(12) **PATENT**

(19) NO (11) **321089** (13) **B1**

NORGE

(51) Int Cl.
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	19971546	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	1995.06.07 PCT/JP95/01144
(22)	Inng.dag	1997.04.04	(85)	Videreføringsdag	1997.04.04
(24)	Løpedag	1995.06.07	(30)	Prioritet	1994.10.07, JP, 244035
(41)	Alm.tilgj	1997.06.04			
(45)	Meddelt	2006.03.13			

(73) Innehaver Tadamitsu Kishimoto, 3-5-31, Nakano-cho, 584 TONDABAYASHI-SHI, OSAKA, JP
Chugai Seiyaku KK , 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, 115-8543 TOKYO, JP

(72) Oppfinner Tadamitsu Kishimoto, Tondabayashi-shi, Osaka, JP
Masahiko Mihara,
c/o Chugai Seiyaku KK, 135 Komakado 1-chome, 4112 GOTENBA-SHI, SHIZUOKA, JP
Yoichiro Moriya,
c/o Chugai Seiyaku KK, 135 Komakado 1-chome, 4112 GOTENBA-SHI, SHIZUOKA, JP
Yoshiyuki Ohsugi,
c/o Chugai Seiyaku KK, 135 Komakado 1-chome, 4112 GOTENBA-SHI, SHIZUOKA, JP

(74) Fullmektig Bryn & Aarflot AS, Postboks 449 Sentrum, 0104 Oslo, NO

(54) Benevnelse **Anvendelse av et interleukin-6 antistoff eller interleukin-6 reseptorantistoff for fremstilling av en farmasøytisk blanding for behandling av unormal synovialcelle-vekst.**

(56) Anførte publikasjoner EP 0 399 429 A1, EP 0 572 118 A1, EP 0 617 126 A2, FR 2 694 767 A1
US 5 210 075, WO 92/19759 A1

(57) Sammendrag

Det fremskaffes en synovialcelle-vekstinhibitor, eller en farmasøytisk blanding for behandling av kronisk reumatoid artritt basert på synovialcelle-vekstinhibitoren. Den farmasøytiske blanding for behandling av kronisk reumatoid artritt eller synovialcelle-vekstinhibitoren inneholder en IL-6 antagonist, slik som IL-6 antistoff eller IL-6R antistoff som en effektiv komponent.

Den foreliggende oppfinnelse vedrører en anvendelse av et interleukin-6 antistoff eller interleukin-6 reseptorantistoff for fremstilling av en farmasøytisk blanding for behandling av unormal synovialcelle-vekst.

Kronisk leddgikt er en systemisk kronisk betennelsessykdom der unormal vekst av bindevev, deri inkludert synovialt vev, forekommer i leddene (Melnyk et al., Arthritis Rheum. 33:493-500, 1990). Leddene hos pasienter med kronisk reumatoid artritt har blitt vist å ha en markert vekst av synovialceller, dannelsen av en struktur med flere lag som fremkalles av unormal vekst av synovialcellene (dannelse av pannus), invasjon av synovialceller inn i bruskvev og benvev, vaskularisering mot synovialvevet og infiltrasjon av betennelsesceller slik som lymfocytter og makrofager. Mekanismene som forårsaker begynnelse av reumatoid artritt har blitt rapportert å være basert på slike faktorer som arvelighet, bakterielle infeksjoner og med bistand fra ulike cytokiner og vekstfaktorer, men den generelle mekanisme som påbegynner prosessen har forblitt ukjent.

Senere år har cytokiner og vekstfaktorer, inkluderende interleukin-1 (IL-1), interleukin-8 (IL-8), tumornekrosefaktor α (TNFα), transformerende vekstfaktor β (TGFβ), fibroblast vekstfaktor (FGF) og blodplatederivert vekstfaktor (PDGF) blitt oppdaget i synovialmembranen og synovialvæsken hos pasienter med reumatoid artritt (Nouri et al., Clin. Exp. Immunol. 55:295-302, 1984; Thornton et al., Clin. Exp. Immunol. 86:79-86, 1991; Saxne et al., Arthritis Rheum. 31:1041-1045, 1988; Seitz et al., J. Clin. Invest. 87:463-469, 1991; Lafyatis et al., J. Immunol. 143:1142-1148, 1989; Melnyk et al., Arthritis Rheum. 33:493-500, 1990).

Det antas at IL-1, TNFα og PDGF er spesielt sterke synovialcelle-vekstfaktorer (Thornton et al., Clin. Exp. Immunol. 86:79-86, 1991; Lafyatis et al., J. Immunol. 143:1142-1148, 1989; Gitter et al., Immunology 66:196-200, 1989). Det har også blitt antydet at stimulering med IL-1 og TNF resulterer i produksjon av interleukin-6 (IL-6) i synovialcellene (Ito et al., Arthritis Rheum. 35:1197-1201, 1992).

IL-6 er et cytokin som også er kjent som B-celle-stimulerende faktor 2 eller interferon β2. IL-6 ble oppdaget som en differensieringsfaktor som bidro til aktivering av B-lymfoide celler (Hirano, T. et al., Nature, 324, 73-76, 1986), og ble senere funnet å være et multifunksjonelt cytokin som påvirker funksjonen av en rekke av ulike celletyper (Akira, S. et al., Adv. in Immunology 54, 1-78, 1993). To funksjonelt ulike membranmolekyler er nødvendig for induksjon av IL-6 aktiviteter. En av disse er

IL-6 reseptoren (IL-6R), et protein med omtrent 80 kD molekylvekt, som binder spesifikt til IL-6.

IL-6R eksisterer i en membranbundet form som uttrykkes på cellemembranen og penetrerer cellemembranen, samt i form av en løselig IL-6R (sIL-6R) som hovedsakelig består av det ekstracellulære domenet. Et annet protein er gp130 med en molekylvekt på tilnærmet 130 kD, som er ikke-ligandbindende, men heller fungerer i å mediere signaloverføring. IL-6 og IL-6R former komplekse IL-6/IL-6R som igjen binder med et annet membranprotein, nemlig gp130, for å indusere den biologiske aktivitet av IL-6 til cellen (Taga et al. J. Exp. Med. 196:967, 1987).

I løpet av foreliggende søknads behandling er det trukket frem fem mothold; D1 : EP 0 617 126, D2 : FR 2 694 767, D3 : EP 0 399 429, D4 : EP 0 572 118, D5 : US 5 210 075. D1 omhandler polyeptider som inhiberer binding mellom human IL-6 og dens reseptor som kan benyttes i IL-6 assosierte sykdommer. D2 omfatter farmasøytiske blandinger med IL-6 reseptorspesifikke antistoffer for behandling av inflammatoriske sykdommer. D3 beskriver monoklonale antistoffer spesifikke for IL-6 som kan redusere den biologiske aktiviteten til human interleukin-6. D4 omtaler monoklonale antistoffer spesifikke for gp130 og farmasøytiske blandinger omfattende dem. D5 beskriver IL-6 antagonistpeptider og blandinger inneholdende disse.

Foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelse av et interleukin-6 antistoff eller interleukin-6 reseptorantistoff for fremstilling av en farmasøytisk blanding for behandling av unormal synovialcelle-vekst. Ingen av de siterte D1-D5 vedrører behandling av unormal synovialcelle-vekst, og foreliggende oppfinnelse er den første til å tilveiebringe en slik anvendelse av interleukin-6 antistoff, eller et interleukin-6 reseptorantistoff.

Det har blitt rapportert at serum eller synovialvæske fra reumatoid artrittpasienter inneholder forhøyede mengder av interleukin-6 (IL-6) og løselig IL-6 reseptor (sIL-6R) (Houssiau et al., Arthritis Rheum. 31:784-788, 1988; Hirano et al., Eur. J. Immunol. 18:1797-1801, 1988; Yoshioka et al., Japn. J. Rheumatol. in press), og siden lignende resultater også har blitt oppnådd i dyremodeller av reumatoid artritt (Takai et al.,, Arthritis Rheum. 32:594-600, 1989; Leisten et al., Clin. Immunol. Immunpathol. 56:108-115, 1990), har det blitt antydet at IL-6 på en ukjent måte er innblandet i kronisk reumatoid artritt.

Imidlertid viser japansk ikke-gransket patentpublikasjon nr. 4-89433 at peptider som sterkt fremmer IL-6 produksjon er effektive som behandlinger for reumatoid artritt.

Higaki et al. har også antydet at synovialceller fra kronisk reumatoid artrittpasienter har en forminsket vekstreaksjon som respons på IL-6, og at IL-6 således har en inhibitorisk funksjon mot vekst av synovialceller (Clinical Immunology, 22:880-887, 1990). Således finnes motstridende rapporter hva angår relasjonen mellom IL-6 og kronisk reumatoid artritt, og dette forhold er foreløpig uklart.

Wendling et al. har nylig rapportert at tilførsel av anti-IL-6 antistoffer til pasienter med reumatoid artritt fører til en forbigående forbedring av de kliniske og biologiske symptomer, samtidig som IL-6-nivåer i serum øker (J. Rheumatol. 20:259-262, 1993).

Disse rapporter frembringer ingen resultater angående problemet om IL-6 aksellererer vekst av synovialceller fra kronisk reumatoid artritt, eller har en inhibitorisk effekt, og det er således fremdeles ukjent om IL-6 har eller ikke har en direkte effekt på synovialcellene fra pasienter med kronisk reumatoid artritt.

Anti-inflammatoriske steroidforbindelser slik som kortikosteroider, har blitt benyttet som middel mot reumatoid artritt, men siden deres kontinuerlige bruk fører til uønskede bivirkninger slik som hudskader og hemming av binyrebarkfunksjonen, har medikamenter som har mindre bivirkninger blitt ettersøkt.

Det er et mål for den foreliggende oppfinnelse å fremskaffe en ny anvendelse av et interleukin-6 antistoff eller interleukin-6 reseptorantistoff for fremstilling av en farmasøytisk blanding for behandling av unormal synovialcelle-vekst.

Foretrukket er nevnte interleukin-6 antistoff, et antistoff mot human interleukin-6, og nevnte interleukin-6 reseptorantistoff er et antistoff mot human interleukin-6 reseptor. I andre foretrukne aspekt av foreliggende oppfinnelse er antistoffet som anvendes PM-1 antistoff og mer foretrukket humanisert PM-1 antistoff.

De herværende oppfinnere har utført grundig forskning vedrørende rollen som IL-6 kan spille på synovialceller fra reumatoid artritt. Under denne forskning ble ingen vekst av synovialceller fra reumatoid artritt funnet med IL-6 alene, og en faktor i tillegg til IL-6 ble derfor studert, noe som har resultert i den herværende oppfinnelse basert på oppdagelsen at mens IL-6 alene har tilnærmet ingen vekststimulerende effekt på synovialceller så fremkommer en sterk synovialcelle-veksteffekt i nærvær av både IL-6 og løselig IL-6R, og videre at denne veksteffekt på synovialceller blir

undertrykket ved tilførsel av en antagonist som hemmer IL-6-aktivitet, slik som IL-6 antistoff eller IL-6R antistoff.

KORT BESKRIVELSE AV FIGURENE

Fig. 1 er en grafisk fremstilling som viser opptak av ^{3}H-tymidin i synovialceller i nærvær av enten IL-6 eller sIL-6R alene og i nærvær av både IL-6 og sIL-6R.

Fig. 2 er en grafisk fremstilling som viser effekt av IL-6 antistoff eller IL-6R antistoff på opptak av ^{3}H-tymidin i synovialceller i nærvær av både IL-1β og sIL-6R.

Fig. 3 er en grafisk fremstilling som viser effekt av IL-6 antistoff eller IL-6R antistoff på opptak av ^{3}H-tymidin i synovialceller i nærvær av både IL-6 og sIL-6R.

Fig. 4 er en grafisk fremstilling som viser den hemmende effekt av IL-6R antistoff på initiering av mus-kollagen-indusert artritt-modeller.

Fig. 5 er en grafisk fremstilling som viser serum anti-kollagen antistoff-nivåer hos mus med artritt.

Fig. 6 er et fotografi av en histopatologisk undersøkelse av baklabbsleddet hos en kollagen artritt-mus. (a) er et fotografi fra en mus i en gruppe som har fått tilført IL-6 reseptor-antistoff, og (b) er fra en mus-gruppe som har fått tilført et kontroll-antistoff. I gruppen som har fått tilført IL-6 reseptor-antistoff var invasjonen av granulasjonsvev inn i brusk og ben (kronisk proliferativ synovitt) tydelig dempet.

En farmasøytisk blanding for behandling av kronisk reumatoid artritt er et medikament som ved tilførsel til pasienter med kronisk reumatoid artritt undertrykker vekst av synovialceller i ledd og har en dempende og terapeutisk virkning på symptomene.

IL-6 antagonisten kan fremkomme fra enhver kilde så lenge det er en substans som blokkerer IL-6 signaloverføring og hemmer IL-6 biologisk aktivitet. IL-6 antagonister inkluderer IL-6 antistoff, IL-6R antistoff, gp130 antistoff, modifisert IL-6, antisens IL-6R og delpeptider fra IL-6 eller IL-6R.

Et antistoff benyttet som en antagonist slik som IL-6 antistoff, IL-6R antistoff eller gp130 antistoff, kan være av enhver opprinnelse eller type (monoklonal, polyklonal), men monoklonale antistoff avledet fra pattedyr, blir spesielt foretrukket. Disse antistoffer binder til IL-6, IL-6R eller gp130 for å hemme binding mellom IL-6

og IL-6R eller IL-6R og gp130 og blokkerer således IL-6 signaloverføring, noe som hemmer IL-6 biologisk aktivitet.

Dyrearten hvorfra de monoklonalt antistoffproduserende celler hentes, er ikke spesielt begrenset så lenge det er et pattedyr, og humane antistoff eller antistoff fremskaffet fra et ikke-humant pattedyr kan benyttes. Monoklonale antistoff fremskaffet fra et ikke-humant pattedyr, er fortrinnsvis monoklonale antistoff fremskaffet fra kaniner eller gangere siden disse er enklere å preparere. Det er ingen spesielle restriksjoner på gangertypen, men foretrukne eksempler er mus, rotter og hamstere.

Eksempler på slike antistoff som er IL-6 antistoff inkluderer MH166 (Matsuda et al., Eur. J. Immunol. 18:951-956, 1988) og SK2 antistoff (Sato et al., Journal for the 21st General Meeting of the Japan Immunology Association, 21:116, 1991). Eksempler på IL-6R antistoff inkluderer PM-1 antistoff (Hirata et al. J. Immunol. 143:2900-2906, 1989), AUK12-20 antistoff, AUK64-7 antistoff og AUK146-15 antistoff (internasjonal ubehandlet patentsøknad nr. WO92-19759). Et eksempel på gp130 antistoff er AM64 antistoff (Japansk ikke-undersøkt patentpublikasjon nr. 3-219894).

Ifølge foreliggende oppfinnelse er anvendelse av PM-1 antistoff foretrukket.

Monoklonale antistoff kan bli preparert på den følgende måte som er basert på en velkjent teknikk. I denne blir IL-6, IL-6R eller gp130 benyttet som det sensitiserende antigen for immunisering ifølge en konvensjonell immuniserings-metode, og de resulterende immunocytter blir deretter fusjonert med kjente foreldreceller ved hjelp av en konvensjonell cellefusjonsmetode, og monoklonalt antistoff-produserende celler blir utvalgt ved hjelp av en konvensjonell utvelgelsesmetode for å fremskaffe antistoffene.

Mer spesifikt kan de monoklonale antistoffer bli fremstilt på følgende måte. Dersom det sensitiserende antigen for eksempel er humant IL-6, blir antistoffene fremskaffet ved å bruke gensekvensen for human IL-6 som har blitt rapportert av Hirano et al., Nature, 324:73, 1986. Den humane IL-6 gensekvens blir innsatt i et ekspresjonsvektorsystem og benyttet for å transformere passende vertsceller, hvoretter det ønskede IL-6-protein blir renset fra vertscellene eller fra kultursupernatanten og det rensede IL-6-protein blir deretter benyttet som det sensitiserende antigen.

I tilfelle av det humane IL-6R kan IL-6R proteinet fremskaffes ved hjelp av den samme metode som beskrevet for human IL-6 over, ved å bruke gensekvensen som er oppgitt i europeisk patentsøknad nr. EP325474. To typer av IL-6R eksisterer, en som uttrykkes på cellemembranen og en i en løselig form (sIL-6R) som er adskilt fra cellemembranen. sIL-6R består hovedsakelig av det ekstracellulære domene av IL-6R som er bundet til cellemembranen, og det skiller seg fra det membranbundne IL-6R i at det mangler transmembrandomenet eller transmembrandomenet og det intracellulære domenet.

Hva angår human gp130 kan gp130 proteinet fremkalles ved hjelp av den samme metode som for human IL-6 som er beskrevet over, under bruk av gensekvensen som er offentliggjort i europeisk patentsøknad nr. EP411946.

Typen pattedyr som immuniseres med det sensitiserende agens er ikke begrenset til spesifikke typer, men dyr utvelges fortrinnsvis med hensyn til deres kompatibilitet med foreldrecellen som benyttes for cellefusjonen, og vanligvis kan mus, rotter, hamstere og kaniner benyttes.

Immunisering av dyrene med det sensitiserende antigen kan oppnås ved hjelp av en offentlig kjent metode. For eksempel involverer en vanlig metode intraperitoneal eller subkutan injeksjon av det sensitiserende antigen inn i pattedyret. I detalj blir det sensitiserende antigen fortrinnsvis fortynnet med en ekvivalent av PBS (fosfat-buffret saltvann) eller fysiologisk saltvann, suspendert og benyttet sammen med en passende mengde av et konvensjonelt adjuvans, slik som Freunds komplette adjuvans dersom dette er ønsket, og deretter tilført pattedyret et par ganger hver 4-21 dag. En passende bærer kan også bli benyttet for immunisering sammen med det sensitiserende antigen.

Etter denne immunisering og bekreftelse av øket serumnivå av det ønskede antistoff, blir immunocytter tatt ut fra pattedyrene og brukt i cellefusjonen, med miltceller som spesielt foretrukne immunocytter.

Foreldrecellene benyttet for fusjon med de ovenfor beskrevne immunocytter kan være myelomceller fra pattedyr, og en rekke av allerede offentlig kjente cellelinjer kan passende bli benyttet, inkluderende P3 (P3x63Ag8.653) (J.Immunol. 123:1548, 1978), p3-U1 (Current Topics in Microbiology and Immunology 81:1-7, 1978), NS-1 (Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976), MPC-11 (Cell, 8:405-415, 1976), SP2/0 (naturem 276:269-270, 1978), Of (J. Immunol. Meth. 35:1-21, 1980), S194 (J. Exp. Med. 148:313-323. 1978), R210 (Nature, 277:131-133, 1979). Cellefusjonen av

immunocyttene med myelomcellene kan baseres på en velkjent metode, for eksempel metoden til Milstein et al. (Milstein et al., Methods Enzymol. 73:3-46, 1981).

I mer detalj blir den oven beskrevne cellefusjon utført i en vanlig cellekultur i nærvær av en cellefusjonspromoter. Fusjonspromoteren som benyttes kan være for eksempel polyetylenglykol (PEG) eller Sendai-virus (HVJ) og dersom det ønskes kan en hjelp slik som dimetylsulfoksyd også bli tilsatt for å øke fusjonseffektiviteten.

Proposjonene av immunocytter og myelomceller som benyttes er fortrinnsvis en 1 til 10 ganger mengde av immunocytter sammenlignet med myelomcellene. Dyrkningsmediet som benyttes for cellefusjonen kan for eksempel være RPMI 1640 kulturmedium eller MEM kulturmedium som er passende for vekst av myelomcellelinjer, eller andre vanlige kulturmedier som benyttes for slik celledyrkning, og supplementære serumløsninger, slik som føtalt kalveserum (FCS) kan også benyttes med disse.

Cellefusjonen blir utført ved at de foreskrevne mengder av immunocytter og myelomcellene blandes grundig i dyrkningsmediet som er beskrevet over, tilførsel av en PEG-løsning som er varmet på forhånd til ca. 37°C, for eksempel med PEG med en gjennomsnittlig molekylvekt på ca. 1000 til 6000, tilsatt dyrkningsmediet vanligvis i en konsentrasjon på 30 til 60% (vekt/volum), og deretter blanding for å danne de ønskede fusjonerte celler (hybridomer). Som neste trinn er prosedyren med gradvis tilsetning av et passende dyrkningsmedium og sentrifugering for å fjerne supernatanten repetert, for å få fjernet det cellefusjonerende agens, etc., noe som er uheldig for vekst av hybridomene.

Passende hybridomer blir utvalgt ved å dyrke i et normalt selektivt dyrkningsmedium, slik som HAT dyrkningsmedium (noe som inneholder hypoksantin, aminopterin og tymin). Dyrkingen i HAT-kulturmedium blir fortsatt i en spesifisert tid, vanligvis et par dager til et par uker, som er tilstrekkelig for at cellene som ikke er hybridomer dør pg blir borte (ikke-fusjonerte celler). Deretter blir vanlig begrenset fortynning utført, og hybridomene som produserer de ønskede antistoff blir utsatt for masking og monokloning.

De monoklonale antistoffproduserende hybridomer som er fremskaffet på denne måte, kan bli subdyrket i et vanlig dyrkningsmedium og de kan også plasseres i flytende nitrogen for langstidslagring.

For å fremskaffe de monoklonale antistoffer fra hybridomene blir hybridomene dyrket ifølge en vanlig metode, hvoretter kultursupernatanten blir oppsamlet, eller en metode blir benyttet hvorved hybridomene blir injisert til et kompatibelt pattedyr, der de tillates å vokse, og der bukvæsken så blir oppsamlet. Den første metoden er passende for å fremskaffe antistoff av høy renhetsgrad, mens den siste metoden er passende for masseproduksjon av antistoffene.

De monoklonale antistoffer som fremskaffes ved disse metoder kan deretter renses ved bruk av konvensjonelle protein-rensningsteknikker, slik som utsalting, gelfiltrering, affinitetskromatografi eller lignende.

De monoklonale antistoffer fremskaffet på denne måte kan deretter analyseres med henblikk på deres følsomhet og høygradig renhetsgjenkjennelse av antigenet ved hjelp av vanlig immunologiske teknikker, slik som radioimmunoassay (RIA), enzym-koblet immunoassay (EIA, ELISA), fluorescens antistoffteknikk (immunofluorescensanalyse), etc.

De monoklonale antistoff som benyttes ifølge oppfinnelsen er ikke begrenset til monoklonale antistoffer produsert fra hybridomer, og de kan være antistoff som har blitt kunstig modifisert med henblikk på å senke heteroantigenisiteten mot mennesker. For eksempel kan et kimært antistoff bli benyttet som består av den variable region fra et monoklonalt antistoff fra et ikke-humant pattedyr, slik som en mus, og den konstante region fra et humant antistoff, og slikt kimært antistoff kan produseres ved hjelp av en kjent kimær antistoffproduserende metode, spesielt ved hjelp av en genrekombinasjonsteknikk.

Omskapte humane antistoff kan også bli benyttet ifølge oppfinnelsen. Disse blir fremstilt ved å bruke den komplementære determinante region av en mus eller andre ikke-humant pattedyrs antistoff for å bytte ut den komplementære determinante region av et humant antistoff, og konvensjonelle genrekombinasjons-metoder for dette er velkjent. En av de kjente metoder kan benyttes for å fremskaffe et omskapt humant antistoff som er hensiktsmessig å anvende ifølge oppfinnelsen. Et foretrukket eksempel på et slikt gjenskapt humant antistoff er hPM-1 (se internasjonal patentsøknad nr. WO92-19759).

Når det er nødvendig kan aminosyrer fra ramme-regionen (FR) i den variable region til et antistoff, bli substituert slik at den komplementære determinante region i det omskapte humane antistoff danner et passende antistoff-bindingssete (Sato et al., Cancer Res. 53:851-856, 1993). I tillegg kan formålet som er beskrevet over

også oppnås ved at man konstruerer et gen som koder for et antistoff-fragment som binder til antigenet for å hemme IL-6-aktivitet, slik som Fab eller Fv, eller en enkelkjede Fv (scFv) der Fv til H- og L-kjedene blir bundet på via en passende forbindelse, og deretter bruke dette for ekspresjon i en passende vertscelle (se for eksempel Bird et al., TIBTECH, 9:132-137, 1991; Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988).

Modifisert IL-6 som benyttes ifølge oppfinnelsen kan være den beskrevet av Brakenhoff et al., i J. Biol. Chem. 269:86-93, 1994 eller Savino et al., EMBO J. 13:1357-1367, 1994.

Det modifiserte IL-6 som benyttes kan fremskaffes ved å introdusere en mutasjon slik som en substitusjon, delesjon eller insersjon, inn i IL-6 aminosyresekvensen for å vedlikeholde bindingsevnen med IL-6R, men eliminerende IL-6 signaloverføringsfunksjonen. Kilden for IL-6 kan være fra enhver dyreart så lenge den har de over beskrevne egenskaper, men i relasjon til antigenisitet blir vanligvis en type fremskaffet fra menneske foretrukket.

I mer detalj kan sekundærstrukturen til IL-6 aminosyresekvensen bli forutsagt ved hjelp av et offentlig kjent molekylært modellerende program, slik som WHATIF (Vriend et al., J. Mol. Graphics, 8:52-56, 1990), hvorved betydningen av muterte aminosyrerester kan bli evaluert på den totale struktur. Etter å ha avgjort de passende muterte aminosyrerester blir en vektor som inneholder nukleotidsekvensen som koder for det humane IL-6 gen benyttet som et templat for å introdusere mutasjonene ved den konvensjonelt benyttede PCR (polymerase kjedereaksjon) metoden, for derved å fremskaffe et gen som koder for det modifiserte IL-6. Dette blir deretter inkorporert inn i en passende ekspresjonsvektor dersom dette er nødvendig, og uttrykt i *E. coli*-celler eller pattedyrceller, og deretter benyttet enten mens det er i kultursupernatanten eller etter isolering og rensing ved hjelp av konvensjonelle metoder for å evaluere bindingsaktiviteten med henblikk på IL-6R, samt den nøytraliserte IL-6 signaloverføringsaktivitet.

Et delvis IL-6 peptid eller delvis IL-6R peptid som benyttes ifølge den foreliggende oppfinnelse, kan ha enhver sekvens så lenge det binder til henholdsvis IL-6R eller IL-6, og ikke har noen IL-6 aktivitetsoverføringsfunksjon. IL-6 delpeptider og IL-6R delpeptider er beskrevet i US-patentpublikasjon nr. US5210075. Et IL-6 antisens oligonukleotid er beskrevet i Japansk patentsøknad nr. 5-300338.

En farmasøytisk blanding for behandling av kronisk reumatoid artritt der den effektive komponent er en IL-6 antagonist, er effektiv i behandling av kronisk reumatoid artritt dersom den blokkerer IL-6 signaloverføring og undertrykker den unormale vekst av synovialceller som induseres av IL-6, som er implisert i sykdommen. Eksempel 1 demonstrerer den veksthemmende effekt på synovialceller fra pasienter med reumatoid artritt *in vitro*. I Eksempel 2 ble IL-6 reseptorantistoff tilført museartrittmodeller immunisert med type II kollagen, og de relevante data demonstrerer (1) hemming av artritt-begynnelse basert på en artritt-indeks (Figur 4), (2) suppresjon av anti-type II kollagen antistoffproduksjon i blodet hos kollagen-immuniserte mus (Figur 5) og (3) hemming av granulasjonsvevs-invasjon inn i brusk og ben (kronisk proliferativ synovitt) i bakpoteleddene hos museartrittmodeller som har fått tilført IL-6 reseptorantistoff (Figur 6).

Hva angår (1) og (2) beskrevet over, bekreftet resultatene en hemmende effekt av IL-6 reseptorantistoff, spesielt i initiale faser, på begynnelsen av artritt hos musemodellene. Resultatene av (3) demonstrerte at invasjon av granulasjonsvev inn i brusk og benvevet blir hemmet og at dette støtter resultatene observert i Eksempel 1 (*in vitro* hemming av synovial cellevekst).

De eksperimentelle resultater fra (1) og (2) indikerer at den farmasøytiske blanding for behandling av kronisk reumatoid artritt har en utmerket initial effekt på reumatoid artritt.

Den farmasøytiske blanding for behandling av kronisk reumatoid artritt blir fortrinnsvis tilført parenteralt, for eksempel ved intravenøs, intramuskulær, intraperitoneal eller subkutan injeksjon, enten systemisk eller lokalt. Det kan også være i form av en medisinsk formulerings-utstyrspakke sammen med minst en type av medisinsk bærer eller fortynningsmiddel.

Dosen av den farmasøytiske blanding for behandling av reumatoid artritt når tilført til mennesker, vil variere avhengig av den patologiske tilstand og alder hos pasienten, og tilførselsmetoden, og passende og korrekte doser må således bli utvalgt. Som et eksempel kan et maksimum av fire delte doser i området mellom omtrent 1 til 1000 mg/pasient bli utvalgt. Imidlertid er den farmasøytiske blanding for behandling av reumatoid artritt ikke begrenset til disse doser.

Den farmasøytiske blanding for behandling av reumatoid artritt kan formuleres ifølge konvensjonelle metoder. For eksempel blir en injeksjonsformulering preparert ved at den rensede IL-6 antagonisten oppløses i et løsningsmiddel slik som

fysiologisk saltvann eller en bufferløsning og deretter tilsatt en adsorpsjonshemmer slik som Tween 80, gelatin, humant serumalbumin (HSA) eller lignende, og blandingen kan så frysetørkes før bruk for rekonstitusjon i løsning. Eksipienten benyttet for frysetørking kan være en sukkeralkohol slik som mannitol eller glukose eller et sakkarid.

Eksempler

Den foreliggende oppfinnelse vil nå bli forklart i større detalj ved hjelp av de følgende eksempler, referanseeksempler og eksperimentelle eksempler.

Referanse-eksempel 1. Fremstilling av humant løselig IL-6 reseptor

Løselig IL-6R ble fremstillet (Yasukawa et al., J. Biochem. 108:673-676, 1990) ved PCR (polymerase kjedereaksjon) metoden under bruk av plasmid pBSF2R.236 som inneholdt cDNA som koder for den humane IL-6 reseptoren (IL-6R) fremskaffet ifølge metoden til Yamasaki et al. (Science, 241:825-828, 1988).

Den nevnte plasmid pBSF2R.236 ble fordøyet med restriksjonsenzym SphI for å fremskaffe et IL-6R cDNA-fragment som deretter ble innført i mp18 (Amersham Co.). Den syntetiske oligo-primer ATATTCTCTAGAGAGATTCT, konstruert for introduksjon av et stoppkodon i IL-6R cDNA, ble benyttet for å introdusere en mutasjon i IL-6R cDNA ved hjelp av PCR metoden under bruk av et *in vitro*-mutagenesesystem (Amersham Co.). Denne prosedyre resulterte i introduksjon av et stoppkodon på posisjonen til aminosyre 345, som fremskaffet cDNA som koder for løselig IL-6R (sIL-6R).

For å uttrykke sIL-6R cDNA i CHO-celler ble det nevnte sIL-6R cDNA kuttet med HindIII-SalI innført i plasmidet pECEdhfr (Clauser et al., Cell, 45:721-735, 1986) som hadde cDNA som kodet for dihydrofolat-reduktase (dhfr) innført ved kløvings-setet til restriksjonsenzymet PvuI for å fremskaffe CHO-celle-ekspresjonsplasmidet pECEdhfr344.

10 µg av plasmidet pECEdhfr344 ble brukt for å transfektere dhfr⁻CHO-cellelinjen DXB-11 (Urland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220, 1980) ved hjelp av kalsiumfosfat presipitasjonsmetoden (Chen et al., Mol. Cell. Biol. 7:2745-2751, 1987).

De transfekterte CHO-celler ble dyrket i 3 uker i et nukleosidfritt αMEM selektivt dyrkningsmedium som inneholdt 1 mM glutamin, 10% dialysert føtalt kalveserum (FCS), 100 U/mL penicillin og 100 µg/mL streptomycin. De selekterte CHO-celler ble screenet ved hjelp av fortynningsbegrensningsmetoden, og en enkel monoklonal CHO-cellelinje ble fremskaffet. CHO-celleklonen ble amplifisert i 20 nM til 200 nM konsentrasjon metotrexat (MTX) for å fremskaffe den humane sIL-6R-produserende CHO-cellelinje 5E27.

CHO-cellelinjen 5E27 ble dyrket i Iscove's modifiserte Dulbecco's medium (IMDM, produkt fra Gibco, Co.) som inneholdt 5% FCS, kultursupernatanten ble gjenvunnet og sIL-6R konsentrasjonen i kultursupernatanten ble målt ved hjelp av ELISA (enzymkoblet immunosorbent assay) metoden ifølge vanlig standard-prosedyre.

Referanse-eksempel 2. Produksjon av humant IL-6 antistoff

Humant IL-6 antistoff ble fremskaffet ifølge metoden til Matsuda et al., (Eur. J. Immunol. 18:951-956, 1988).

BALB/c mus ble immunisert med 10 µg av rekombinant IL-6 (Hirano et al., Immunol. Lett., 17:41, 1988) sammen med Freund's komplette adjuvans, og dette ble repetert en gang i uken til anti-IL-6 antistoff ble funnet i blodserum.

Immunocyttene ble ekstrahert fra de lokale lymfeknuter, og polyetylenglykol 1500 ble benyttet for fusjon med myelomcellelinjen P3U1. Hybridomer ble utvalgt ifølge metoden til Oi et al., (Selective Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman & Co., San Francisco, 351, 1980) ved å bruke HAT kulturmedium, og en human IL-6 antistoff-produserende hybridomlinje ble etablert. Det humane IL-6 antistoff-produserende hybridom ble brukt i IL-6 bindingsanalyse på den følgende måte.

Spesifikt ble en bløt polyvinyl 96-brønns mikroplate (produkt fra Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA) dekket over natt med 100 µL av geit anti-mus Ig antistoff (10 µL/mL, produkt fra Cooper Biomedical, Inc., Malvern, PA) i en 0,1 M karbonat-hydrogenkarbonat bufferløsning (pH 9,6) ved 4°C . Platen ble deretter behandlet i 2 timer ved romtemperatur med PBS som inneholdt 100 µL av 1% bovint serumalbumin (BSA). Etter vasking med PBS ble 100 µL av hybridom kultursupernatant tilsatt til hver brønn, og inkubering ble utført over natt ved 4°C .

Platene ble deretter vasket og ^{125}I-merket rekombinant IL-6 ble tilsatt til hver brønn til 2000 cpm/0,5 ng/brønn, og etter vasking ble radioaktivitet av hver brønn målt ved hjelp av en gammateller (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA). Av 216 hybridomkloner var 32 hybridomkloner positive i IL-6 bindingsanalysen. Blant disse kloner ble det tilslutt fremskaffet den stabile klone MH166.BSF2. IL-6 antistoffet MH166 som ble produsert av dette hybridom har en IgG1K subtype.

Den IL-6-avhengige mus-hybridomcellelinjen MH60.BSF2 (Matsuda et al., Eur. J. Immunol. 18:951-956, 1988) ble deretter benyttet for å bestemme den nøytraliserende aktivitet til MH166 antistoffet på hybridomets vekst. MH60.BSF2 celler ble fordelt i en mengde på 1 x 10^4/200 µL/brønn, en prøve som inneholdt MH166 antistoff ble tilsatt, dyrking ble foretatt i 48 timer, og 15,1 Ci/mmol av ^{3}H-tymidin (New England Nuclear, Boston, MA) ble tilsatt, hvoretter dyrkning ble fortsatt i 6 timer.

Cellene ble plassert på glassfilterpapir og behandlet med en automatisk høstemaskin (Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan). Kanin anti-IL-6 antistoff ble benyttet som kontroll. Som resultat hemmet MH166 antistoffet opptak av ^{3}H-tymidin i MH60.BSF2 cellene på en doseavhengig måte. Dette viste at MH166 antistoffet nøytraliserer IL-6 aktivitet.

Referanse-eksempel 3. Fremstilling av humant IL-6 reseptor antistoff

Anti-IL-6R antistoff MT18 konstruert ved hjelp av metoden til Hirata et al. (J. Immunol. 143:2900-2906, 1989) ble bundet til Sepharose 4B (produkt fra Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) altivert med CNBr, ifølge de medfølgende instruksjoner, og det bundne kompleks ble benyttet for å rense IL-6R (Yamasaki et al., Science 241:825-828, 1988).

Den humane myelomcellelinje U266 ble oppløst med 1 mM p-para-amino-fenylmetansulfonylfluorid-hydroklorid (produkt fra Wako Chemicals) inneholdende 1% digitonin (produkt fra Wako Chemicals), 10 mM trietanolamin (pH 7,8) og 0,15 M NaCl (digitonin bufferløsning), og blandet med MT18 antistoff bundet til Sepharose 4B kuler. Kulene ble deretter vasket 6 ganger med digitonin bufferløsning for å fremskaffe delvis renset IL-6R for immunisering.

BALB/c mus ble immunisert 4 ganger hver 10. dag med den delvis rensede IL-6R fremskaffet fra 3 x 10^9 U266 celler, og hybridomer ble deretter preparert ved konvensjonelle metoder. Kultursupernatanten fra hybridomene fra de vekstpositive brønner ble studert med henblikk på IL-6 bindingsaktivitet ved hjelp av den følgende metode. Etter merking av 5 x 10^7 U266 celler med ^{35}S-metionin (2,5 mCi) ble de oppløst med den tidligere beskrevne digitonin-bufferløsning. De solubiliserte U266 celler ble blandet med 0,04 mL av MT18 antistoffet bundet til Sepharose 4B kuler, og etter 6 gangers vask med digitonin-bufferløsning ble den ^{35}S-metionin-merkede IL-6R vasket av med 0,25 mL av digitonin-bufferløsning (pH 3,4) og nøytralisert med 0,025 mL av 1 M Tris (pH 7,4).

0,05 mL av hybridomkultursupernatanten ble blandet med 0,01 mL av protein G Sepharose (produkt fra Pharmacia). Etter vasking ble Sepharosen inkubert med 0,005 mL av den ^{35}S-merkede IL-6R løsningen preparert tidligere. Den immunpresipiterte substans ble analysert ved hjelp av SDS-PAGE, og hybridomkultursupernatanten som reagerte med IL-6R ble undersøkt. Som resultat ble en reaksjonspositiv hybridomklon PM-1 etablert. IL-6R antistoffet PM-1 produsert av hybridomet PM-1 har en IgG1K subtype.

Den hemmende aktivitet av antistoffet produsert av hybridomet PM-1 mot binding av IL-6 til human IL-6R ble studert ved hjelp av den humane myelomcellelinje U266. Human rekombinant IL-6 ble preparert med *E. coli* (Hirano et al., Immunol. Lett., 17:41, 1988) og ^{125}I-merket med Bolton-Hunter reagens (New England Nuclear, Boston, MA) (Taga et al., J. Exp. Med. 166:967, 1987).

4 x 10^5 U266 celler ble dyrket ved romtemperatur i nærvær av et 100 ganger overskudd av ikke-merket IL-6 i 1 time, sammen med 70% (volum/volum) av hybridom PM-1 kultursupernatant og 14000 cpm av ^{125}I-merket IL-6. En 70 µL prøve ble lagt opp på 300 µL av FCS plassert i et 400 µL mikrosentrifuge-polyetylenrør, og etter sentrifugering ble radioaktiviteten på cellene målt.

Som et resultat ble det demonstrert at antistoffene produsert av hybridomet PM-1 hemmet binding av IL-6 til IL-6R.

Referanse-eksempel 4. Preparering av mus IL-6 reseptor antistoff

Monoklonale antistoff mot mus IL-6 reseptor ble fremskaffet ved metoden beskrevet i Japansk patentsøknad nr. 6-134617.

Ved hjelp av metoden til Saito et al. (J. Immunol. 147, 168-173, 1993), ble CHO-celler som produserte mus løselig IL-6 reseptor dyrket i IMDM medium som inneholdt 10% FCS, og løselige IL-6 reseptorer fra mus ble renset fra kultur-supernatanten ved å bruke antistoffet RS12 mot mus løselig IL-6 reseptor (se ibid. Saito et al.) og en affinitetssøyle med immobiliserende Affigel 10 (Biorad).

50 µg av den fremskaffede mus løselige IL-6 reseptor ble blandet med Freund's komplett adjuvans og injisert intraperitonealt inn i Wistar rotter (Nihon Charles River Co.). Forsterkningsimmuniseringer ble gitt med Freund's inkomplette adjuvans etter 2 uker. Rottene ble slaktet på den 45. dag og omtrent 2×10^8 miltceller fra disse ble benyttet for cellefusjon med 1×10^7 mus P3U myelomceller ved hjelp av en konvensjonell metode som benyttet 50% PEG 1500 (Berlinger Mannheim), hvoretter hybridomene ble undersøkt med HAT-medium.

Etter tilsetning av hybridomkultursupernatantene til en immunplate som var dekket med kanin anti-rotte IgG antistoff (Cappel Co.), ble mus løselig IL-6 reseptor reagert med dette, og hybridomene som produserte antistoff mot mus løselig IL-6 reseptor ble screenet ved hjelp av ELISA-metoden, med bruk av kanin anti-mus IL-6 reseptor antistoff og alkalisk fosfatasemerket sau anti-kanin IgG. Hybridomklonene der antistoffproduksjon ble bekreftet, ble videre utsatt for subscreening to ganger for å fremskaffe en enkel hybridomklon. Denne klonen fikk navnet MR16-1.

Den nøytraliserende aktivitet til antistoffet produsert av dette hybridom mot mus IL-6 signaloverføring, ble studert ved inkorporering av ^{3}H-tymidin i MH60.BSF2 celler (Matsuda et al., J. Immunol. 18, 951-956, 1988). MH60.BSF2 celler ble tilsatt til en 96 brønns plate til 1×10^4 celler per 200 µL/brønn, og deretter mus IL-6 (10 pg/mL) og MR16-1 antistoff eller RS12 antistoff som ble tilsatt til 12.3-1000 ng/mL før dyrking ved 37°C i 5% CO_2 i 44 timer, hvoretter ^{3}H-tymidin (1 µCi/brønn) ble tilsatt og opptak etter 4 timer ble målt. Som resultat ble MR16-antistoff funnet å hemme opptak av ^{3}H-tymidin av MH60.BSF2 celler.

Eksperiment 1. Etablering av synovial cellelinje fra kronisk reumatoid artritt

(1) Preparering av synoviale celler

Synovialt vev ble fremskaffet under kirurgisk operasjon på leddet til en pasient med kronisk reumatoid artritt. Synovialvevet ble finfordelt med saks og deretter utsatt for enzymatisk dissosiering ved å inkubere i 1 time ved 37°C med 5 mg/mL av type I

kollagenase (produkt fra Sigma Chemical Co.) og 0,15 mg/mL av bovint pankreatisk DNase (produkt fra Sigma Chemical Co.) i IMDM (Iscove's modifiserte Dulbecco's medium), og deretter sendt gjennom en sil for å fremskaffe enkeltceller. Disse cellene ble deretter dyrket over natt i en kulturflaske ved bruk av IMDM som inneholdt 5% FCS, hvoretter de ikke-adhererende celler ble fjernet for å fremskaffe synovialceller. Synovialcellene ble dyrket gjennom tre til seks passasjer og benyttet for det følgende eksperiment.

(2) IL-6 produksjon av synovialceller

Synovialcellene fremskaffet som beskrevet over, ble suspendert i IMDM kulturmedium inneholdende 5% FCS (produkt fra Hyclone Laboratories Inc.), 10 U/mL av penicilllin G og 100 μg/mL streptomycin til en konsentrasjon på 3 x 10^3/brønn, og ble deretter dyrket i 96 brønns mikrotiterplater (produkt fra Falcon Co.). Humant interleukin-1β (IL-β), human tumornekrosefaktor α (TNFα), humant blodplatederivert vekstfaktor (PDGF)AB og humant basisk fibroblast-vekstfaktor (bFGF) ble tilsatt til konsentrasjonene på henholdsvis 0,01 eller 0,1, 0,1 eller 1, 1 eller 10 og 1 eller 10 ng/mL, og etter dyrking ved 37°C i 72 timer ble kultur-supernatantene samlet.

100 μL av anti-humant IL-6 antistoff MH166 (1 μg/mL) ble tilsatt til en 96-brønns ELISA-plate (Immunoplate: produkt fra Nunc Co.) og inkubert ved 4°C i 24 timer. Hver brønn ble deretter vasket med PBS inneholdende 0,05% Tween 20, og blokkert ved 4°C over natten med PBS inneholdende 1% BSA. Kultursupernatantene tidligere fremskaffet, ble deretter fortynnet med PBS inneholdende 1% BSA, tilsatt til brønnene og deretter inkubert ved romtemperatur i 2 timer. Etter vask med PBS inneholdende 0,05% Tween 20, ble 2,5 μg/mL av kanin polyklonalt antihumant IL-6 antistoff, renset med en 100 μL protein A søyle (produkt fra Pharmacia) tilsatt.

Etter inkubasjon ved romtemperatur i 2 timer ble kanin polyklonalt anti-IL-6 antistoff som bandt til IL-6 i kultursupernatantene reagert med alkalisk fosfatase-bundet anti-kanin-IgG antistoff (produkt fra Tago Co.). Deretter ble 1 mg/mL av Sigma104 alkalisk fosfatase substrat (produkt fra Sigma Co.) tilsatt ifølge de vedlagte instruksjoner og absorbans ved 405-600 nm ble målt med en MPR A4 mikroplateleser (produkt fra Tosoh Co.).

Kalibreringskurver ble preparert for det rekombinante IL-6 under hver analyse for å kunne konvertere absorbans OD-verdier til human IL-6 konsentrasjoner. Resultatene er gitt i Tabell 1.

Tabell 1

Forsterket IL-6-produksjon fra synovialcelle

Behandling (ng/mL)		Il-6 (ng/mL)
Ubehandlet		0,096 ± 0,012
IL-1β	0,01	6,743 ± 0,178
	0,1	17,707 ± 0,259
TNFα	0,1	0,575 ± 0,008
	1	1,688 ± 0,034
PDGF-AB	1	0,163 ± 0,035
	10	0,165 ± 0,016
bFGF	1	0,181 ± 0,009
	10	0,230 ± 0,019

Notat: Synovialcellene ble dyrket i 3 dager med IL-1β, TNFα, PDGF-AB eller bFGF. Etter dyrking ble konsentrasjonene av IL-6 i supernatantene målt ved hjelp av ELISA.

Resultatene viste at IL-1β sterkt stimulerte IL-6 produksjon av synovialcellene.

Eksempel 1

(1) Synovialcellene fremskaffet i Eksperiment 1 (3×10^3/brønn) ble suspendert i IMDM kulturmedium som inneholdt 5% FCS (produkt fra Hyclone Laboratories, Inc.), 10 U/mL av penicillin G og 100 μg/mL av streptomycin og ble deretter tilsatt til 96-brønns mikrotiterplate (#3072, produkt fra Falcon, Co.) og dyrket

i 5 dager i nærvær av ulike konsentrasjoner av IL-6 eller sIL-6 alene, eller i nærvær av både IL-6 og sIL-6R. 72 timer etter påbegynt dyrking ble ^{3}H-tymidin (produkt fra Amersham International plc) tilsatt til hver brønn til sluttmengde på 1 μCi/brønn, og etter avsluttet dyrking ble radioaktiviteten i cellene målt med en scintillasjonsteller. Resultatene blir vist i Figur 1.

Som resultat var ^{3}H-tymidin-opptak i synovialcellene lavt med IL-6 eller sIL-6R alene, og ingen vekst av synovialcellene ble observert. I motsetning ble signifikant opptak av ^{3}H-tymidin observert sammenlignet med kontrollgruppen i nærvær av minst 10 ng/mL konsentrasjon av IL-6 og 100 ng/mL konsentrasjon av sIL-6R. Mens således tilsynelatende ingen veksteffekt på synovialcellene ble fremvist av IL-6-alene, var en sterk synovial veksteffekt tydelig produsert ved nærvær av både IL-6 og sIL-6R.

(2) Synovialceller (3 x 10^3/brønn) ble dyrket i nærvær av en tilstrekkelig mengde av IL-β for å produsere IL-6 (0,1 ng/mL), 100 ng/mL av sIL-6R og 25 μg/mL av IL-6 antistoff eller 25 μg/mL av IL-6R antistoff. 72 timer etter påbegynt dyrking ble ^{3}H-tymidin tilsatt til hver brønn til 1 μCi/brønn, og etter at dyrkingen var ferdig, ble radioaktiviteten i cellene målt med en scintillasjonsteller. Resultatene blir vist i Fig. 2. Tilsetning til IL-6 antistoff eller IL-6R antistoff ga en fullstendig inhibisjon av vekst av synovialcellene forsterket av sIL-6R.

(3) Synovialceller (3 x 10^3/brønn) ble dyrket i nærvær av 100 ng/mL av IL-6 (produkt av Genzyme Co.), 100 ng/mL av sIL-6R og 25 μg/mL av IL-6 antistoff eller IL-6R antistoff som ble fremskaffet i de ovenfor beskrevne Referanse-eksempler. 72 timer etter påbegynt dyrking ble ^{3}H-tymidin tilsatt til hver brønn til 1 μCi/brønn og etter avsluttet dyrking ble radioaktiviteten i cellene målt med en scintillasjonsteller. Resultatene blir vist i Fig. 3. Tilsetning av IL-6 antistoff eller IL-6R antistoff førte til komplett hemming av vekst av synovialceller forsterket av sIL-6R.

Eksempel 2

Den hemmende virkning av IL-6 reseptor antistoff på artrittbegynnelsen ble studert ved hjelp av en muse-artrittmodell.

En løsning av bovin type II kollagen (Collagen Technology Research Group) (4 mg/mL) oppløst i en 0,1N vandig eddiksyreløsning og komplett adjuvans H37Ra (DIFCO) ble blandet i ekvivalente mengder for å fremskaffe en adjuvans. 100 μL av

adjuvans ble injisert subkutant ved haleroten på 8 til 9 uker gamle hunnmus av typen DBA/1J (Charles River Japan). Ytterligere 100 µL ble injisert 20 dager senere under rygghuden for å indusere artritt.

Mus IL-6 reseptor antistoff MR16-1 ble tilført intravenøst i mengder på 2 mg per mus ved første kollagen sensitisering, og hver mus ble deretter injisert subkutant med ytterligere 0,5 mg (n=5) hver uke i 7 uker. Som en kontroll ble anti-DNP antistoff KH-5 (Chugai Seiyaku) av samme isotype benyttet (n=5).

Graden av artritt ble evaluert basert på en artrittindeks. Evalueringen var basert på en 4-punkts skala for hver ekstremitet, med totalt 16 punkter per individ. Evalueringsstandarden var som følger:

0,5: erytem observert på et leddområde.

1: erytem observert på to leddområder, eller rødhet men ingen hevelse av dorsa.

2: moderat hevelse observert.

3: alvorlig hevelse av fotdorsa, men ikke inkluderende alle tær.

4: alvorlig hevelse av fotdorsa og tær.

Resultatene vises i Fig. 4. Begynnelse av artritt fra tidlig stadiums artritt var tydelig forsinket i gruppen som hadde fått IL-6 reseptor antistoff, sammenlignet med gruppen som hadde fått tilført kontroll-antistoff.

På den annnen side viste resultatene av måling av anti-type II kollagen antistoff-titer i museblod en signifikant reduksjon fra tidlig stadiums artritt i IL-6 reseptor antistoff tilført gruppen sammenlignet med den kontroll-antistoff tilførte gruppe (Fig. 5).

Musene ble avlivet på 35. dag etter kollagen-immunisering og bakbena ble fiksert med 20% formalin. De ble deretter utsatt for demineralisering i en EDTA-løsning (pH 7,6) og dehydrering med alkohol. De ble deretter innstøpt i parafin og kuttet til 2 µm tykke snitt. Snittene ble farvet med hematoxylin og eosin og observert under 125x forstørrelse (Fig. 6). Som resultat ble funnet at invasjon av granulasjonsvev inn i brusk og ben, det vil si kronisk proliferativ synovitt, var hemmet i gruppen som hadde fått tilført IL-6 reseptor antistoff sammenlignet med gruppen som hadde fått tilført kontroll-antistoff.

IL-6 er et cytokin som induserer differensiering av B-celler til antistoff-produserende celler. IL-6 fremmer også proliferering av synovialceller i nærvær av

IL-6 reseptor. Siden anti-IL-6 reseptor antistoff hemmet signifikant anti-type II kollagen antistoff-titere på den 21. og 35. dag etter kollagen-sensitisering i muse-kollagenartrittmodeller, sammenlignet med gruppen som fikk tilført kontroll-antistoff, blir det antatt at antistoff-produksjonshemmingen fremkalt av anti-IL-6 reseptor-antistoff representerer en faktor som er ansvarlig for den hemmende effekt på artritt. Videre, selv om ingen hemming av antistoff-produksjon ble observert etter 49. dag etter kollagen-sensitiseringen, gir det faktum at en adekvat hemming på artrittens begynnelse ble fremvist også i denne perioden og det faktum at HE-farving av vev som omga tarsalbenet fremviste hemmet invasjon av granulasjonsvev inn i brusk og ben hos gruppen som hadde fått anti-IL-6 reseptor-antistoff, sammenlignet med kontrollgruppen, grunn for å tro at den veksthemmende effekt på synovialvev også medvirker til den hemmende effekt på artritt.

INDUSTRIELL ANVENDELSE

Synovialceller fra pasienter med kronisk reumatoid artritt proliferer i nærvær av både IL-6 og sIL-6R. Det faktum at synovialvæske fra pasienter med reumatoid artritt inneholder en tilstrekkelig mengde av IL-6 og sIL-6R til å indusere vekst av synovialceller antyder at signaloverføring fra IL-6 er involvert i den unormale vekst av synovialceller i kronisk reumatoid atritt.

Det har således blitt definitivt demonstrert at en kronisk reumatoid artritt-terapi der det effektive middel er en IL-6 antagonist, hemmer vekst av synovialceller i kronisk reumatoid artrittpasienter i nærvær av IL-6 og sIL-6R, og således har en terapeutisk effekt mot kronisk reumatoid artritt. IL-6 antagonist er derfor til nytte som et terapeutisk middel mot kronisk reumatoid artritt der unormal vekst av synovial-celler forekommer.

PATENTKRAV

1. Anvendelse av et interleukin-6 antistoff eller interleukin-6 reseptorantistoff for fremstilling av en farmasøytisk blanding for behandling av unormal synovialcelle-vekst.

2. Anvendelse ifølge krav 1, hvor nevnte interleukin-6 antistoff er et antistoff mot human interleukin-6.

3. Anvendelse ifølge krav 1, hvor nevnte interleukin-6 reseptorantistoff er et antistoff mot human interleukin-6 reseptor.

4. Anvendelse ifølge krav 3, hvor nevnte antistoff er PM-1 antistoff.

5. Anvendelse ifølge krav 4, hvor nevnte PM-1 antistoff er humanisert PM-1 antistoff.

Fig.1

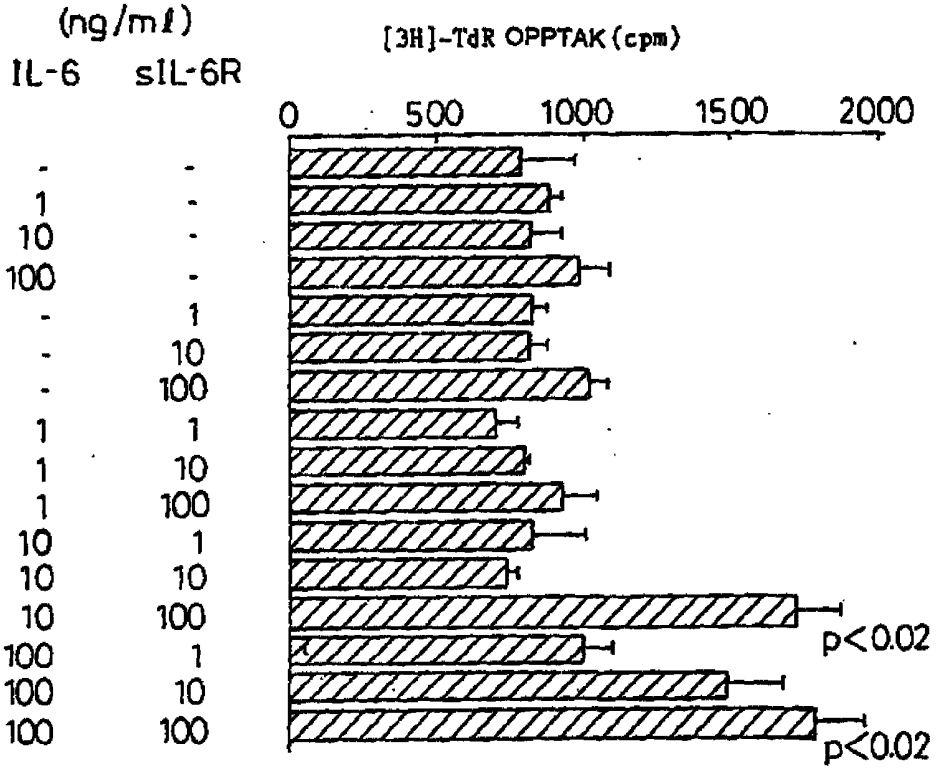

(ng/mℓ)
IL-6 sIL-6R
[3H]-TdR OPPTAK (cpm)
0 500 1000 1500 2000
- -
1 -
10 -
100 -
- 1
- 10
- 100
1 1
1 10
1 100
10 1
10 10
10 100
100 1
100 10
100 100
p<0.02
p<0.02

Fig.2

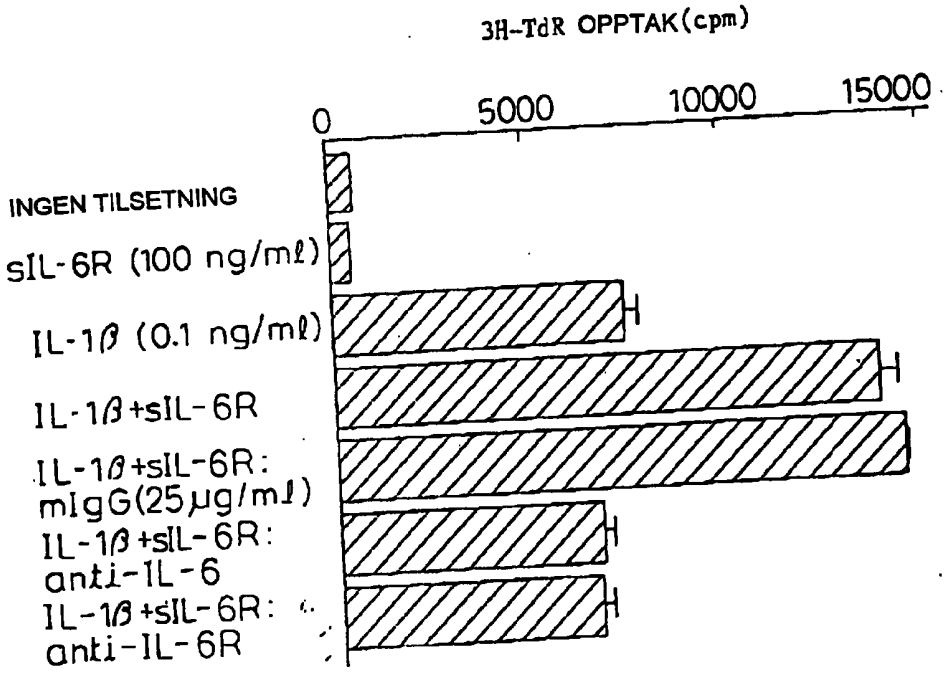

3H-TdR OPPTAK(cpm)
0
5000
10000
15000
INGEN TILSETNING
sIL-6R (100 ng/mℓ)
IL-1β (0.1 ng/mℓ)
IL-1β+sIL-6R
IL-1β+sIL-6R: mIgG(25μg/mℓ)
IL-1β+sIL-6R: anti-IL-6
IL-1β+sIL-6R: anti-IL-6R

Fig.3

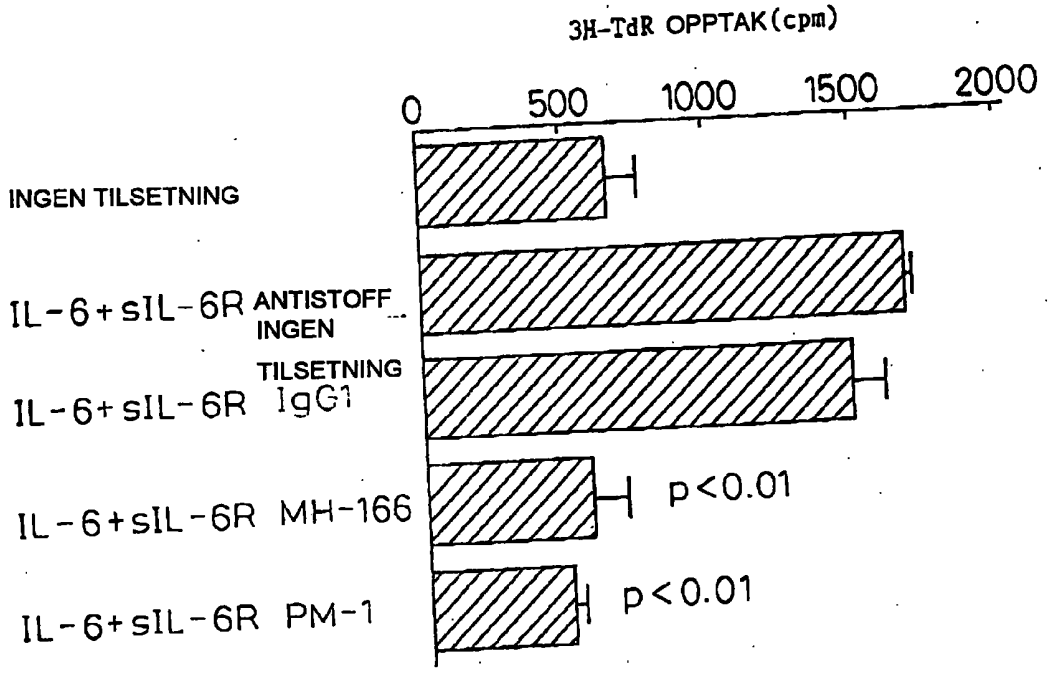

3H-TdR OPPTAK(cpm)
0
500
1000
1500
2000
INGEN TILSETNING
IL-6+sIL-6R ANTISTOFF... INGEN TILSETNING
IL-6+sIL-6R IgG1
IL-6+sIL-6R MH-166
p<0.01
IL-6+sIL-6R PM-1
p<0.01

Fig. 4

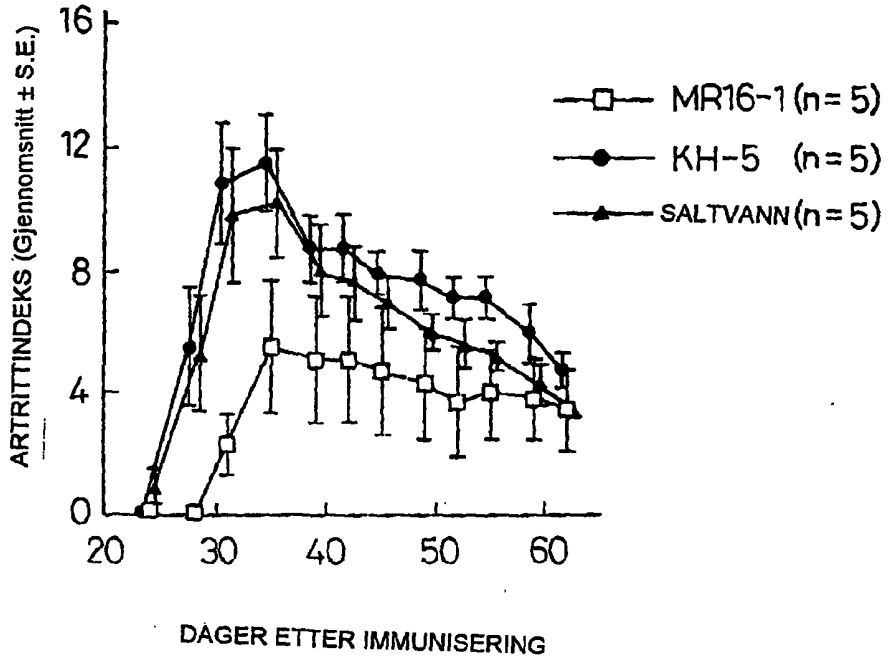

ARTRITTINDEKS (Gjennomsnitt ± S.E.)
16
12
8
4
0
20
30
40
50
60
DAGER ETTER IMMUNISERING
MR16-1 (n=5)
KH-5 (n=5)
SALTVANN (n=5)

Fig.5

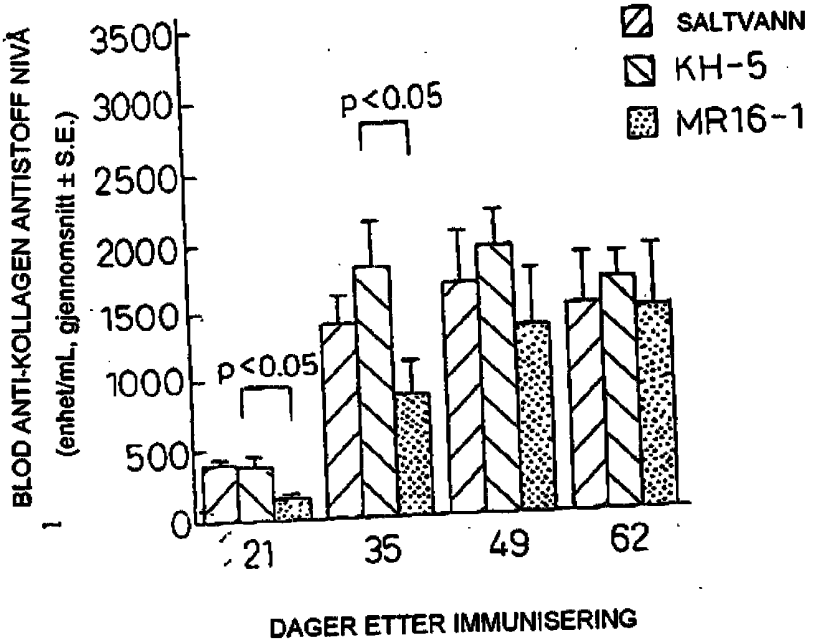
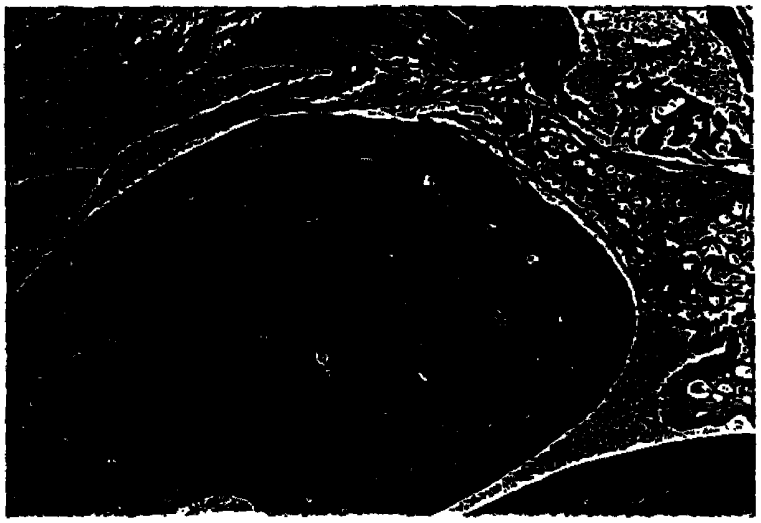

SALTVANN
KH-5
MR16-1
BLOD ANTI-KOLLAGEN ANTISTOFF NIVÅ
(enhet/mL, gjennomsnitt ± S.E.)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
p<0.05
p<0.05
21
35
49
62
DAGER ETTER IMMUNISERING

Fig.6

(a)



(b)

