示されている。

30

本発明で使用されるIL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、各々IL-6受容体あるいはIL-6との結合活性を有し、且つIL-6の生物学的活性を伝達しない物質である。即ち、IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドはIL-6受容体又はIL-6に結合し、これらを捕捉することによりIL-6のIL-6受容体への結合を特異的に阻害する。その結果、IL-6の生物学的活性を伝達しないため、IL-6によるシグナル伝達を遮断する。

【0078】

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、IL-6又はIL-6受容体のアミノ酸配列においてIL-6とIL-6受容体との結合に係わる領域の一部又は全部のアミノ酸配列からなるペプチドである。このようなペプチドは、通常10~80、好ましくは20~50、より好ましくは20~40個のアミノ酸残基からなる。

40

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドは、IL-6又はIL-6受容体のアミノ酸配列において、IL-6とIL-6受容体との結合に係わる領域を特定し、その一部又は全部のアミノ酸配列を通常知られる方法、例えば遺伝子工学的的手法又はペプチド合成法により作製することができる。

【0079】

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドを遺伝子工学的的手法により作製するには、所望のペプチドをコードするDNA 配列を発現ベクターに組み込み、前記組換え型抗体の発現、産生及び精製方法に準じて得ることができる。

IL-6部分ペプチド又はIL-6受容体部分ペプチドをペプチド合成法により作製するには、

50

ペプチド合成において通常用いられている方法、例えば固相合成法又は液相合成法を用いることができる。

【0080】

具体的には、続医薬品の開発第14巻ペプチド合成 監修矢島治明廣川書店1991年に記載の方法に準じて行えばよい。固相合成法としては、例えば有機溶媒に不溶性である支持体に合成しようとするペプチドのC末端に対応するアミノ酸を結合させ、 α -アミノ基及び側鎖官能基を適切な保護基で保護したアミノ酸をC末端からN末端方向の順番に1アミノ酸ずつ縮合させる反応と樹脂上に結合したアミノ酸又はペプチドの α -アミノ基の該保護基を脱離させる反応を交互に繰り返すことにより、ペプチド鎖を伸長させる方法が用いられる。固相ペプチド合成法は、用いられる保護基の種類によりBoc法とFmoc法に大別される。

10

【0081】

このようにして目的とするペプチドを合成した後、脱保護反応及びペプチド鎖の支持体からの切断反応をする。ペプチド鎖との切断反応には、Boc法ではフッ化水素又はトリフルオロメタンスルホン酸を、又Fmoc法ではTFAを通常用いることができる。Boc法では、例えばフッ化水素中で上記保護ペプチド樹脂をアニソール存在下で処理する。次いで、保護基の脱離と支持体からの切断をしペプチドを回収する。これを凍結乾燥することにより、粗ペプチドが得られる。一方、Fmoc法では、例えばTFA中で上記と同様の操作で脱保護反応及びペプチド鎖の支持体からの切断反応を行うことができる。

【0082】

得られた粗ペプチドは、HPLCに適用することにより分離、精製することができる。その溶出にあたり、蛋白質の精製に通常用いられる水-アセトニトリル系溶媒を使用して最適条件下で行えばよい。得られたクロマトグラフィーのプロファイルのピークに該当する画分を分取し、これを凍結乾燥する。このようにして精製したペプチド画分について、マスマスペクトル分析による分子量解析、アミノ酸組成分析、又はアミノ酸配列解析等により同定する。

20

IL-6部分ペプチド及びIL-6受容体部分ペプチドの具体例は、特開平2-188600、特開平7-324097、特開平8-311098及び米国特許公報US 5210075に開示されている。

【0083】

本発明の医薬組成物は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン(HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

30

40

【実施例】

【0084】

以下、実施例および参考例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例1

MRAは、サイトカインであるインターロイキン-6の機能を阻害するIgG1サブクラスの組換えヒト化抗ヒトインターロイキン-6レセプターモノクローナル抗体である。日本及びヨーロッパにおける先の研究において、MRAは関節リウマチの治療において有望であり、安全であることが示されている。

【0085】

50

この試験は、関節リウマチの治療のためのMRAの単独投与の場合及びメトトレキセートと併用した場合の最適投与量を決めるためのフェーズIIの大規模試験である。単独投与及びメトトレキセートとの併用投与としての、MRAの反復静脈内投与の効果をもとにメトトレキセートを一定期間投与しても症状を有する関節リウマチを有する患者において、メトトレキセート単独投与と比較した。MRAの有効性、安全性及び認容性について評価した。

【0086】

方法

対象：アメリカリウマチ学会（ACR）の1987年分類基準で関節リウマチと診断され、最低6ヶ月間、少なくとも12.5mg/週のメトトレキセート（MTX）で効果が不十分または症状の再燃した（MTX投与で安全性に問題のある症例については10mg/週で可）罹患歴6ヶ月以上の活動性を有する関節リウマチ患者

10

試験デザイン：中央登録法による無作為割付二重盲検並行群間比較試験

用法用量：MRA 0mg/kg（プラセボ）+MTX、2mg/kg+MTX、4mg/kg+MTX、8mg/kg+MTX、2mg/kg+MTXプラセボ、4mg/kg+MTXプラセボあるいは8mg/kg+MTXプラセボの7群。治験薬（MRAまたはプラセボ）は4週間隔で点滴静脈内投与する。メトトレキセート（10-25mg/週）またはMTXプラセボは1週間に1回経口投与する。

【0087】

試験方法：無作為に割り付けられた各投与量のMRAを4週間隔で計4回点滴静脈内投与し、有効性および安全性を16週目まで2週間隔で評価し、20週目に経過を観察した。有効性の第一エンドポイントを16週目（最後の投与の4週間後）のけるACR 20の比率とした。第二エンドポイントに、16週間目（最後の投与の4週間後）におけるACR 50及びACR 70の比率を含めた。

20

ACR改善基準：下記7項目の内、腫脹関節数および疼痛関節数が20%以上改善し、かつ、残り5項目中3項目で20%以上の改善が認められた症例をACR基準20%以上改善ありとする。50%および70%改善は上記の20%改善部分がそれぞれ50%、70%改善した患者をさす。

【0088】

- (1) 腫脹関節数
- (2) 疼痛関節数
- (3) 患者による疼痛評価
- (4) 患者による全般評価
- (5) 医師による全般評価
- (6) 患者による日常生活動作の評価（MHAQ）
- (7) CRPまたはESR

30

【0089】

【表3】

表3

	2mg/kg MRA	4mg/kg MRA	8mg/kg MRA	MTX
ACR 20	30.8%	61.1%	62.7%	40.8%
ACR 50	5.8%	27.8%	41.2%	28.6%
ACR 70	1.9%	5.6%	15.7%	16.3%
	2mg/kg MRA+MTX	4mg/kg MRA+MTX	8mg/kg MRA+MTX	
ACR 20	64.0%	63.3%	73.5%	
ACR 50	32.0%	36.7%	53.1%	
ACR 70	14.0%	12.2%	36.7%	

40

【0090】

50

MRA単独投与群2mg/kgを除く全群でコントロール群に比べて統計学的有意に高いACR20改善率が認められた。MRA 8mg/kg+MTX群ではACR50%、70%改善頻度がそれぞれ53.1%、36.7%とコントロール群の28.6%、16.3%に比べて統計学的に有意に有効率が高かった。MRA単独群においてACR20改善率に統計学的に有意な用量依存性が認められた。また、ACR50、ACR70改善率については、MRA単独群、MTX併用群ともに統計学的に有意な用量依存性が認められた。

【0091】

腫脹関節数の減少(表4)

平均腫脹関節数は、ベースラインにおいて、すべての処理群にわたって近似していた。

7処理群すべてにおいて、暴露時間の増加と共にベースラインからの腫脹関節数の累積的減少が存在した。MRA 8mg/kg投与群における腫脹関節数の減少の平均は、MTX投与群における減少に比べて統計的に有意であった ($p = 0.001$)。16週において、MRA 8mg/kg投与群とMTX投与群との間の差(95% CI)の平均は、 -2.31 (-4.07 、 -0.55)であった。MTX単独治療群間に統計的に有意な直線的投与量相関関係が存在した ($p < 0.001$)。MRA 8mg/kg + MTX 投与群における腫脹関節数の減少の平均値は、MTX投与群における減少に比べて統計的に有意であった ($p < 0.001$)。MRA 8mg/kg + MTX 投与群とMTX投与群との間の差(96% CI)の平均は、 -3.62 (-5.39 、 -1.84)であった。MRT併用治療群との間に統計的に有意な直線的投与量相互関係が存在した ($p = 0.004$)。

【0092】

【表4】

表4

	2mg/kg MRA	4mg/kg MRA	8mg/kg MRA	MTX
ベースライン： N 平均値±SD	52 11.6±4.6	54 11.1±4.4	51 12.2±5.2	49 12.7±4.2
ベースライン からの変化： 16週 N 平均値±SD	42 -4.5±5.7	43 -5.8±4.1	43 -8.4±4.6	39 -5.7±6.1
	2mg/kg MRA+MTX	4mg/kg MRA+MTX	8mg/kg MRA+MTX	
ベースライン： N 平均値±SD	50 11.9±4.3	49 11.9±3.9	49 11.8±3.9	
ベースライン からの変化： 16週 N 平均値±SD	46 -6.2±4.6	42 -6.8±5.4	44 -9.4±4.0	

【0093】

登録症例数359例中、安全性評価対象例359例、有効性評価対象例FAS(Full Analysis Set) 354例、PPS(Per Protocol Set) 307例であった。359例が登録され、299例が投与を完了し、中止例は60例であった。この中止例のうち、33例は有害事象、1例は他疾患の併発、7例は有害事象、7例は併用禁止薬の使用、5例は試験参加同意書の撤回、1例は経過観察の未実施、22例は有効性の欠如によるものであった(重複理由を含む)。

【0094】

因果関係の否定できない重篤な有害事象のうち、感染症が5例報告された。すなわち、2mg/kg MRAにおいて足の膿瘍及び骨髓炎1例、胸部感染、胸膜炎の1例、8mg/kg MRA +

MTXにおいて敗血症 (septicaemia) 1例、8 mg/kg MRA + MTXにおいて敗血症 (sepsis) 1例、及び8 mg/kg MRA + MTXにおいて関節の感染1例が報告された。その他、5例の過敏症が因果関係の否定できない重篤な有害事象として報告された。即ち2 mg/kg MRAにおいて4例及び4 mg/kg MRAにおいて1例の過敏症が報告された。これらの過敏症反応の全てがMRAの3回目又は4回目の後にMTX非併用群に生じた。

【0095】

肝機能に関する臨床検査値に関し、MRAを投与した結果として、ALT及びASTの上昇が見られたが、それらの上昇は他のリウマチ患者に見られるものと同様であった。MRA群においては、脂質関連臨床検査値 (総コレステロール、HDLコレステロール及びトリグリセライド) の増加が見られた。しかしながら、動脈硬化指数 (Atherogenic Index) の変化は無かった。

10

若干の患者の好中球数に一過性の僅かな低下が生じた。疾患の活動性に関するパラメータ、即ちCRP、ESRの低下、HBの上昇が用量依存的かつ、臨床的に有意な変化が、認められた。

【0096】

注入反応

注入反応は、薬剤投与の24時間以内に生ずる有害事象として定義される。各処理群における注入反応を経験した患者の数が、MRAでは逆の用量反応性を示す可能性が示唆された。

抗 - MRA抗体

抗 - MRA抗体の生成を試験した。8 mg/kg処理群 (単独投与またはMTXとの併用) において生成しなかった。MRA単独投与群に比べてMTX併用群において出現数は少なかった。

20

【0097】

結論

MRA単独療法及びMTXと併用したMRAにおいて、明瞭な用量反応性が認められ、その関節リウマチに対する有効性が確認された。また、MRAは単独投与およびMTXとの併用投与において安全性が確認された。

【0098】

参考例 1 . ヒト可溶性IL-6受容体の調製

Yamasakiらの方法 (Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828) に従い得られたIL-6受容体をコードするcDNAを含むプラスミドpBSF2R.236を用いて、PCR法により可溶性IL-6受容体を作成した。プラスミドpBSF2R.236を制限酵素Sph Iで消化して、IL-6受容体cDNAを得、これをmp18 (Amersham製) に挿入した。IL-6受容体cDNAにストップコドンを導入するようにデザインした合成オリゴプライマーを用いて、インビトロミュータジェネシスシステム (Amersham製) により、PCR法でIL-6受容体cDNAに変異を導入した。この操作によりストップコドンがアミノ酸345の位置に導入され、可溶性IL-6受容体をコードするcDNAが得られた。

30

【0099】

可溶性IL-6受容体cDNAをCHO細胞で発現するために、プラスミドpSV (Pharmacia製) と連結させ、プラスミドpSVL344を得た。dhfrのcDNAを含むプラスミドpECEdhfrにHind III -Sal Iで切断した可溶性IL-6受容体cDNAを挿入し、CHO細胞発現プラスミドpECEdhfr344を得た。

40

【0100】

10 µgのプラスミドpECEdhfr344をdhfr-CHO細胞株DXB-11 (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220)へカルシウムフォスフェイト沈降法 (Chen, C. et al., Mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745-2751) により、トランスフェクトした。トランスフェクトしたCHO細胞を1mMグルタミン、10%透析FCS、100U/mlのペニシリンおよび100 µg/mlのストレプトマイシンを含むヌクレオシド不含MEM選択培養液で3週間培養した。

【0101】

50

選択されたCHO 細胞を限界希釈法でスクリーニングし、単一のCHO 細胞クローンを得た。このCHO 細胞クローンを20nM～200nM の濃度のメトトレキサートで増幅し、ヒト可溶性IL-6受容体産生CHO 細胞株5E27を得た。CHO 細胞株5E27を5%FBS を含むイスコーブ改変ダルベコ培養液 (IMDM、Gibco 製) で培養した。培養上清を回収し、培養上清中の可溶性IL-6受容体の濃度をELISA にて測定した。その結果、培養上清中には可溶性IL-6受容体が存在することが確認された。

【0102】

参考例2 . 抗ヒトIL-6抗体の調製

10 μ g の組換え型IL-6 (Hirano, T. et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41) をフロント完全アジュバントとともにBALB/cマウスを免疫し、血清中に抗IL-6抗体が検出できるまで一週間毎にこれを続けた。局所のリンパ節から免疫細胞を摘出し、ポリエチレングリコール1500を用いてミエローマ細胞株P3U1と融合させた。ハイブリドーマをHAT 培養液を用いるO_iらの方法 (Selective Methods in Cellular Immunology, W.H.Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) に従って選択し、抗ヒトIL-6抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。

10

【0103】

抗ヒトIL-6抗体を産生するハイブリドーマは下記のようにしてIL-6結合アッセイをおこなった。すなわち、柔軟なポリビニル製の96穴マイクロプレート (Dynatech Laboratories, Inc. 製, Alexandria, VA) を0.1Mのcarbonate-hydrogen carbonate緩衝液 (pH 9.6) 中で100 μ l のヤギ抗マウスIg (10 μ l /ml, Cooper Biomedical, Inc製 Malvern, PA) により4 度で一晩コートした。次いで、プレートを100 μ l の1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBS により室温で2 時間処理した。

20

【0104】

これをPBS で洗浄した後、100 μ l のハイブリドーマ培養上清を各穴へ加え、4 度で一晩インキュベートした。プレートを洗浄して、2000cpm/0.5ng/wellとなるように¹²⁵I 標識組換え型IL-6を各穴へ添加し、洗浄した後各穴の放射活性をガンマカウンター (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA) で測定した。216 ハイブリドーマクローンのうち32のハイブリドーマクローンがIL-6結合アッセイにより陽性であった。これらのクローンのなかで最終的に安定なMH166.BSF2が得られた。該ハイブリドーマが産生する抗IL-6抗体MH166 はIgG1 のサブタイプを有する。

30

【0105】

ついで、IL-6依存性マウスハイブリドーマクローンMH60.BSF2 を用いてMH166 抗体によるハイブリドーマの増殖に関する中和活性を調べた。MH60.BSF2 細胞を1 $\times 10^4$ /200 μ l /穴となるように分注し、これにMH166 抗体を含むサンプルを加え、48時間培養し、0.5 μ Ci/ 穴の³H チミジン (New England Nuclear, Boston, MA) を加えた後、更に6 時間培養を続けた。細胞をグラスフィルターペーパー上におき、自動ハーベスター (Labo Mas h Science Co., Tokyo, Japan) で処理した。コントロールとしてウサギ抗IL-6抗体を用いた。

その結果、MH166 抗体はIL-6により誘導されるMH60.BSF2 細胞の³H チミジンの取込みを容量依存的に阻害した。このことより、MH166 抗体はIL-6の活性を中和することが明らかとなった。

40

【0106】

参考例3 . 抗ヒトIL-6受容体抗体の調製

Hirataらの方法 (Hirata, Y. et al. J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906) により作成した抗IL-6受容体抗体MT18をCNBrにより活性化させたセファロース4B (Pharmacia Fine Chemicals製, Piscataway, NJ) と添付の処方にしたがって結合させ、IL-6受容体 (Yamaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828) を精製した。ヒトミエローマ細胞株U266を1%ジギトニン (Wako Chemicals製) , 10mMトリエタノールアミン (pH 7.8) および1.5M NaClを含む1mM p-パラアミノフェニルメタンスルフォニルフルオリドハイドロクロリド (Wako Chemicals製) (ジギトニン緩衝液) で可溶化し、セファロース4Bビーズと結

50

合させたMT18抗体と混合した。その後、ビーズをジギトニン緩衝液で6回洗浄し、免疫するための部分精製IL-6受容体とした。

【0107】

BALB/cマウスを 3×10^9 個のU266細胞から得た上記部分精製IL-6受容体で10日おきに4回免疫し、その後常法によりハイブリドーマを作成した。成長陽性穴からのハイブリドーマ培養上清を下記の方法にてIL-6受容体への結合活性を調べた。 5×10^7 個のU266細胞を ^{35}S -メチオニン(2.5mCi)で標識し、上記ジギトニン緩衝液で可溶化した。可溶化したU266細胞を0.04ml容量のセファロース4Bビーズと結合させたMT18抗体と混合し、その後、ジギトニン緩衝液で6回洗浄し、0.25mlのジギトニン緩衝液(pH3.4)により ^{35}S -メチオニン標識IL-6受容体を流出させ、0.025mlの1M Tris(pH 7.4)で中和した。

10

【0108】

0.05mlのハイブリドーマ培養上清を0.01mlのProtein G セファロース(Pharmacia製)と混合した。洗浄した後、セファロースを上記で調製した0.005mlの ^{35}S 標識IL-6受容体溶液とともにインキュベートした。免疫沈降物質をSDS-PAGEで分析し、IL-6受容体と反応するハイブリドーマ培養上清を調べた。その結果、反応陽性ハイブリドーマクローンPM-1(FERM BP-2998)を樹立した。ハイブリドーマPM-1から産生される抗体は、IgG1のサブタイプを有する。

【0109】

ハイブリドーマPM-1が産生する抗体のヒトIL-6受容体に対するIL-6の結合阻害活性をヒトミエローマ細胞株U266を用いて調べた。ヒト組換え型IL-6を大腸菌より調製し(Hirano, T. et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41-45)、ポルトン-ハンター試薬(New England Nuclear, Boston, MA)により ^{125}I 標識した(Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981)。

20

【0110】

4×10^5 個のU266細胞を1時間、70%(v/v)のハイブリドーマPM-1の培養上清および14000cpmの ^{125}I 標識IL-6とともに培養した。70 μl のサンプルを400 μl のマイクロフュージポリエチレンチューブに300 μl のFCS上に重層し、遠心の後、細胞上の放射活性を測定した。

その結果、ハイブリドーマPM-1が産生する抗体は、IL-6のIL-6受容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

30

【0111】

参考例4. 抗マウスIL-6受容体抗体の調製

Saito, T. et al., J. Immunol. (1991) 147, 168-173に記載の方法により、マウスIL-6受容体に対するモノクローナル抗体を調製した。

マウス可溶性IL-6受容体を産生するCHO細胞を10%FCSを含むIMDM培養液で培養し、その培養上清から抗マウスIL-6受容体抗体RS12(上記Saito, T. et al 参照)をAffigel 10ゲル(Biorad製)に固定したアフィニティークラムを用いてマウス可溶性IL-6受容体を精製した。

【0112】

得られたマウス可溶性IL-6受容体50 μg をフロイント完全アジュバンドと混合し、ウィスターラットの腹部に注射した。2週間後からはフロイント不完全アジュバンドで追加免疫した。45日目にラット脾臓細胞を採取し、 2×10^8 個を 1×10^7 個のマウスミエローマ細胞P3U1と50%のPEG1500(Boehringer Mannheim製)をもちいて常法により細胞融合させた後、HAT培地にてハイブリドーマをスクリーニングした。

40

【0113】

ウサギ抗ラットIgG抗体(Cappel製)をコートしたプレートにハイブリドーマ培養上清を加えた後、マウス可溶性IL-6受容体を反応させた。次いで、ウサギ抗マウスIL-6受容体抗体およびアルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗ウサギIgGによるELISA法によりマウス可溶性IL-6受容体に対する抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングした。抗体の産生が確認されたハイブリドーマクローンは2回のサブスクリーニングを行い、単一の

50

ハイブリドーマクローンを得た。このクローンをMR16-1と名付けた。

【0114】

このハイブリドーマが産生する抗体のマウスIL-6の情報伝達における中和活性をMH60.BSF2細胞(Matsuda, T. et al., J. Immunol. (1988) 18, 951-956)を用いた³Hチミジンの取込みで調べた。96ウェルプレートにMH60.BSF2細胞を 1×10^4 個/200 μ l/ウェルとなるように調製した。このプレートに10pg/mlのマウスIL-6とMR16-1抗体又はRS12抗体を12.3~1000ng/ml加えて37℃、5%CO₂で44時間培養した後、1 μ Ci/ウェルの³Hチミジンを加えた。4時間後に³Hチミジンの取込みを測定した。その結果MR16-1抗体はMH60.BSF2細胞の³Hチミジン取込みを抑制した。

したがって、ハイブリドーマMR16-1(FERM BP-5875)が産生する抗体は、IL-6のIL-6受容体に対する結合を阻害することが明らかとなった。

10

【手続補正書】

【提出日】令和2年7月27日(2020.7.27)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

本件明細書に記載の発明。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
A 6 1 P	1/00 (2006.01)	A 6 1 P	1/00	
A 6 1 P	1/18 (2006.01)	A 6 1 P	1/18	
A 6 1 P	17/06 (2006.01)	A 6 1 P	17/06	
A 6 1 P	13/12 (2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	9/14 (2006.01)	A 6 1 P	9/14	
A 6 1 P	7/06 (2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	37/02	
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1

(72)発明者 吉田 憲彰

東京都中央区京橋2丁目1-9 中外製薬株式会社内

(72)発明者 ラビンダー ネイス メイニ

イギリス国, ロンドン エスダブリュ13 9イーダブリュ, バーンズ, キャッスルノー 1 5 1

Fターム(参考) 4C084 AA02 AA20 MA02 MA52 MA55 NA05 NA06 NA07 ZA361 ZA551
 ZA661 ZA681 ZA811 ZA891 ZA961 ZB071 ZB082 ZB151 ZB261 ZC751
 4C085 AA14 BB11 CC23 EE01 GG02
 4C086 AA01 AA02 CB09 MA02 MA04 NA05 NA06 NA07 ZA36 ZA55
 ZA66 ZA68 ZA81 ZA89 ZA96 ZB07 ZB15 ZB26 ZC75