



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 34 698 T2** 2007.10.04

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 108 435 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 34 698.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP99/04533**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 938 591.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2000/010607**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.08.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **02.03.2000**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.06.2001**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **03.01.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **04.10.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 45/00** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

25179698	24.08.1998	JP
5430299	02.03.1999	JP

(73) Patentinhaber:

Chugai Seiyaku K.K., Tokio/Tokyo, JP

(74) Vertreter:

HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:

**FUNAKOSHI, Akihiro, Fukuoka-shi, Fukuoka
815-0042, JP; MIYASAKA, Kyoko, Setagaya-ku,
Tokyo 156-0042, JP**

(54) Bezeichnung: **MITTEL ZUR VORBEUGUNG ODER BEHANDLUNG VON PANKREATITIS DIE ANTI-IL-6 RECEPTOR ANTIKÖRPER ALS AKTIVE KOMPONENTE ENTHALTEN**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines anti-Interleukin-6-Rezeptor (anti-IL-6R)-Antikörpers als Wirkbestandteil in einem präventiven (vorbeugenden) oder therapeutischen Mittel gegen Pankreatitis (Bauchspeicheldrüsenerkrankung).

Stand der Technik

[0002] IL-6 ist ein Zytokin, das auch als B-Zellen stimulierender Faktor 2 (BSF2) oder Interleukin $\beta 2$ bezeichnet wird. IL-6 wurde als Differenzierungsfaktor gefunden, der an der Aktivierung von B-lymphatischen Zellen beteiligt ist (T. Hirano et al., Nature (1986) 324, 73–76). Danach wurde aufgefunden, dass es ein multifunktionelles Zytokin ist, das verschiedene Zellfunktionen beeinflusst (S. Akira et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1–78). Von IL-6 ist berichtet worden, dass es die Reifung von T-lymphatischen Zellen induziert (M. Lotz et al., J. Exp. Immunol. (1988) 167, 1253–1258).

[0003] IL-6 überträgt seine biologische Aktivität durch 2 Typen von Proteinen auf die Zellen. Der eine ist IL-6-Rezeptor, ein Ligand-Bindungsprotein mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kD, an das IL-6 gebunden wird (T. Taga et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967–981; K. Yamasaki et al., Science (1987) 241, 825–828). IL-6-Rezeptor kommt nicht nur in der Membran-gebundenen Form, die durch die Zellmembran dringt und auf ihr exprimiert wird, sondern auch als löslicher IL-6-Rezeptor vor, der hauptsächlich aus der extrazellulären Region besteht.

[0004] Der andere Typ ist ein Membran-gebundenes Protein gp130 mit einem Molekulargewicht von ca. 130 kD, das an einer Nicht-Ligand-bindenden Signalübertragung beteiligt ist. IL-6 und IL-6-Rezeptor bilden einen IL-6/IL-6-Rezeptor-Komplex, der, nach Bindung an gp130, seine biologische Aktivität auf die Zelle überträgt (T. Taga et al., Cell (1989) 58, 573–581).

[0005] Ein IL-6-Antagonist ist eine Substanz, die die Übertragung biologischer Aktivität von IL-6 inhibiert. Als IL-6-Antagonisten sind bisher gegen IL-6 gerichtete Antikörper (anti-IL-6-Antikörper), gegen IL-6-Rezeptor gerichtete Antikörper (anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper), gegen gp130 gerichtete Antikörper (anti-gp130-Antikörper), verändertes IL-6 und partielle Peptide von IL-6 oder IL-6-Rezeptor bekannt gewesen.

[0006] Anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper ist in verschiedenen Berichten beschrieben worden (D. Novick et al., Hybridoma (1991) 10, 137–146, Y. Huang et al.,

Hybridoma (1993) 12, 621–630, WO 95/09 873, FR 2 694 767, US 521 628). Humanisierter PM-1-Antikörper ist bekannt gewesen, der durch Pfropfung der die Komplementarität bestimmenden Region (complementarity determining region = CDR) von einem von ihnen, einem Maus-Antikörper PM-1 (Y. Hirata et al., J. Immunology (1989) 143, 2900–2906) auf einen Mensch-Antikörper erhalten wurde (WO 92/19 759).

[0007] Pankreatitis ist eine Entzündungskrankheit, wobei die Aktivierung pankreatischer Enzyme eine Autolyse in Bauchspeicheldrüsengeweben verursacht. Es hat Berichte gegeben, dass die in den peripheren einkernigen Blutzellen erzeugte IL-6-Menge bei Patienten mit Pankreatitis signifikant hoch im Vergleich mit gesunden normalen Menschen und die IL-6-Produktion aus peripheren einkernigen Blutzellen in Fällen akuter Pankreatitis mit systemischen Komplikationen im Vergleich mit denjenigen mit keinen Komplikationen hoch ist (A. C. de Beaux et al., Brit. J. Surgery 83, 1071–5, 1996). Da ferner Blutgehaltsmengen von IL-6 höher als weitere Parameter in strengen Fällen akuter Pankreatitis sind und früher reagieren, sind diese als Prognoseindikator für die Strenge von Pankreatitis erachtet worden (T. Inagaki et al., Pancreas 14, 1–8, 1997).

[0008] Es ist angenommen worden, dass IL-1 und TNF eng mit den Krankheitszuständen korrelieren und Mäuse, denen Rezeptoren zu beiden Zytokinen fehlen, nicht an ernsthaften Krankheitsbedingungen leiden und eine deutlich abgesenkte Sterblichkeitsrate zeigen (W. Denham et al., Gastroenterology, 113, 1741–6, 1997). Versuche sind unternommen worden, Pankreatitis mit diesen Inhibitoren in Tier-Modellen zu behandeln (J. Norman et al., Surgery, 117, 648–655, 1995; C. B. Hughes et al., American J. Surgery, 171, 274–280, 1996; J. Norman et al., Surgery, 120, 515–621, 1996).

[0009] Allerdings hat es bisher keine Versuche gegeben, die biologische Aktivität von IL-6 mit IL-6-Antagonisten wie mit anti-IL-6-Rezeptor-Antikörpern bei Pankreatitis spezifisch zu unterdrücken, und es ist nicht bekannt gewesen, dass IL-6-Antagonisten wie anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper therapeutische Effekte auf Pankreatitis (Bauchspeicheldrüsenerkrankung) ausüben.

Offenbarung der Erfindung

[0010] Durch die vorliegende Erfindung wird die Verwendung eines anti-Interleukin-6-Rezeptor (anti-IL-6R)-Antikörpers zur Herstellung eines präventiven oder therapeutischen Mittels gegen Pankreatitis (Bauchspeicheldrüsenerkrankung) angegeben. Ebenfalls wird die Verwendung eines anti-IL-6R-Antikörpers zur Herstellung eines Mittels zur Unterdrückung von Pankreasödemen bei Pankreatitis angegeben.

[0011] Der in der Erfindung verwendete Antikörper ist bevorzugt ein monoklonaler Antikörper, der gegen den IL-6-Rezeptor gerichtet ist. Der monoklonale Antikörper kann einer sein, der gegen einen Mensch-IL6-Rezeptor (z.B. PM-1-Antikörper) oder gegen einen Maus-IL-6-Rezeptor (z.B. MR16-1-Antikörper) gerichtet ist; er kann ein rekombinanter Antikörper, der gegen IL-6-Rezeptor gerichtet ist, vorzugsweise einer mit konstanter Region (C-Region) eines Mensch-Antikörpers sein. Der in der Erfindung verwendete Antikörper kann ein chimärer oder humanisierter Antikörper, der gegen IL-6-Rezeptor gerichtet, z.B. ein humanisierter PM-1-Antikörper sein.

[0012] Das durch die Verwendung der Erfindung erzeugte Mittel wirkt gegen akute oder chronische Pankreatitis. Diesbezüglich sind akute oder chronische Pankreatitis z.B. strenge oder milde Pankreatitis.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0013] [Fig. 1](#) zeigt, dass eine Caerulein-Verabreichung Bauchspeicheldrüsenödeme verursacht, die ein erhöhtes Gewicht der Bauchspeicheldrüse in IL-6-transgenen Mäusen im Vergleich mit normalen Mäusen ergeben. Sie zeigt auch, dass der obige Effekt durch die Verabreichung von anti-IL-6R-Antikörper unterdrückt wird.

[0014] [Fig. 2](#) ist ein Mikrofoto des Bauchspeicheldrüsenorgans einer Normalmaus, die akute Pankreatitis durch Caerulein-Verabreichung entwickelte.

[0015] [Fig. 3](#) ist ein Mikrofoto des Bauchspeicheldrüsenorgans einer IL-6-transgenen Maus, die akute Pankreatitis durch Caerulein-Verabreichung entwickelte.

[0016] [Fig. 4](#) ist ein Mikrofoto des Bauchspeicheldrüsenorgans einer IL-6-transgenen Maus, die akute Pankreatitis durch Caerulein-Verabreichung entwickelte und gleichfalls MR16-1 empfing. Im Vergleich zur Caeruleininduzierten Pankreatitis bei der Normalmaus in [Fig. 2](#) ist die Caeruleininduzierte Pankreatitis (und zwar erhöhte Ödeme im Zwischenraumgewebe und erhöhte Infiltration in Entzündungszellen) in der IL-6-transgenen Maus in [Fig. 3](#) verschärft. In [Fig. 4](#) ist, im Gegensatz dazu, die Verschärfung durch die Verabreichung des anti-IL-6-Rezeptor-Antikörpers MR16-1 unterdrückt worden.

[0017] [Fig. 5](#) zeigt, dass der Gewichtsanstieg der Bauchspeicheldrüse in einer IL-6-transgenen Maus, welcher durch die Verabreichung von LPS und Caerulein induziert wird, durch die Verabreichung eines anti-IL-6-Rezeptor-Antikörpers unterdrückt werden kann.

Beste Ausführungsform der Erfindung

[0018] Anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung sind als polyklonale oder monoklonale Antikörper mit bekannten Verfahren erhältlich. Als die anti-IL-6-Antikörper zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung sind monoklonale Antikörper, die insbesondere aus einem Säugetier stammen, bevorzugt. Monoklonale Antikörper mit Ursprung aus Säugetieren schließen die mit Hybridoma und mit einem Wirt erzeugten ein, der mit einem Expressionsvektor transformiert worden ist, der gentechnisch veränderte Antikörpergene enthält. Die Antikörper über die Bindung an IL-6-Rezeptor inhibieren die Bindung von IL-6 an IL-6-Rezeptor und blockieren dadurch die Übertragung der biologischen Aktivität von IL-6 in die Zelle.

[0019] Beispiele solcher Antikörper schließen MR16-1-Antikörper (T. Tamura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924–11928), PM-1-Antikörper (Hirata et al., J. Immunology (1989) 143, 2900–2906) oder AUK12-20-Antikörper, AUK64-7-Antikörper oder AUK146-15-Antikörper (WO 92-19 759) und dgl. ein. Unter diesen ist der PM-1-Antikörper am meisten bevorzugt.

[0020] Im Übrigen ist die Hybridoma-Zelllinie, die PM-1-Antikörper produziert, international unter den Vorschriften des Budapester Vertrags als PM-1 am 10. Juli 1990 beim National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, von 1–3, Higashi 1-chome, Tsukuba-Stadt, Ibaraki-Präfektur, Japan, als FERM BP-2998 hinterlegt worden. Die Hybridoma-Zelllinie, die MR16-1-Antikörper produziert, ist international unter den Vorschriften des Budapester Vertrags als MR16-1 am 13. März 1997 beim National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, von 1–3, Higashi 1-chome, Tsukuba-Stadt, Ibaraki-Präfektur, Japan, als FERM BP-5875 hinterlegt worden.

[0021] Hybridoma, die anti-IL-6-Rezeptor-Monoklonalantikörper erzeugen, können grundsätzlich mit einem unten beschriebenen bekannten Verfahren hergestellt werden. So wird IL-6-Rezeptor als sensibilisierendes Antigen verwendet und gemäß bekanntem Immunisierungsverfahren immunisiert. Die so erhaltenen Immunzellen werden mit bekannten Elternzellen im bekannten Zellfusionsverfahren verschmolzen, worauf monoklonale Antikörper erzeugende Zellen mit einem herkömmlichen Siebungsverfahren gesiebt werden können, um die gewünschten Hybridoma herzustellen.

[0022] In spezifischer Weise können anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper auf folgende Weise hergestellt werden. Beispielsweise ist menschlicher IL-6-Rezeptor, der als das sensibilisierende Antigen zum Erhalt von

Antikörpern verwendet wird, mit der in EP 0 325 474 offenbarten IL-6-Rezeptor-Gensequenz/Aminosäuresequenz erhältlich, und ein Maus-IL-6-Rezeptor ist mit den in JP-OS (Kokai) 3(1991)-155 795 offenbarten Sequenzen erhältlich.

[0023] Es gibt 2 Typen von IL-6-Rezeptorproteinen: IL-6-Rezeptor, exprimiert auf der Zellmembran, und IL-6-Rezeptor (abgelöst von der Zellmembran (löslicher IL-6-Rezeptor) (Yasukawa et al., J. Biochem. (1990) 108, 673–676). Löslicher IL-6-Rezeptor-Antikörper ist im Wesentlichen aus der extrazellulären Region des an die Zellmembran gebundenen IL-6-Rezeptors zusammengesetzt und unterscheidet sich insofern vom Membran-gebundenen IL-6-Rezeptor, als beim letzteren die Transmembranregion oder sowohl die Transmembran- als auch die intrazelluläre Region fehlen. Als IL-6-Rezeptorprotein ist jeder IL-6-Rezeptor verwendbar, solange er als Sensibilisierantigen zur Produktion des IL-6-Rezeptor-Antikörpers zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung verwendet werden kann.

[0024] Nach Insertion der IL-6-Rezeptor-Gensequenz in ein bekanntes Expressionsvektorsystem zur Transformation einer geeigneten Wirtszelle kann das gewünschte IL-6-Rezeptorprotein aus der Wirtszelle oder einem Kulturüberstand davon mit bekannten Verfahren gereinigt werden. Das so gereinigte IL-6-Rezeptorprotein kann dann als das Sensibilisierantigen verwendet werden. Alternativ dazu, können Zellen, die einen IL-6-Rezeptor oder ein Fusionsprotein des IL-6-Rezeptorproteins und eines weiteren Proteins exprimieren, als das Sensibilisierantigen verwendet werden.

[0025] E. coli, das ein Plasmid pIBBSF2R aufweist, das cDNA-eincodierenden menschlichen IL-6-Rezeptor enthält, ist international unter den Vorschriften des Budapester Vertrags als HB101-pIBBSR2R am 09. Januar 1989 beim National Institute of Biotechnology and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, von 1–3, Higashi 1-chome, Tsukuba-Stadt, Ibaraki-Präfektur, Japan, als FERM BP-2232 hinterlegt worden.

[0026] Ein monoklonales Antikörper-erzeugendes Hybridom kann grundsätzlich mit einem bekannten unten beschriebenen Verfahren erschaffen werden. So kann gp130 als Sensibilisierantigen verwendet werden, wobei es mit herkömmlichen Immunisierungsverfahren immunisiert wird. Die so erhaltenen Immunzellen werden mit bekannten Elternzellen im herkömmlichen Zellfusionsverfahren verschmolzen, worauf die monoklonalen Antikörpererzeugenden Hybridoma mit einem herkömmlichen Siebungsverfahren ausgesiebt werden, um das gewünschte Hybridom herzustellen.

[0027] In spezifischer Weise ist der monoklonale

Antikörper auf folgende Weise erhältlich. Beispielsweise ist gp130, das als das sensibilisierende Antigen zur Antikörpererzeugung verwendet wird, mit der in EP 0 411 946 offenbarten gp130-Gensequenz/Aminosäuresequenz erhältlich.

[0028] Nach Transformation einer geeigneten Wirtszelle durch Insertion der gp130-Gensequenz in ein bekanntes Expressionsvektorsystem wird das gp130-Protein von Interesse aus der Wirtszelle oder aus dem Kulturüberstand davon gereinigt. Das gereinigte gp130-Rezeptorprotein kann als das sensibilisierende Antigen verwendet werden. Alternativ dazu, kann ein Fusionsprotein des gp130-Proteins und eines weiteren Proteins als das sensibilisierende Antigen verwendet werden.

[0029] Obwohl die Säugetiere, die mit dem Sensibilisierantigen zu immunisieren sind, nicht spezifisch eingeschränkt sind, werden sie vorzugsweise im Hinblick auf ihre Kompatibilität mit der Elternzelle zur Zellfusion ausgewählt. Sie schließen im Allgemeinen Nager wie Mäuse, Ratten, Hamster und dgl. ein.

[0030] Die Immunisierung von Lebewesen mit einem Sensibilisierantigen wird mit bekannten Verfahren durchgeführt. Ein allgemeines Verfahren beinhaltet z.B. die intraperitoneale oder subkutane Verabreichung eines Sensibilisierantigens an das Säugetier. In spezifischer Weise wird das Sensibilisierantigen, das in einer geeigneten Menge Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) oder physiologischer Kochsalzlösung usw. verdünnt und suspendiert worden ist, gegebenenfalls mit einer geeigneten Menge üblichem Adjuvans, z.B. mit Freund's Komplettadjuvans, vermischt. Nach Emulgierung wird das Ganze bevorzugt an ein Säugetier mehrmals alle 4 bis 21 Tage verabreicht. Alternativ dazu, kann ein geeigneter Träger zum Zeitpunkt der Immunisierung des sensibilisierenden Antigens verwendet werden.

[0031] Nach Immunisierung und Bestätigung des Anstiegs der gewünschten Antikörpergehaltmengen im Serum werden die Immunzellen aus dem Säugetier entnommen und einer Zellfusion unterzogen. Bevorzugte Immunzellen, die der Zellfusion unterzogen werden, schließen insbesondere Milzzellen ein.

[0032] Die Säugetier-Myeloma-Zellen als weitere Elternzellen, die der Zellfusion mit den oben genannten Immunzellen unterzogen werden, schließen bevorzugt verschiedene bekannte Zelllinien wie P3X63Ag8.653 (J. F. Kearney, et al., J. Immunol. (1979) 123: 1548–1550), P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81: 1–7), NS-1 (G. Kohler und C. Milstein, Eur. J. Immunol. (1976) 6: 511–519), MPC-11 (D. H. Margulies et al., Cell (1976) 8: 405–415), SP2/0 (M. Shulman et al., Nature (1978) 276: 269–270), FO (S. F. de St. Groth et al., J. Immunol. Methods (1980) 35: 1–21), S194 (I.

S. Trowbridge, J. Exp. Med. (1978) 148: 313–323), R210 (G. Galfre et al., Nature (1979) 277: 131–133) und dgl. ein.

[0033] Die Zellfusion zwischen den obigen Immunzellen und den Myeloma-Zellen kann im Wesentlichen gemäß einem bekannten Verfahren wie dem von Milstein et al. beschriebenen durchgeführt werden (G. Kohler und C. Milstein, Methods Enzymol. (1981) 73: 3–46).

[0034] In spezifischerer Weise wird die obige Zellfusion in einer herkömmlichen Nährbrühe in der Gegenwart von z.B. einem Zellfusionsbeschleuniger durchgeführt. Als Zellfusionsbeschleuniger können z.B. Polyethylenglykol (PEG), Sendai-Virus (HVJ) und dgl. verwendet werden, wobei außerdem ein Adjuvans wie Dimethylsulfoxid usw. gegebenenfalls zur Steigerung des Wirkungsgrads der Fusion zugegeben werden können.

[0035] Das bevorzugte Verhältnis der Immun- und Myeloma-Zellen, die zu verwenden sind, beträgt z.B. 1- bis 10-fach mehr Immun- als Myeloma-Zellen. Beispiele der Kulturmedien, die zur obigen Zellfusion zu verwenden sind, schließen RPMI1640-Medium und MEM-Kulturmedium ein, die sich zum Wachstum der obigen Myeloma-Zelllinien eignen, wobei ein herkömmliches Kulturmedium, das für diesen Typ einer Zellkultur verwendet wird, und daneben eine Serumergänzung wie fötales Kälberserum (FCS) zugegeben werden können.

[0036] Zur Zellfusion werden vorbestimmte Mengen der obigen Immunzellen und Myeloma-Zellen gut in der obigen Kulturflüssigkeit vermischt, wozu eine PEG-Lösung, die vorab auf ca. 37°C erwärmt worden ist, z.B. eine PEG-Lösung mit einem mittleren Molekulargewicht von ca. 1000 bis 6000, in einer Konzentration von 30 bis 60 % (G/V) gegeben und vermischt wird, um die gewünschten Fusionszellen (Hybridoma) zu erhalten. Danach kann durch wiederholte Abfolge der Zugabe einer geeigneten Kulturflüssigkeit und einer Zentrifugation zur Beseitigung von Überstand, Zellfusionsmitteln usw., die für das Wachstum unerwünscht sind, das Hybridom entnommen werden.

[0037] Das genannte Hybridom wird durch Züchtung im herkömmlichen Selektionsmedium, z.B. einem HAT-Kulturmedium (einer Kulturflüssigkeit, enthaltend Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin), selektiert. Die Züchtung im genannten HAT-Kulturmedium wird im Allgemeinen über eine Zeitdauer, die hinreicht, Zellen, die sich vom gewünschten Hybridom unterscheiden (Nicht-Fusionszellen) abzutöten, im Allgemeinen mehrere Tage bis mehrere Wochen lang fortgesetzt. Das herkömmliche limitierende Verdünnungsverfahren wird durchgeführt, wobei die Hybridoma, die den gewünschten Antikörper produzieren,

ausgesiebt und monoclonal geklont werden.

[0038] Zusätzlich zum Erhalt des obigen Hybridom durch Immunisieren eines Lebewesens, das sich vom Mensch unterscheidet, mit einem Antigen, ist es auch möglich, menschliche Lymphozyten in vitro mit gewünschtem Antigen oder gewünschten Antigen-exprimierenden Zellen zu sensibilisieren, und die sich ergebenden sensibilisierten B-Lymphozyten werden mit einer Mensch-Myeloma-Zelle, z.B. mit U266, verschmolzen, um den gewünschten Mensch-Antikörper mit der Aktivität zur Bindung an das gewünschte Antigen oder die gewünschten Antigen-exprimierenden Zellen zu erhalten (siehe JP-PS (Kokoku) 1(1989)-59 878). Ferner wird ein transgenes Lebewesen mit einem Repertoire aller menschlichen Antikörpergene mit dem Antigen oder den Antigen-exprimierenden Zellen immunisiert, um den gewünschten Mensch-Antikörper im oben beschriebenen Verfahren zu erhalten (siehe WO 93/12 227, 92/03 918, 94/02 602, 94/25 585, 96/34 096 und 96/33 735).

[0039] Die so erstellten monoclonalen Antikörper-produzierenden Hybridoma können in der herkömmlichen Kulturflüssigkeit subkultiviert oder über einen verlängerten Zeitraum in flüssigem Stickstoff gelagert und aufbewahrt werden.

[0040] Zum Erhalt monoclonaler Antikörper aus dem genannten Hybridom können ein Verfahren, wobei das genannte Hybridom im herkömmlichen Verfahren gezüchtet und die Antikörper als Überstand erhalten werden, oder ein Verfahren angewandt werden, wobei das Hybridom an ein mit genanntem Hybridom kompatibles Säugetier verabreicht und darin gezüchtet und die Antikörper als Ascites erhalten werden. Das erstere Verfahren eignet sich zum Erhalt von Antikörpern hoher Reinheit, wogegen sich das letztere zur Produktion von Antikörpern in großem Maßstab eignet.

[0041] In spezifischer Weise kann ein Hybridom, das einen anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper produziert, mit dem in JP-OS (Kokai) 3(1989)-139 293 offenbarten Verfahren erstellt werden. Dieses kann mit einem Verfahren, wobei das PM-1-Antikörper-produzierende Hybridom, das international unter den Vorschriften des Budapester Vertrags als FERM BP-2998 am 10. Juli 1990 beim National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, von 1–3, Higashi 1-chome, Tsukuba-Stadt, Ibaraki-Präfektur, Japan hinterlegt wurde, intraperitoneal BALB/c-Mäusen (hergestellt von CLEA Japan) gespritzt wird, um die Ascites zu erhalten, aus denen der PM-1-Antikörper gereinigt wird, oder mit einem Verfahren durchgeführt werden, wobei das genannte Hybridom in einem geeigneten Kulturmedium wie dem RPMI1640-Medium, enthaltend 10 % fötales Rinderserum und 5 % MB-Condimed H1

(hergestellt von Boehringer Mannheim), dem Hybridom-SFM-Medium (hergestellt von GIBCO-BRL), dem PFHM-II-Medium (hergestellt von GIBCO-BRL) und dgl. gezüchtet wird, worauf der PM-1-Antikörper aus dem Kulturüberstand gereinigt werden kann.

[0042] Ein rekombinanter Antikörper, der mit rekombinanter Gen-Technologie erzeugt wurde, wobei ein Antikörpergen aus dem Hybridom geklont und in einen geeigneten Vektor eingebaut wurde, der dann in einen Wirt eingeführt wurde, kann in der vorliegenden Erfindung als monoklonaler Antikörper verwendet werden (siehe z.B. C.A.K. Borrebaeck und J.W. Larick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, veröffentlicht im Vereinigten Königreich von MACMILLAN PUBLISHERS LTD. 1990).

[0043] In spezifischer Weise wird mRNA, die die variable Region (V) des gewünschten Antikörpers encodiert, aus Antikörper-produzierenden Zellen wie aus einem Hybridom isoliert. Die Isolierung von mRNA wird durch Zubereitung von Gesamt-RNA mit z.B. einem bekannten Verfahren wie dem Guanidin-Ultrazentrifugierverfahren (J.M. Chirgwin et al., Biochemistry (1979) 18, 5294–5299) oder dem AG-PC-Verfahren (P. Chomczynski et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156–159) durchgeführt, worauf die mRNA aus der Gesamt-RNA mit einem mRNA-Reinigungskit (hergestellt von Pharmacia) und dgl. gereinigt wird. Alternativ dazu, kann mRNA direkt mit dem Quick Prep mRNA-Reinigungskit (hergestellt von Pharmacia) zubereitet werden.

[0044] cDNA der Antikörper-V-Region kann aus der so erhaltenen mRNA mit einer Umkehr-Transkriptase synthetisiert werden. cDNA kann mit einem AMV-Umkehr-Transkriptase-Erst-Strang-cDNA-Synthesekit und dgl. synthetisiert werden. Alternativ dazu, können zur Synthese und Amplifikation von cDNA der 5'-Ampli FINDER RACE-Kit (hergestellt von Clontech) und das 5'-RACE-Verfahren (M.A. Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998–9002; A. Belyavsky et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919–2932) angewandt werden, wobei eine Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Anwendung gelangt. Das gewünschte DNA-Fragment wird aus dem erhaltenen PCR-Produkt gereinigt und kann mit Vektor-DNA verknüpft werden. Außerdem wird ein rekombinanter Vektor daraus erstellt und dann in E. coli usw. eingeführt, woraus Kolonien selektiert werden, um den gewünschten rekombinanten Vektor herzustellen. Die Basensequenz der gewünschten DNA kann mit einem bekannten Verfahren wie dem Dideoxy-Verfahren bestätigt werden.

[0045] Sobald die DNA, die die V-Region des gewünschten Antikörpers encodiert, erhalten worden ist, kann sie mit DNA verknüpft werden, die die konstante Region (constant region = C-Region) des gewünschten Antikörpers encodiert, die dann in einen

Expressionsvektor eingebaut wird. Alternativ dazu, kann die DNA, die die V-Region des Antikörpers encodiert, in einen Expressionsvektor eingebaut werden, der bereits DNA enthält, die die C-Region des Antikörpers encodiert.

[0046] Der Erzeugung des Antikörpers zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung wird das Antikörpergen wie unten beschrieben in einen Expressionsvektor eingebaut, um so unter der Steuerung einer Expressionsregulatorregion, z.B. eines Verstärkers und/oder eines Promotors, exprimiert zu werden. Anschließend können der Expressionsvektor in eine Wirtszelle übertragen und der Antikörper dann darin exprimiert werden.

[0047] Gemäß der vorliegenden Erfindung können künstlich veränderte rekombinante Antikörper wie chimäre und humanisierte Antikörper zur Erniedrigung der heterologen Antigenizität gegen Menschen angewandt werden.

[0048] Diese veränderten Antikörper können mit bekannten Verfahren erzeugt werden. Chimärer Antikörper ist durch Ligation der so erhaltenen DNA, die die Antikörper-V-Region encodiert, mit DNA erhältlich, die die Mensch-Antikörper-C-Region encodiert, die dann in einen Expressionsvektor eingebaut und in einen Wirt zur Produktion des Antikörpers darin eingeführt wird (siehe EP 0 125 023 und WO 92-19 759). Mit diesem bekannten Verfahren ist chimärer Antikörper zur Verwendung für die vorliegende Erfindung erhältlich.

[0049] Beispielsweise wurde das Plasmid, das DNA enthält, die die L-Kette-V-Region oder die H-Kette-V-Region von chimärem PM-1-Antikörper encodiert, als pPM-k3 bzw. pPM-h1 bezeichnet, und E. coli mit dem Plasmid ist international unter den Vorschriften des Budapester Vertrag als NCIMB 40366 bzw. NCIMB 40362 am 11. Februar 1991 beim National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited hinterlegt worden.

[0050] Humanisierter Antikörper, der auch als umgeformter Mensch-Antikörper bezeichnet wird, ist durch Transplantieren der Komplementarität bestimmenden Region (CDR) von Antikörpern eines sich vom Mensch unterscheidenden Säugetiers, z.B. von Maus-Antikörpern, in die CDR von Mensch-Antikörper erzeugt worden. Die allgemeine rekombinante DNA-Technologie zur Herstellung solcher Antikörper ist ebenfalls bekannt (siehe EP 0 125 023 und WO 92-19 759).

[0051] In spezifischer Weise wird eine DNA-Sequenz, die zur Ligation der Maus-Antikörper-CDR mit der Rahmenwerk-Region (framework region = FR) von Mensch-Antikörpern entworfen wurde, aus mehreren aufgeteilten Oligonucleotiden synthetisiert, die

Abschnitte aufweisen, die miteinander an den Enden davon überlappen. Die so erhaltene DNA wird mit der DNA, die die Mensch-Antikörper-C-Region encodiert, verknüpft und dann in einen Expressionsvektor eingebaut, der in einen Wirt zur Antikörperproduktion eingeführt wird (siehe EP 0 239 400 und WO 92-19 759).

[0052] Für die Mensch-Antikörper-FR, die durch CDR verknüpft ist, wird die Komplementarität-bestimmende Region selektiert, die eine günstige Antigen-bindungsstelle bildet. Gegebenenfalls können Aminosäuren in der Rahmenwerkregion der variablen Region des Antikörpers so substituiert sein, dass die Komplementarität-bestimmende Region von umgeformten Mensch-Antikörpern eine geeignete Antigen-bindungsstelle bilden kann (K. Sato et al., Cancer Res. (1993) 53, 851–856).

[0053] Beispielsweise wird für chimären oder humanisierten Antikörper die Mensch-Antikörper-C-Region verwendet. Als Mensch-Antikörper-C-Region können C_γ und z.B. C_γ₁, C_γ₂, C_γ₃ und C_γ₄ verwendet werden. Die Mensch-Antikörper-C-Region kann modifiziert sein, um die Antikörperstabilität oder die Produktion davon zu verbessern.

[0054] Chimärer Antikörper besteht aus der variablen Region von aus einem sich vom Mensch unterscheidenden Säugetier abgeleiteten Antikörper und aus der von Mensch-Antikörper abgeleiteten C-Region, wogegen humanisierter Antikörper aus der Komplementarität-bestimmenden Region von aus einem sich vom Mensch unterscheidenden Säugetier und der Rahmenwerkregion abgeleiteten Antikörper und aus der vom Mensch-Antikörper abgeleiteten C-Region besteht. Demzufolge ist die entsprechende Antigenizität im menschlichen Körper so verringert worden, dass die Antikörper als Antikörper zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können.

[0055] Eine bevorzugte Ausführungsform des humanisierten Antikörpers zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung schließt humanisierten PM-1-Antikörper ein (siehe WO 92-19 759).

[0056] Antikörpergene, die wie oben beschrieben erstellt sind, können in einem bekannten Verfahren exprimiert und erhalten werden. Im Fall von Säugetierzellen kann die Expression mit einem Vektor bewerkstelligt werden, der einen allgemein einsetzbaren Promotor, das zu exprimierende Antikörpergen und DNA enthält, worin das Poly-A-Signal operativ an 3' stromabwärts davon oder an einen Vektor gebunden worden ist, der die genannte DNA enthält. Beispiele des Promotor/Verstärkers schließen Mensch-Zytomegalovirus-Immediat-Früh-Promotor/Verstärker ein.

[0057] Außerdem gibt es als Promotor/Verstärker, die zur Antikörperexpression zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung angewandt werden können, virale Promotoren/Verstärker wie Retrovirus, Polyoma-Virus, Adenovirus und Simian-Virus 40 (SV40) und Promotoren/Verstärker, die aus Säugetierzellen wie aus Mensch-Verlängerungsfaktor 1α (human elongation factor 1α = HEF1α) abgeleitet sind.

[0058] Beispielsweise kann die Expression unmittelbar mit dem Verfahren von Mulligan et al. (R.C. Mulligan et al., Nature (1979) 277, 108–114) bei Verwendung von SV40-Promotor/Verstärker oder mit dem Verfahren von Mizushima et al. (S. Mizushima und S. Nagata, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) bei Verwendung von HEF1α-Promotor/Verstärker bewerkstelligt werden.

[0059] Im Fall von E. coli kann die Expression durch operative Bindung eines allgemein verwendbaren Promotors, einer Signalsequenz zur Antikörpersekretion und des zu exprimierenden Antikörpergens und anschließender Expression davon durchgeführt werden. Als Promotor können z.B. lacZ-Promotor und araB-Promotor genannt werden. Das Verfahren von Ward et al. (E.S. Ward et al., Nature (1998) 341, 544–546; E.S. Ward et al., FASEB J. (1992) 6, 2422–2427) kann bei Verwendung des lacZ-Promotors und das Verfahren von Better et al. (M. Better et al., Science (1988) 240, 1041–1043) kann bei Verwendung des araB-Promotors zur Anwendung gelangen.

[0060] Als Signalsequenz zur Antikörpersekretion kann bei Erzeugung im Periplasma von E. coli die pe1B-Signalsequenz (S.P. Lei et al., J. Bacteriol. (1987) 169, 4379–4383) verwendet werden. Nach Abtrennung des im Periplasma erzeugten Antikörpers wird die Struktur des Antikörpers in geeigneter Weise vor Gebrauch erneut gefaltet (siehe z.B. WO 96/30 394).

[0061] Als Ursprung einer Replikation können die aus SV40, Polyoma-Virus, Adenovirus, Rinderpapillomavirus (bovine papilloma virus = BPV) und dgl. abgeleiteten Viren verwendet werden. Ferner können zur Amplifikation der Gen-Kopiezahl im Wirtszellsystem die Expressionsvektoren als selektierbare Marker das Aminoglycosid-Phosphotransferase (APH)-Gen, das Thymidin-Kinase (TK)-Gen, E. coli-Xanthin-Guaninphosphoribosyltransferase (Ecogpt)-Gen, das Dihydrofolatreduktase (dhfr)-Gen und dgl. einschließen.

[0062] Zur Antikörperproduktion zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung kann jedes Produktionssystem zur Anwendung gelangen. Das Produktionssystem zur Antikörperherstellung umfasst ein in vitro oder in vivo-Produktionssystem. Als in vitro-Produktionssystem können ein Produktionssystem, worin eu-

karyotische Zellen zur Anwendung gelangen, und das Produktionssystem genannt werden, worin prokaryotische Zellen zur Anwendung gelangen.

[0063] Bei Verwendung eukaryotischer Zellen gibt es die Produktionssysteme, worin tierische, pflanzliche und fungale Zellen zur Anwendung gelangen. Bekannte Lebewesenzellen schließen (1) Säugetierzellen wie CHO-Zellen, COS-Zellen, Myeloma-Zellen, Babyhamsternieren (BHK)-Zellen, HeLa-Zellen und Vero-Zellen, (2) Amphibienzellen wie *Xenopus oocytes* oder (3) Insektenzellen wie sf9, sf21 und Tn5 ein. Bekannte Pflanzenzellen schließen z.B. diejenigen ein, die aus *Nicotiana tabacum* abgeleitet sind, die einer Kallus-Kultur unterzogen werden können. Bekannte fungale Zellen schließen Hefen wie den Genus *Saccharomyces*, spezifischer *Saccharomyces cereviceae*, oder filamentöse Fungi wie den Genus *Aspergillus*, spezifischer *Aspergillus niger*, ein.

[0064] Bei Verwendung prokaryotischer Zellen gibt es die Produktionssysteme, worin bakterielle Zellen zur Anwendung gelangen. Bekannte Bakterienzellen schließen *Escherichia coli* (*E. coli*) und *Bacillus subtilis* ein.

[0065] Durch Einführung über Transformation des Gens des gewünschten Antikörpers in diese Zellen und Züchtung der transformierten Zellen *in vitro* ist der Antikörper erhältlich. Die Züchtung wird mit einem bekannten Verfahren durchgeführt. Beispielsweise können als Kulturflüssigkeit DMEM, MEM, RPMI1640 und IMDM und Serumergänzungen wie fötales Kälberserum (FCS) in Kombination verwendet werden. Außerdem können Antikörper *in vivo* durch Implantieren von Zellen, in die das Antikörpergen eingeführt worden ist, in die Bauchhöhle eines Lebewesens und dgl. erzeugt werden.

[0066] Als *in vivo*-Produktionssysteme können diejenigen, in denen Lebewesen zur Anwendung gelangen, und diejenigen genannt werden, in denen Pflanzen zur Anwendung gelangen. Bei Verwendung von Lebewesen gibt es die Produktionssysteme, in denen Säugetiere und Insekten zur Anwendung gelangen.

[0067] Als Säugetiere können Ziegen, Schweine, Schafe, Mäuse und Vieh eingesetzt werden (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). Ebenfalls können als Insekten Seidenwürmer herangezogen werden. Bei Verwendung von Pflanzen kann Tabak beispielsweise eingesetzt werden.

[0068] Antikörpergene werden in diese Lebewesen oder Pflanzen eingeführt, und die Antikörper werden in solchen Lebewesen oder Pflanzen erzeugt und daraus gewonnen. Beispielsweise wird ein Antikörpergen in das Mittelstück des Gen-Eincodierproteins eingereiht, das inhärent in der Milch wie als Ziegen- β -Casein erzeugt wird, um Fusionsgene herzu-

stellen. DNA-Fragmente, die das Fusionsgen enthalten, in das das Antikörpergen eingereiht worden ist, werden einem Ziegenembryo gespritzt, und das Embryo wird in eine weibliche Ziege eingebracht. Der gewünschte Antikörper wird aus der Milch erhalten, die von der transgenen Ziege, der Ziege, die das Embryo oder einen Wurf davon empfing, erzeugt wurde. Zur Steigerung der Milchmenge, die den von der transgenen Ziege erzeugten Antikörper enthält, können der transgenen Ziege Hormone in geeigneter Weise verabreicht werden (K.M. Ebert et al., *Bio/Technology* (1994) 12, 699–702).

[0069] Bei Verwendung von Seidenwürmern wird Baculovirus, in das das gewünschte Antikörpergen eingereiht worden ist, dem Seidenwurm gespritzt, und der gewünschte Antikörper ist aus der Körperflüssigkeit des Seidenwurms erhältlich (S. Maeda et al., *Nature* (1985) 315, 592–594). Außerdem werden bei Verwendung von Tabak der gewünschte Antikörper in einen Expressionsvektor für Pflanzen, z.B. in pMON 530, eingereiht und dann der Vektor in ein Bakterium wie *Agrobacterium tumefaciens* eingeführt. Das Bakterium wird dann dem Tabak wie *Nicotiana tabacum* gespritzt, um den gewünschten Antikörper aus den Tabakblättern zu erhalten (Julian, K.-C. Ma et al., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24, 131–138).

[0070] Bei der oben beschriebenen Erzeugung von Antikörpern *in vitro*- oder *in vivo*-Produktionssystemen kann DNA, die die schwere Kette (heavy chain = H chain) oder die leichte Kette (light chain = L chain) des Antikörpers encodiert, separat in einen Expressionsvektor eingebaut werden, und die Wirte werden gleichzeitig transformiert, oder DNA, die die H- und die L-Kette encodiert, kann in einen Einzelexpressionsvektor eingebaut werden, und der Wirt wird damit transformiert (siehe WO 94/11 523).

[0071] Antikörper zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung können Antikörperfragmente oder modifizierte Versionen davon sein, solange sie bevorzugt verwendet werden. Beispielsweise können als Antikörperfragmente Fab, F(ab')₂, Fv oder Einzelketten-Fv (single-chain Fv = scFv) genannt werden, worin Fv's der H- und L-Kette über ein geeignetes Verbindungsglied (einen Linker) verknüpft wurden.

[0072] In spezifischer Weise werden Antikörper mit einem Enzym, z.B. mit Papain oder Pepsin, behandelt, um Antikörperfragmente zu erzeugen, oder es werden Gene, die diese Antikörperfragmente encodieren, erstellt und dann in einen Expressionsvektor eingeführt, der in einer geeigneten Wirtszelle exprimiert wird (siehe z.B. M. S. Co et al., *J. Immunol.* (1994) 152, 2968–2976; M. Better und A.H. Horwitz, *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476–496; A. Plucktrun und A. Skerra, *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476–496; E. Lamoyi, *Methods in Enzymology* (1986) 121, 652–663; J. Rousseaux et al.,

Methods in Enzymology (1986) 121, 663–669; R.E. Bird et al., TIBTECH (1991) 9, 132–137).

[0073] scFv ist durch Ligation der V-Region der H-Kette und der V-Region der L-Kette des Antikörpers erhältlich. Im scFv sind die V-Region der H-Kette und die V-Region der L-Kette bevorzugt über ein Verbindungsglied, vorzugsweise ein Peptid-Verbindungsglied, verknüpft (J.S. Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 5879–5883). Die V-Region der H-Kette und die V-Region der L-Kette im scFv können aus jedem der oben genannten Antikörper stammen. Als Peptid-Verbindungsglied zur Ligation der V-Regionen kann jedes Einzelkette-Peptid aus z.B. 12 bis 19 Aminosäureresten verwendet werden.

[0074] DNA, die scFv encodiert, ist mit DNA, die die H-Kette oder die H-Kette-V-Region des obigen Antikörpers encodiert, und mit DNA, die die L-Kette oder die L-Kette-V-Region des obigen Antikörpers als Templat durch Amplifizieren desjenigen Teilstücks der DNA encodiert, die die gewünschte Aminosäuresequenz unter den obigen Sequenzen durch eine PCR-Technik encodiert, mit einem Primerpaar erhältlich, das die beiden Enden spezifiziert, und durch weitere Amplifizierung werden die Kombination aus DNA, die das Peptid-Verbindungsgliedteilstück encodiert, und das Primerpaar, das diese beiden Enden der genannten DNA definiert, mit der H- bzw. L-Kette verknüpft.

[0075] Sobald die scFv encodierenden DNAs erstellt sind, sind ein Expressionsvektor, der diese enthält, und ein mit dem genannten Expressionsvektor transformierter Wirt mit herkömmlichen Verfahren erhältlich, und scFv ist mit dem entstandenen Wirt mit den herkömmlichen Verfahren erhältlich.

[0076] Diese Antikörperfragmente können durch Erhalt des Gens davon in ähnlicher Weise wie oben erzeugt werden, wobei das Gen in einem Wirt exprimiert wird. Der im Anspruchswortlaut der vorliegenden Anmeldung verwendete Begriff "Antikörper" umfasst auch diese Antikörperfragmente.

[0077] Als modifizierte Antikörper können Antikörper, die mit verschiedenen Molekülen wie mit Polyethylenglykol (PEG) verbunden sind, verwendet werden. Der im Anspruchswortlaut der vorliegenden Anmeldung verwendete Begriff "Antikörper" umfasst auch diese modifizierten Antikörper. Diese modifizierten Antikörper sind durch chemische Modifizierung der so erhaltenen Antikörper erhältlich. Diese Verfahren sind im Stand der Technik bereits ein- und durchgeführt worden. Antikörper, die wie oben erzeugt und exprimiert worden sind, können aus dem Inneren oder Äußeren der Wirtszelle abgetrennt und dann zur Homogenität gereinigt werden. Abtrennung und Reinigung des Antikörpers zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung können durch Affinitätschromato-

grafie bewerkstelligt werden. Als Säule, die für eine derartige Affinitätschromatografie verwendet wird, können Protein A- und Protein G-Säulen genannt werden. Beispiele der in der Protein A-Säule verwendeten Träger sind Hyper D, POROS, Sepharose F. F. und dgl.. Alternativ dazu, können Verfahren zur Abtrennung und Reinigung, die herkömmlich für Proteine zur Anwendung gelangen, ohne jede Einschränkung angewandt werden.

[0078] Abtrennung und Reinigung des Antikörpers zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung können auch durch Kombinieren, in geeigneter Weise, von Chromatografie, die sich von der oben genannten Affinitätschromatografie unterscheidet, von Filtration, Ultrafiltration, Aussalzen, Dialyse und dgl. bewerkstelligt werden. Die Chromatografie schließt z.B. eine Ion-Austauschchromatografie, eine hydrophobe Chromatografie, eine Gelfiltration und dgl. ein. Diese Chromatografien können auch als Hochleistungs-Flüssigchromatografie (HPLC) zur Anwendung gelangen. Alternativ dazu, kann auch eine Umkehrphasen-HPLC angewandt werden.

[0079] Die Konzentration des oben erhaltenen Antikörpers kann durch Absorptionsmessung oder durch Enzym-verbundenen Immunosorbensassay (ELISA) und dgl. bestimmt werden. So wird bei Anwendung der Absorptionsmessung eine Probe in geeigneter Weise mit PBS(–) verdünnt und dann die Absorption bei 280 nm gemessen, worauf die Konzentration mit einem Absorptionskoeffizient von 1,35 OD bei 1 mg/mL berechnet wird. Bei Anwendung des ELISA-Verfahrens wird die Messung wie folgt durchgeführt. So werden 100 µL Ziege-anti-Mensch-IgG (hergestellt von TAGO), verdünnt auf 1 µg/mL in 0,1 M Bicarbonat-Puffer (pH = 9,6), in eine 96-Loch-Platte (hergestellt von Nunc) gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert, um den Antikörper zu immobilisieren. Nach Blockierung werden 100 µL von jeweils entsprechend verdünntem Antikörper der vorliegenden Erfindung oder einer Probe, die den Antikörper enthält, oder 100 µL Mensch-IgG (hergestellt von CAP-PEL) als Standard zugegeben und bei Raumtemperatur 1 h lang inkubiert.

[0080] Nach der Wäsche werden 100 µL 5000-fach verdünnter Alkali-Phosphatase-markierter anti-Mensch-IgG-Antikörper (hergestellt von BIO SOURCE) zugegeben und bei Raumtemperatur 1 h lang inkubiert. Nach der Wäsche wird die Substratlösung zugegeben und inkubiert, worauf die Absorption bei 405 nm mit einem MICROPLATE READER Model 3550 (hergestellt von Bio-Rad) gemessen wird, um die Konzentration des gewünschten Antikörpers zu berechnen.

[0081] Die Aktivität des IL-6-Antagonist zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung kann mit einem herkömmlich bekannten Verfahren bewertet werden.

In spezifischer Weise wird die IL-6-abhängige Zelle MH60.BSF2 kultiviert, zu der IL-6 gegeben wird, und die Aktivität kann unter Einverleibung von ^3H -Thymidin in die IL-6-abhängige Zelle in Koexistenz mit dem IL-6-Antagonist bewertet werden. Alternativ dazu, kann die Bewertung durch Kultivieren von U266, einer IL-6-Rezeptor-exprimierenden Zelle, durch gleichzeitige Zugabe von ^{125}J -markiertem IL-6 und einem IL-6-Antagonist und dann durch Bestimmen des ^{125}J -markierten IL-6 erfolgen, das an die IL-6-Rezeptor-exprimierende Zelle gebunden ist. Im obigen Assaysystem wird eine negative Vergleichsgruppe, die keine IL-6-Antagonisten enthält, zusätzlich zu der Gruppe, worin ein IL-6-Rezeptor-Antagonist vorhanden ist, eingesetzt, und die dafür erhaltenen Ergebnisse werden verglichen, um die IL-6-Inhibieraktivität des IL-6-Rezeptor-Antagonist zu bewerten.

[0082] Zur Bestätigung der durch die vorliegende Erfindung bewirkten Effekte wird ein anti-IL-6-R-Antikörper Lebewesen verabreicht, die Pankreatitis nach einer Überdosis von Caerulein entwickelt haben, und der Effekt zur Unterdrückung von Bauchspeicheldrüsenödemen und zur Verbesserung des Bauchspeicheldrüsenengewichts ist somit bewertbar. Weitere Effekte der vorliegenden Erfindung sind Effekte zur Vorbeugung von Pankreatitis oder eines erneuten Auftretens von Pankreatitis.

[0083] Die Verabreichung von Caerulein zur Verursachung von Pankreatitis kann beispielsweise gemäß dem im unten angegebenen Beispiel beschriebenen Verfahren durchgeführt werden. Die Lebewesen, in denen Pankreatitis verursacht bzw. induziert wird, können die in solchen Versuchen gewöhnlich verwendeten wie Mäuse und Ratten sein.

[0084] Wie im unten angegebenen Beispiel beschrieben, führte bei den Lebewesen, die Pankreatitis entwickelten, eine Verabreichung von anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper zur Unterdrückung des Bauchspeicheldrüsenengewichts und zu einer Linderung bei den Ödemen der Bauchspeicheldrüse, wodurch gezeigt wurde, dass anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper einen therapeutischen Effekt auf Pankreatitis ausüben.

[0085] Gemäß der vorliegenden Erfindung werden Säugetiere behandelt. Bevorzugt werden Menschen behandelt.

[0086] Die vorbeugenden oder therapeutischen Mittel der vorliegenden Erfindung können entweder oral oder parenteral, systemisch oder örtlich verabreicht werden. Beispielsweise können intravenöse Injektionen wie Tropfinfusion, intramuskuläre, intraperitoneale und subkutane Injektionen, Suppositorien, Darmwäsche, orale enterisch überzogene Tabletten und dgl. ausgewählt werden, und das Verabreichungsverfahren ist gemäß dem Alter und den Bedingungen des Patienten entsprechend wählbar. Die wirkungs-

volle Dosierung wird im Bereich von 0,01 bis 100 mg pro kg Körpergewicht pro Verabreichung gewählt. Alternativ dazu, kann die Dosierung im Bereich von 1 bis 1000 und vorzugsweise von 5 bis 50 mg pro Patient gewählt werden.

[0087] Die vorbeugenden oder therapeutischen Mittel der vorliegenden Erfindung gegen Pankreatitis können pharmazeutisch zulässige und geeignete Träger oder Additive in Abhängigkeit vom Verabreichungsweg enthalten. Beispiele derartiger Träger oder Additive schließen Wasser, ein pharmazeutisch zulässiges organisches Lösungsmittel, Kollagen, Polyvinylalkohol, Polyvinylpyrrolidon, Carboxyvinylpolymer, Carboxymethylcellulosenatrium, Polyacrylnatrium, Natriumalginat, wasserlösliches Dextran, Carboxymethylstärke-natrium, Pektin, Methylcellulose, Ethylcellulose, Xanthan-Gummi, Gummi arabicum, Kasein, Gelatine, Agar, Diglycerin, Propylenglykol, Polyethylenglykol, Vaseline, Paraffin, Stearylalkohol, Stearinsäure, Humanserumalbumin (HSA), Mannit, Sorbit, Lactose, pharmazeutisch zulässige oberflächenaktive Mittel und dgl. ein. Die verwendeten Additive werden, ohne darauf eingeschränkt zu sein, aus den obigen oder aus Kombinationen davon in Abhängigkeit von der Dosierungsform gewählt.

Beispiele

[0088] Die vorliegende Erfindung wird nun noch detaillierter unter Bezug auf Beispiele, Bezugsbeispiele und Versuche erläutert. Es sei allerdings angemerkt, dass die vorliegende Erfindung in keiner Weise auf diese eingeschränkt ist.

Beispiel 1

[0089] B6-hIL-6-transgenen Mäusen oder B6-Mäusen (Wurfgeschwistern der hIL-6-transgenen Mäuse) (Clinical Immunology and Immunopathology 82:117–124, 1997) wurde Caerulein (hergestellt von Kyowa Hakko), gelöst in physiologischer Salzlösung mit 50 µg/kg, intraperitoneal jede Stunde 7 Mal verabreicht. Der anti-Maus-IL-6-Rezeptor-Monoklonalantikörper MR16-1 wurde den Mäusen mit 1 mg/Maus über die Schwanzvene unmittelbar vor der Caerulein-Verabreichung verabreicht.

[0090] Als Vergleich wurde das für den Antikörper vorgesehene Lösungsmittel (PBS) herangezogen. 8 h später wurden die Mäuse euthanisiert, um das Gewicht der Bauchspeicheldrüse, Serum-Amylase und die Histologie der Bauchspeicheldrüse zu beobachten. Das Bauchspeicheldrüsengewicht und das Körpergewicht sind in [Fig. 1](#) dargestellt. Die Histologie der Bauchspeicheldrüse ist in [Fig. 2](#) bis [Fig. 4](#) gezeigt. Die Serum-Amylase wurde mit dem Iod-Stärke (blaue Stärke)-Verfahren gemessen. Für die Histologie der Bauchspeicheldrüse wurde ein Paraffinblock der Bauchspeicheldrüse zubereitet und mit Hemato-

xylin-Eosin (HE)-Färbung zur mikroskopischen Betrachtung gefärbt.

[0091] Bei den IL-6-transgenen Mäusen war die durch Caerulein-Verabreichung induzierte Gewichtszunahme der Bauchspeicheldrüse ausgeprägter im Vergleich zu den Wurfgeschwistern (Normalmäusen).

[0092] Die Inaugenscheinnahme ergab, dass die Ödeme, wie auch die Bauchspeicheldrüsenentzündung (Pankreatitis) weiter fortgeschritten waren. Zur Verabreichung von MR16-1 an die IL-6-transgenen Mäuse wurde die durch Caerulein-Verabreichung induzierte Gewichtszunahme der Bauchspeicheldrüse unterdrückt. Der histologische Vergleich der IL-6-transgenen Mäusegruppe ([Fig. 3](#)) und der Normalmäusegruppe ([Fig. 2](#)) hat gezeigt, dass Flächen der Ödeme usw. bei den Normalmäusen und die durch Neutrophileninfiltration usw. beeinflussten Regionen kleiner waren. Dies zeigt an, dass die Verabreichung von MR16-1 eine Verbesserung ergab ([Fig. 4](#)). Somit sind, da der Effekt von anti-IL-6-Rezeptor-Monoklonalantikörper im Maus-Modell von Caeruleininduzierter akuter Pankreatitis beobachtet wurde, IL-6-Antagonisten wie anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper durch Unterdrückung der Effekte von IL-6 zur Behandlung, Linderung der Strenge und zur Vorbeugung des Einsetzens akuter Pankreatitis wirkungsvoll sind.

Beispiel 2

[0093] B6-hIL-6-transgenen Mäusen oder B6-Mäusen (Wurfgeschwistern der hIL-6-transgenen Mäuse) (Clinical Immunology and Immunopathology 82: 117–124, 1997) wurde Caerulein (hergestellt von Kyowa Hakko), gelöst in physiologischer Salzlösung mit 50 µg/kg, intraperitoneal 7 Mal in stündlichen Intervallen verabreicht. Zur Induzierung einer strengen Pankreatitis wurde LPS (Lipopolysaccharid, hergestellt von Sigma) intraperitoneal mit 1 mg/mL einhergehend mit der anfänglichen Caerulein-Verabreichung verabreicht. Anti-Maus-IL-6-Rezeptor-Monoklonalantikörper MR16-1 wurde den Mäusen mit 1 mg/Maus über die Schwanzvene 10 min vor der anfänglichen Caerulein-Verabreichung verabreicht. Als Vergleich wurde das für den Antikörper vorgesehene Lösungsmittel (PBS) herangezogen. 8 h später wurden die Mäuse euthanisiert, um das Gewicht der Bauchspeicheldrüse zu messen. Das Bauchspeicheldrüsengewicht und das Körpergewicht sind in [Fig. 5](#) dargestellt.

[0094] Bei der strengen Pankreatitis, die in den IL-6-transgenen Mäusen induziert war, verursachte die MR16-1-Verabreichung einen ausgeprägten Verbesserungseffekt. Somit sind im Maus-Modell strenger akuter Pankreatitis, die durch Caerulein und LPS induziert ist, IL-6-Antagonisten wie anti-IL-6-Rezep-

tor-Antikörper durch Unterdrückung der Effekte von IL-6 zur Behandlung, Linderung der Strenge und zur Vorbeugung des Einsetzens strenger akuter Pankreatitis wirkungsvoll.

Bezugsbeispiel 1: Herstellung von löslichem Mensch-IL-6-Rezeptor

[0095] Löslicher IL-6-Rezeptor wurde mit einem PCR-Verfahren mit dem Plasmid pBSF2R.236 hergestellt, das cDNA enthält, die IL-6-Rezeptor encodiert, erhalten gemäß dem Verfahren von Yamasaki et al. (K. Yamasaki et al., Science (1988) 241, 825–828). Das Plasmid pBSF2R.236 wurde mit einem Restriktionsenzym Sph I abgebaut, um die cDNA von IL-6-Rezeptor zu erhalten, der dann in mp18 (hergestellt von Amersham) eingereicht wurde. Mit einem synthetischen Oligoprimmer, entworfen zur Einführung eines Stop-Codon in die IL-6-Rezeptor-cDNA, wurde eine Mutation in die IL-6-Rezeptor-cDNA mit dem PCR-Verfahren unter Anwendung eines in vitro-Mutagenese-Systems (hergestellt von Amersham) eingeführt. Mit dem Verfahren wurde der Stop-Codon in die Aminosäure an Position 345 eingeführt und ergab cDNA, die löslichen IL-6-Rezeptor encodiert.

[0096] Zur Exprimierung der cDNA von löslichem IL-6-Rezeptor in CHO-Zellen wurde diese mit Plasmid pSV (hergestellt von Pharmacia) verknüpft, um das Plasmid pSVL344 zu erhalten. Die cDNA von löslichem IL-6-Rezeptor, die mit Hind III-Sal I gespalten wurde, wurde in das Plasmid pCEdhfr, enthaltend die cDNA von dhfr, eingereicht, um das Plasmid pCEdhfr344 zu erhalten, das in die CHO-Zellen exprimiert werden kann.

[0097] 10 µg Plasmid pCEdhfr344 wurden zu einer dhfr-CHO-Zelllinie DXB-11 (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216–4220) mit dem Calciumphosphatfällungsverfahren (C. Chen et al., Mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745–2751) transfiziert. Die transfizierten CHO-Zellen wurden 3 Wochen lang in einem Nucleosid-freien α-MEM-Selektionsmedium, enthaltend 1 mM Glutamin, 10%iges dialysiertes FCS, 100 E/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin, kultiviert.

[0098] Die selektierten CHO-Zellen wurden mit einem limitierenden Verdünnungsverfahren gesiebt, um einen Einzel-CHO-Zellklon zu erhalten. Der CHO-Zellklon wurde in 20 bis 200 nM Methotrexat (MTX) amplifiziert, um eine CHO-Zelllinie 5E27 zu erhalten, die löslichen Mensch-IL-6-Rezeptor erzeugt. Die CHO-Zelllinie 5E27 wurde in einem Iscov-modifizierten Dulbecco's Medium (IMDM, hergestellt von Gibco), enthaltend 5 % FBS, kultiviert. Der Kulturüberstand wurde gesammelt, worauf die Konzentration an löslichem IL-6-Rezeptor im Kulturüberstand mit ELISA bestimmt wurde. Das Ergebnis bestätigte,

dass löslicher IL-6-Rezeptor im Kulturüberstand vorhanden ist.

Bezugsbeispiel 2: Herstellung von Mensch-IL-6-Antikörper

[0099] 10 µg rekombinantes IL-6 (Hirano et al., Immunol. Lett. 17:41, 1988) wurden an BALB/c-Mäusen zusammen mit Freund's komplettem Adjuvans immunisiert und das Ganze jede Woche wiederholt, bis anti-IL-6-Antikörper im Serum detektiert werden konnte. Immunzellen wurden aus lokalem Lymphknoten extrahiert und dann mit einer Myeloma-Zelllinie P3U1 mit Polyethylenglykol 1500 verschmolzen. Hybridoma wurden gemäß dem Verfahren von Oi et al. selektiert (Selective Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980), worin das HAT-Medium zur Anwendung gelangt, und das Hybridom, das Mensch-IL-6-Antikörper erzeugt, wurde eingeführt.

[0100] Das Hybridom, das Mensch-IL-6-Antikörper erzeugt, wurde einem IL-6-Bindungsassay wie folgt unterzogen. So wurde eine 96-Loch-Mikrotiterplatte (hergestellt von Dynatech Laboratories Inc., Alexandria, VA) aus flexiblem Polyvinyl mit 100 µL Ziege-anti-Maus-Ig (10 µL/mL, hergestellt von Cooper Biomedical Inc., Malvern, PA) über Nacht bei 4°C überzogen. Anschließend wurde die Platte mit 10 µL PBS, enthaltend 1 Rinderserumalbumin (BSA), bei Raumtemperatur 2 h lang behandelt.

[0101] Nach Wäsche in PBS wurden 100 µL Hybridom-Kulturüberstand in jede Lochvertiefung gegeben und dann über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Platte wurde gewaschen, ¹²⁵J-markiertes rekombinantes IL-6 wurde in jede Lochvertiefung mit einer Konzentration von 2000 cpm/0,5 ng/Lochvertiefung gegeben, worauf nach einer Wäsche die Radioaktivität jeder Lochvertiefung mit einem γ-Zähler (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA) bestimmt wurde. von 216 Hybridomklonen waren 32 positiv im IL-6-Bindungsassay. Aus diesen Klonen wurde stabiles MH166.BSF2 schließlich erhalten. Anti-IL-6-Antikörper MH166, erzeugt mit dem genannten Hybridom, weist einen Subtyp von IgG1k auf.

[0102] Dann wurde der IL-6-abhängige Maus-Hybridomklon MH60.BSF2 herangezogen, um die neutralisierende Aktivität bezüglich des Wachstums des Hybridom durch MH166-Antikörper zu untersuchen. Die MH60.BSF2-Zellen wurden auf 1 × 10⁴/200 µL/Lochvertiefung verteilt und Proben mit MH166-Antikörper wurden zugegeben, 48 h lang kultiviert, 0,5 µCi/Lochvertiefung ³H-Thymidin (New England Nuclear, Boston, MA) wurden zugegeben und die Kultivierung weitere 6 h lang fortgesetzt. Die Zellen wurden auf ein Glas-Filterpapier gegeben und mit einer automatischen Erntevorrichtung (Labo Mash Science Co., Tokio, Japan) behandelt. Als Vergleich wurde Kanin-

chen-anti-IL-6-Antikörper herangezogen.

[0103] Als Ergebnis inhibierte der MH166-Antikörper in Dosis-abhängiger Weise den Einbau von ³H-Thymidin in mit IL-6 induzierten MH60.BSF2-Zellen. Dies enthüllte, dass der MH166-Antikörper die Aktivität von IL-6 neutralisiert.

Bezugsbeispiel 3: Herstellung von Mensch-anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper

[0104] Anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper MT18, hergestellt mit dem Verfahren von Hirata et al. (Y. Hirata et al., J. Immunol. 143, 2900–2906, 1989) wurde an CN-Br-aktivierte Sepharose 4B (hergestellt von Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) gemäß dem gebundenen Regimen gebunden, und der IL-6-Rezeptor wurde gereinigt (K. Yamasaki et al., Science (1988) 241, 825–828). Eine Mensch-Myeloma-Zelllinie U266 wurde mit 1 mM p-Aminophenylmethansulfonylfluorid-Hydrochlorid (hergestellt von Wako Chemicals), enthaltend 1 % Digitonin (hergestellt von Wako Chemicals), 10 mM Triethanolamin (pH = 7,8) und 0,15 M NaCl (Digitonin-Puffer), solubilisiert und mit an Sepharose 4B-Perlen gebundenem MT18-Antikörper vermischt. Dann wurden die Perlen 6 Mal mit dem Digitonin-Puffer gewaschen, um den teilgereinigten IL-6-Rezeptor zur Immunisierung zuzubereiten.

[0105] BALB/c-Mäuse wurden 4 Mal in Intervallen von 10 Tagen mit dem obigen teilgereinigten IL-6-Rezeptor, erhalten aus 3 × 10⁹ U266-Zellen, immunisiert, worauf ein Hybridom mit einem Standardverfahren hergestellt wurde. Der Hybridom-Kulturüberstand aus der Wachstum-positiven Lochvertiefung wurde bezüglich seiner Aktivität zur Bindung an IL-6-Rezeptor gemäß dem unten beschriebenen Verfahren getestet. 5 × 10⁷ U266-Zellen wurden mit ³⁵S-Methionin (2,5 mCi) markiert und mit dem obigen Digitonin-Puffer solubilisiert. Die solubilisierten U266-Zellen wurden mit einem 0,04 mL Volumen von an Sepharose 4B-Perlen gebundenem MT18-Antikörper vermischt und dann 6 Mal mit dem Digitonin-Puffer gewaschen. ³⁵S-Methioninmarkierter IL-6-Rezeptor wurde mit 0,25 mL Digitonin-Puffer (pH = 3,4) eluiert und in 0,025 mL 1 M Tris (pH = 7,4) neutralisiert.

[0106] 0,05 mL Hybridom-Kulturüberstand wurden mit 0,01 mL Protein G-Sepharose (hergestellt von Pharmacia) vermischt. Nach Wäsche wurde die Sepharose mit 0,005 mL ³⁵S-markierter IL-6-Rezeptorlösung inkubiert, die wie oben hergestellt worden war. Der Immunoniederschlag wurde mit SDS-PAGE analysiert, um den Hybridom-Kulturüberstand zu bestimmen, der mit IL-6-Rezeptor reagiert. Als Ergebnis, wurde der Reaktion-positive Hybridomklon PM-1 erstellt. Der aus dem Hybridom PM-1 erzeugte Antikörper weist einen Subtyp von IgG1k auf.

[0107] Die Inhibitoraktivität der IL-6-Bindung des mit dem Hybridom PM-1 erzeugten Antikörpers zu Mensch-IL-6-Rezeptor wurde mit der Mensch-Myeloma-Zelllinie U266 untersucht. Ein rekombinantes Mensch-IL-6 wurde aus *E. coli* hergestellt (Hirano et al., Immunol. Lett. 17:41–45, 1988) und mit ^{125}J mit dem Bolton-Hunter-Reagens (New England Nuclear, Boston, MA) markiert (T. Taga et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967–981). 4×10^5 U266-Zellen wurden mit dem Kulturüberstand von 70 % (V/V) Hybridom PM-1 zusammen mit 14.000 cpm ^{125}J -markiertem IL-6 1 h lang kultiviert. 70 μL Probe wurden auf 300 μL FCS in einem 400 μL -Mikrofugen-Polyethylenröhrchen geschichtet. Nach Zentrifugation wurde die Radioaktivität der Zelle bestimmt.

[0108] Das Ergebnis zeigte, dass der mit dem Hybridom PM-1 erzeugte Antikörper die Bindung von IL-6 an IL-6-Rezeptor inhibiert.

Bezugsbeispiel 4: Herstellung von Maus-anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper

[0109] Ein monoklonaler Antikörper, gerichtet gegen Maus-IL-6-Rezeptor, wurde gemäß dem von Saito et al. in J. Immunol. (1993) 147, 168–173, beschriebenen Verfahren hergestellt.

[0110] Die CHO-Zellen, die löslichen Maus-IL-6-Rezeptor erzeugen, wurden in der IMDM-Kulturlöslichkeit, enthaltend 10 % FCS, kultiviert. Aus dem Kulturüberstand wurde löslicher Maus-IL-6-Rezeptor mit dem löslichen Maus-IL-6-Rezeptor-Antikörper RS12 (siehe Saito et al., oben) und mit einer Affinitätssäule, fixiert an Affigel 10-Gel (hergestellt von Biorad), gereinigt.

[0111] Der so erhaltene lösliche Maus-IL-6-Rezeptor (50 μg) wurde mit Freund's Komplettem Adjuvans vermischt, und dies wurde dann in den Bauch von Wistar-Ratten gespritzt. 3 Wochen nach der Verabreichung wurden die Tiere mit Freund's inkomplettem Adjuvans aufgefrischt. Am Tag 45 wurden Ratten-Milzzellen gesammelt und die Zellen bei ca. 2×10^8 mit 1×10^7 Maus-Myeloma-Zellen P3U1 unter Verwendung von 50 %igem PEG1500 (hergestellt von Boehringer Mannheim) gemäß einem herkömmlichen Verfahren verschmolzen und dann mit einem HAT-Kulturmedium gesiebt.

[0112] Nach Zugabe des Kulturüberstands zur mit Kaninchen-anti-Ratte-IgG-Antikörper (hergestellt von Cappel) überzogenen Platte wurde der lösliche Maus-IL-6-Rezeptor zur Reaktion gebracht. Anschließend wurden unter Verwendung von Kaninchen-anti-Maus-IL-6-Rezeptor-Antikörper und von Alkali-Phosphatase-markiertem Schaf-anti-Kaninchen-IgG Hybridoma, die gegen den löslichen Maus-IL-6-Rezeptor gerichteten Antikörper erzeugen, mit ELISA gesiebt. Nach Bestätigung der Anti-

körpererzeugung wurden die Hybridomklone 2 Mal untergesiebt, um einen Einzel-Hybridomklon zu erhalten. Der Klon wurde mit MR16-1 bezeichnet.

[0113] Die neutralisierende Aktivität des mit dem Hybridom erzeugten Antikörpers bezüglich einer Signaltransduktion von Maus-IL-6 wurde durch ^3H -Thymidin-Einbau mit MH60.BSF2-Zellen untersucht (T. Matsuda et al., J. Immunol. (1988) 18, 951–956). Auf einer 96-Loch-Platte wurden die MH60.BSF2-Zellen bei 1×10^4 Zellen/200 μL /Lochvertiefung zubereitet. Zur Platte wurden 10 pg/mL Maus-IL-6 und MR16-1-Antikörper oder RS12-Antikörper bei 12,3 bis 1000 ng/mL gegeben und dann bei 37°C und 5°C CO_2 44 h lang kultiviert, worauf 1 μCi /Lochvertiefung ^3H -Thymidin zugegeben wurde. Nach 4 h wurde der Einbau des ^3H -Thymidin gemessen. Als Ergebnis unterdrückte der MR16-1-Antikörper den Einbau von ^3H -Thymidin in die MH60.BSF2-Zellen. Somit wurde belegt, dass der vom Hybridom MR16-1 erzeugte Antikörper die Bindung von IL-6 an IL-6-Rezeptor inhibiert.

Industrielle Anwendbarkeit

[0114] Gemäß der vorliegenden Erfindung wurde dargelegt, dass anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper einen therapeutischen Effekt gegenüber Pankreatitis zeigen und ergeben und als therapeutisches Mittel gegen akute Pankreatitis zu verwenden sind.

Patentansprüche

1. Verwendung eines anti-Interleukin-6-Rezeptor (anti-IL-6R)-Antikörpers zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Pankreatitis.

2. Verwendung gemäß Anspruch 1, worin der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist, der gegen einen IL-6-Rezeptor gerichtet ist.

3. Verwendung gemäß Anspruch 2, worin der Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist, der gegen einen Mensch- oder Maus-IL-6-Rezeptor gerichtet ist.

4. Verwendung gemäß Anspruch 2 oder 3, worin der Antikörper ein rekombinanter Antikörper ist.

5. Verwendung gemäß Anspruch 3, worin der monoklonale Antikörper, der gegen einen Mensch- oder Maus-IL-6-Rezeptor gerichtet ist, jeweils ein PM-1- oder MR-16-1-Antikörper ist.

6. Verwendung gemäß Anspruch 2 oder 3, worin der Antikörper ein chimärer Antikörper oder ein humanisierter Antikörper ist, der gegen einen IL-6-Rezeptor gerichtet ist.

7. Verwendung gemäß Anspruch 6, worin der hu-

manisierte Antikörper ein humanisierter PM-1-Antikörper ist.

8. Verwendung gemäß einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Pankreatitis eine akute Pankreatitis ist.

9. Verwendung eines anti-IL-6R-Antikörpers zur Herstellung eines Medikaments zur Unterdrückung von Pankreasödemen bei Pankreatitis.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

Fig.1

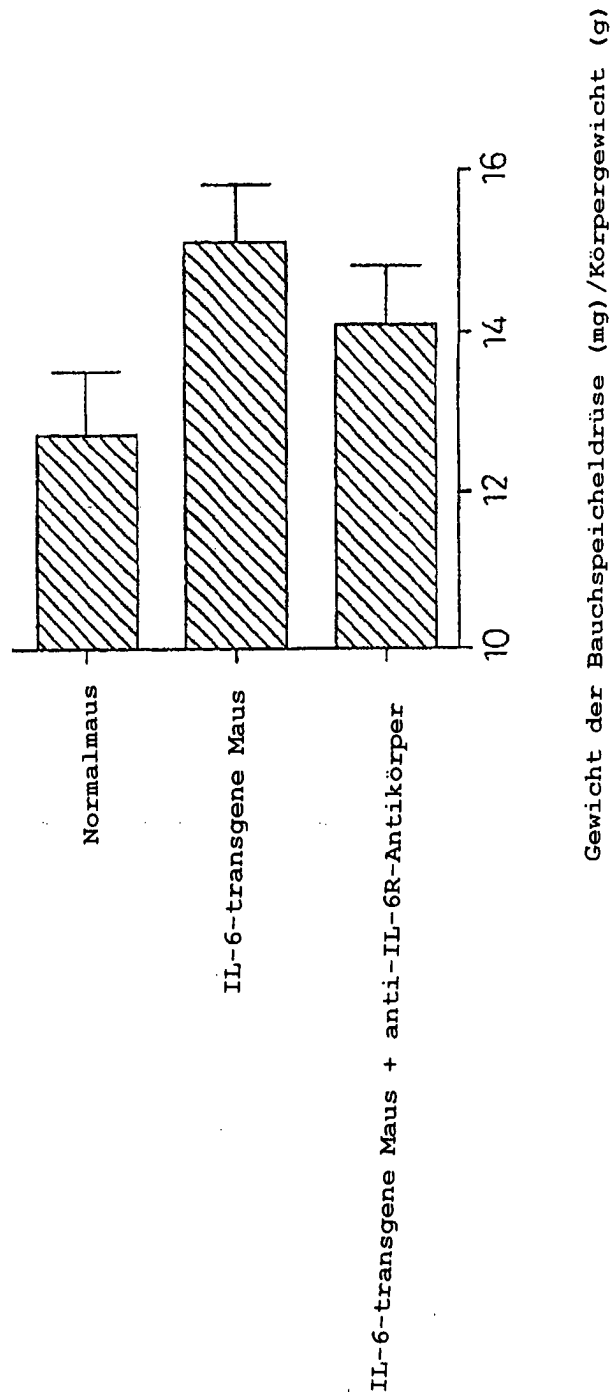


Fig. 2

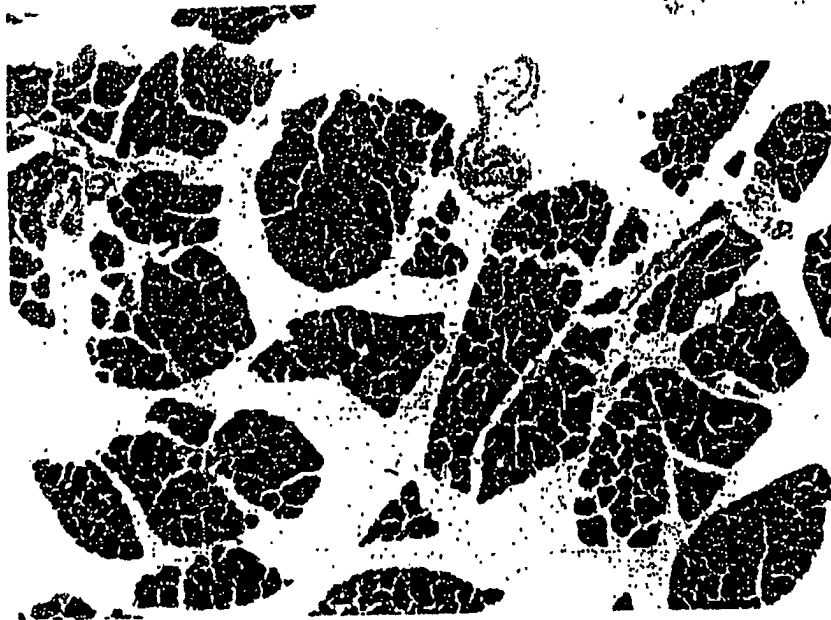


Fig. 3

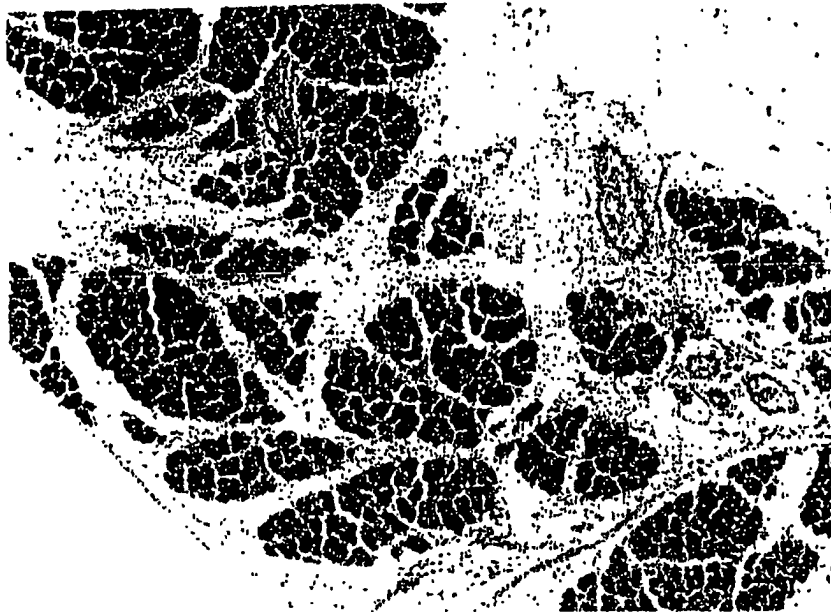


Fig. 4

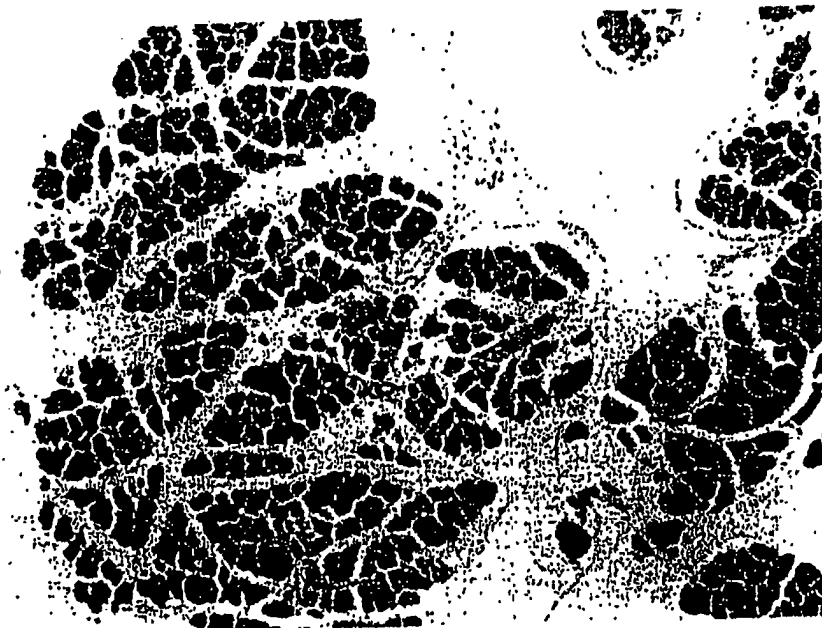


Fig. 5

