

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710148180.8

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 2 月 27 日

[11] 公开号 CN 101130077A

[22] 申请日 2004.2.24

[21] 申请号 200710148180.8

分案原申请号 200480005017.0

[30] 优先权

[32] 2003.2.24 [33] JP [31] 2003-046214

[71] 申请人 中外制药株式会社

地址 日本东京

共同申请人 学校法人庆应义塾

[72] 发明人 冈野荣之 冈田诚司 中村雅也

吉崎和幸

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 陈 昕

权利要求书 1 页 说明书 29 页 附图 5 页

[54] 发明名称

含有白介素 6 拮抗剂的脊髓损伤治疗剂

[57] 摘要

本分案申请主要涉及一种以白介素 6 拮抗剂为有效成分的神经干细胞的分化调节剂和向神经胶质细胞分化的分化抑制剂，更具体地涉及白介素 6 拮抗剂在制造神经干细胞的分化调节剂中的应用。

1. 一种白介素 6 (IL-6) 拮抗剂在制造神经干细胞的分化调节剂中的应用。
2. 权利要求 1 记载的应用, 神经干细胞的分化调节剂为向神经胶质细胞分化的分化抑制剂。
3. 权利要求 1 或 2 记载的应用, 上述 IL-6 拮抗剂是针对 IL-6 受体的抗体。
4. 权利要求 3 记载的应用, 上述抗体是单克隆抗体。
5. 权利要求 4 记载的应用, 上述抗体是针对人 IL-6 受体的单克隆抗体。
6. 权利要求 4 记载的应用, 上述抗体是针对小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体。
7. 权利要求 3~6 任何一项记载的应用, 其中上述抗体是重组型抗体。
8. 权利要求 5 或 7 记载的应用, 其中针对上述人 IL-6 受体的单克隆抗体是 PM-1 抗体。
9. 权利要求 5 或 7 记载的应用, 其中针对上述小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体是 MR16-1 抗体。
10. 权利要求 3~9 任何一项记载的应用, 其中上述抗体是嵌和抗体、人源化抗体或人抗体。
11. 权利要求 10 记载的应用, 其中上述人源化抗体是人源化 PM-1 抗体。

含有白介素 6 拮抗剂的脊髓损伤治疗剂

本申请为申请号 200480005017.0、申请日 2004 年 2 月 24 日、发明名称“含有白介素 6 拮抗剂的脊髓损伤治疗剂”的分案申请。

技术领域

本发明涉及含有以白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 拮抗剂为有效成分的脊髓损伤治疗剂。

背景技术

在现代社会, 交通事故、跌落·摔倒、运动中的事故等, 脊髓受损伤的机会很多, 据说在日本, 每年受伤者达到了 5000 人, 累积患者数达到 10 万人。脊髓损伤的症状是永久性的, 如四肢运动知觉麻痹、膀胱·直肠障碍、呼吸障碍等非常严重, 作为日常性护理要进行恢复护理、呼吸管理、褥疮预防、排便·排尿护理等。

根本不存在脊髓损伤治疗方法, 只有包括手术在内的局部稳定等处置性疗法。以预防症状恶化为目的, 大量给予甾体, 不能得到对恢复麻痹有效的效果。多数脊髓损伤是由外部的机械性作用造成的损伤(一次损伤)开始, 经过体内的反应路径发展到进一步的组织破坏(二次损伤)。用于抑制这种两次损伤发展所使用的唯一药物是甲基脱氢强的松, 需要大量投入近 10000mg 该药物。但是, 据报道这种方法具有糖尿病急性恶化或肺炎等副作用。

在 19 世纪之初, 自从神经解剖学的巨匠 Ramon y Cajal 在所著书中论述指出“如果成体哺乳类的中枢神经系统(脑和脊髓)一旦受到损伤, 将不能再生”以来, 这种说法受到长期的信奉。可是, 进入 19 世纪 80 年代, 报告指出针对脊髓损伤的末梢神经(A. Aguayo 等人, J. Exp. Biol. 95: 231 -240, 1981)、胎儿脊髓移植(Bregman B. S., Dev. Brain Res., 34 : 265-279, 1987), 即使在脊髓损伤后, 如果能够在损伤部位导入适当的环境, 能看到损伤轴索的再生。而且还有神经营养因子促进损伤轴索的再生(Cai, D. 等人, Neuron, 22:

89-101, 1999)或确认脊索生长阻断因子(Chen, D. 等人, Nature, 403: 434-439, 2000)等多个于脊髓再生相关的报道,使损伤脊髓的再生成为可能。可是,因为胎儿脊髓移植存在捐献者不足和伦理等问题,临床应用极其困难。

还有,神经干细胞(Neural stem cell)是能够反复增殖传代(自我复制能力)的同时,还能生成神经元、星形胶质细胞和寡突胶质细胞这3种构成中枢神经系统的细胞(多分化能力)的未分化的神经细胞,因为也存在于成体脊髓中,所以假想能够修复损伤后的组织。可是,实际上,在损伤后它们并未分化成神经元,而是全部分化成胶质细胞,最终形成瘢痕。

时常可以看到关于神经干细胞的分化诱导的细胞因子的报道。Weiss 等人报道指出用 BDNF (brain-derived neurotrophic factor) 能促进来自胎儿小鼠线粒体的神经干细胞向神经元分化(Ahmed, S. 等人, J. Neurosci., 150: 5765-5778 1995)。还有,据报道, Ghosh 等人用 NT-3 (Neurotrophin-3) 促进了来自胎儿大鼠大脑皮肤的神经干细胞向神经元分化(Ghosh, A. 等人, Neuron 15: 89-103 1995)。Mckay 等人有创见性地(instructive)将来自胎儿大鼠海马层的神经干细胞用 PDNF (Platelet-derived neurotrophic factor) 诱导向神经元分化,用 CNTF (Ciliary neurotrophic factor) 诱导向星形胶质细胞分化,用甲状腺激素(T3)诱导向寡突胶质细胞分化(J one, K. 等人, Gene & Dev. 10: 3129 - 3140 1996)。

还有,近年,据多贺等人报告,用 LIF (Leukemia inhibitory factor) 和 BMP-2 (Bone morphogenic protein-2) 能促进来自胎儿小鼠神经上皮细胞的神经干细胞向星形胶质细胞分化(Nakashima, K. 等人, Science, 284: 479 - 482, 1999)。这些报告的共同点是 CNTF、LIF 等都属于 IL-6 亚家族。即,认为是通过细胞因子受体亚单位 gp130 的信号将神经干细胞向星形胶质细胞进行分化诱导。

不过,未见有证明通过细胞因子分化诱导神经干细胞可以恢复脊髓损伤的文献。

IL-6 是 B 细胞刺激因子 2 (BSF2) 或又称之为 $\beta 2$ 干扰素的细胞因子。IL-6 是作为和 B 淋巴细胞的激活相关的分化因子被人发现的 (Hirano, T. 等人, Nature (1986) 324, 73-76)。之后又被证明是对多种细胞功能产生影响的有功能性细胞因子 (Akira, S. 等人, Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78)。据报道 IL-6 能够诱导 T 淋巴细胞的成熟 (Lotz, M. 等人, J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258)。

IL-6 在细胞上通过两种蛋白质传递其生物学活性。一种是 IL-6 结合的分子量大约 80kD 的配体结合性蛋白质的 IL-6 受体 (Taga, T. 等人, J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981, Yamasaki, K. 等人, Science (1987) 241, 825-828)。IL-6 受体除了贯通细胞膜, 表达在细胞膜上以膜结合型存在之外, 主要以由细胞外区域构成的可溶性 IL-6 受体的形式存在。

另外一种是非配体结合性的信号传导中的分子量约 130kD 的膜蛋白质 gp130。IL-6 和 IL-6 受体形成 IL-6/IL-6 受体复合物, 然后通过和 gp130 结合, 将 IL-6 的生物学活性传递到细胞内 (Taga, T. 等人, Cell (1989) 58, 573-581)。

IL-6 拮抗剂是能够阻碍 IL-6 的生物学活性传递的物质。至今已知有: 针对 IL-6 的抗体 (抗 IL-6 抗体)、针对 IL-6 受体的抗体 (抗 IL-6 受体抗体)、针对 gp130 的抗体 (抗 gp130 抗体)、IL-6 突变体、IL-6 或 IL-6 受体的部分肽等。

关于抗 IL-6 受体抗体有几篇报道 (Novick, D. 等人, Hybridoma (1991) 10, 137-146, Huang Y. W. 等人, Hybridoma (1993) 12, 621-630, 国际专利申请公开号 W0 95/09873、法国专利申请公开号 FR 2694767、美国专利号 US 521628)。已知通过向其中之一的小鼠抗体 PM-1 (Hirata, Y. 等人, J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906) 的互补性决定区域 (CDR, complementarity determining region) 移植人抗体得到的人源化的 PM-1 抗体 (国际专利申请公开号 W0 92/19759)。

专利文献 1: W0 95/09873

专利文献 2: FR 2694767

专利文献 3: USP 0521628

非专利文献 1: A. Aguayo 等人, J. Exp. Biol. 95: 231-240, 1981

非专利文献 2: Bregman B.S., Dev. Brain Res., 34: 265 - 279, 1987

非专利文献 3: Cai, D. 等人, Neuron, 22: 89-101, 1999

非专利文献 4: Chen, D. 等人, Nature, 403: 434-439, 2000

非专利文献 5: Ahmed, S. 等人, J. Neurosci., 15: 5765-5778, 1995

非专利文献 6: Ghosh, A. 等人, Neuron 15: 89-103, 1995

非专利文献 7: Jones, K 等人, Gene & Dev. 10: 3129-3140, 1996

非专利文献 8: Nakashima, K. 等人, Science, 284: 479-482, 1999

非专利文献 9: Hirano, T. 等人, Nature (1986) 324, 73-76

非专利文献 10: Akira, S. 等人, Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78

非专利文献 11: Lotz, M. 等人, J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258

非专利文献 12: Taga, T. 等人, Cell (1989) 58, 573-581

非专利文献 13: Yamasaki, K. 等人, Science (1987) 241, 825-828

非专利文献 14: Novick, D. 等人, Hybridoma (1991) 10, 137-146

非专利文献 15: Huang, Y. 等人, Hybridoma (1993) 12, 621-630

非专利文献 16: Hirata, Y. 等人, J. Immunol (1989) 143, 2900-2906

发明内容

本发明不仅预防脊髓损伤其症状的恶化, 还希望获得使之恢复的治疗手段, 本发明提供有用的药物组成物作为该手段。

本发明人等为了解决上述课题, 进行了各种研究, 结果发现针对 IL-6 的拮抗剂, 例如: 针对 IL-6 受体的抗体具有恢复脊髓损伤的作用。所以, 本发明提供了含有以白介素 6 (IL-6) 拮抗剂为有效成分的

脊髓损伤治疗剂。

本发明还提供了含有以白介素 6 (IL-6) 拮抗剂为有效成分的神经干细胞分化调节剂。

本发明另外提供了含有以白介素 6 (IL-6) 拮抗剂为有效成分的抑制向神经胶质细胞分化的分化抑制剂。

作为上述的 IL-6 拮抗剂, 优选针对 IL-6 受体的抗体, 特别优选单克隆抗体。该单克隆抗体, 可列举: 针对人 IL-6 受体的单克隆抗体以及针对小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体。上述针对人 IL-6 受体的单克隆抗体的具体例子, 可列举 PM-1 抗体, 作为针对小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体, 可列举 MR16-1 抗体。作为针对 IL-6 受体的抗体, 还可以列举: 从产生单克隆抗体的杂交瘤中克隆的基因人为地操作得到的重组型抗体, 例如: 嵌和抗体、人源化抗体等。

附图说明

图 1 表示在下肢运动功能评价中, 与未给予抗 IL-6 受体抗体 (MR16) 的脊髓损伤的小鼠 (对照) 相比, 在给予上述抗体的脊髓损伤的小鼠中, 脊髓损伤后运动的恢复很大。

图 2 表示在转棒仪旋转试验中, 与未给予抗 IL-6 受体抗体 (MR16) 的脊髓损伤的小鼠 (对照) 相比, 在给予上述抗体的脊髓损伤的小鼠中, 脊髓损伤后运动强度的恢复很大。

图 3 表示与未给予抗 IL-6 受体抗体 (MR16) 的脊髓损伤的小鼠 (对照) 相比, 给予上述抗体的脊髓损伤的小鼠脊髓损伤部位的神经胶质细胞的形成受到抑制。

图 4 表示与脊髓未损伤 (シャム) 的小鼠相比, 在脊髓受到损伤的小鼠的脊髓损伤部位, IL-6 受体进行表达。

图 5 表示通过给予抗 IL-6 受体抗体 (MRA), 实际上使脊髓损伤部位的 IL-6 信号级联受到抑制的磷酸化 STAT3 的 western blot 图。

具体实施方式

在本发明中使用的 IL-6 拮抗剂不论其来源、种类和形状，只要能表现出脊髓损伤的治疗效果即可。

IL-6 拮抗剂是通过阻断经由 IL-6 的信号传递，阻碍 IL-6 的生物学活性的物质。IL-6 拮抗剂优选对 IL-6、IL-6 受体以及 gp130 中任何一个的结合具有阻碍作用的物质。作为 IL-6 拮抗剂，可列举：抗 IL-6 抗体、抗 IL-6 受体抗体、抗 gp130 抗体、IL-6 突变体、可溶性 IL-6 受体突变体或 IL-6 或 IL-6 受体的部分肽以及具有和这些物质同样活性的低分子物质。

可以用公知的手段作为多克隆抗体或单克隆抗体得到本发明中使用的抗 IL-6 抗体。本发明所使用的抗 IL-6 抗体特别优选来自哺乳动物的单克隆抗体。来自哺乳动物的单克隆抗体包括杂交瘤产生的抗体以及用基因工程方法将含抗体基因的表达载体转化到宿主中产生的抗体。这种抗体通过和 IL-6 结合，阻碍 IL-6 向 IL-6 受体结合，阻断 IL-6 的生物学活性向细胞内传递。

作为这种抗体，可列举：MH166 (Matsuda, T. 等人, Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956) 或 SK2 抗体 (Sato, K. 等人, 第 21 次日本免疫学会总会、学术记录 (1991) 21, 166) 等。

基本上可以使用公知技术，按照下述方法制备产生抗 IL-6 抗体的杂交瘤。即，用 IL-6 作为致敏原，将其按照通常的免疫方法进行免疫，将得到的免疫细胞通过常规的细胞融合方法和公知的亲本细胞融合，按照通常的筛选方法，通过筛选制备产生单克隆抗体的细胞。

具体而言，可按照下面方法制备抗 IL-6 抗体。例如：可以用 Eur. J. Biochem (1987) 168, 543-550, J. Immunol (1998) 140, 1534-1541 或 Agi. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688 中公开的 IL-6 基因/氨基酸序列得到作为获得抗体的致敏原而使用的人的 IL-6。

将 IL-6 基因序列插入到公知的表达载体系统中，转化到适当的宿主细胞中后，用公知的方法纯化该宿主细胞中的或培养上清中的 IL-6 蛋白质，可将该纯化的 IL-6 蛋白质作为致敏原使用。还有，也可以将 IL-6 蛋白质和其它蛋白质的融合蛋白作为致敏原使用。

可以用公知的手段得到作为多克隆抗体或单克隆抗体的在本发明中使用的抗 IL-6 受体抗体。本发明中使用的抗 IL-6 受体抗体特别优选来自哺乳动物的单克隆抗体。来自哺乳动物的单克隆抗体是由杂交瘤产生的, 以及用基因工程方法将含有抗体基因的载体转化到宿主中产生的。该抗体通过和 IL-6 受体结合, 阻碍 IL-6 向 IL-6 受体结合, 阻断 IL-6 的生物学活性向细胞内传递。

作为这种抗体, 可列举 MR16-1 抗体 (Tamura, T. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924-11928)、PM-1 抗体 (Hirata, Y. 等人, J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906)、AUK12-20 抗体、AUK64-7 抗体或 AUK146-15 抗体 (国际专利申请公开号 WO 92/19759) 等。这些抗体中, 特别优选用 PM-1 作为抗体。

还有, 产生 PM-1 抗体的杂交瘤细胞株作为 PM-1, 按照布达佩斯条约在 1989 年 7 月 12 日, 作为 FERM BP-2998 向独立行政法人产业技术综合研究所专利生物寄存中心 (茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) 进行国际寄存。Rat-mouse hybridoma MR 16-1, 按照布达佩斯条约在 1997 年 3 月 13 日, 作为 FERM BP-5875 向独立行政法人产业技术综合研究所专利生物寄存中心 (茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) 进行国际寄存。

基本上使用公知的技术按照下述方法制备产生抗 IL-6 受体单克隆抗体的杂交瘤。即, 用 IL-6 受体作为致敏原, 将其按照通常的免疫方法进行免疫, 将得到的免疫细胞按照常规的细胞融合方法和公知的亲本细胞融合, 用通常的筛选方法, 通过筛选制备得到产生单克隆抗体的细胞。

具体而言, 可以按照下述方法制备抗 IL-6 受体抗体。例如用欧洲专利申请公开号 EP 325474 中公布的 IL-6 受体基因/氨基酸序列可以得到作为获得抗体的致敏原使用的人 IL-6 受体抗体, 用日本专利申请公开号特开平 3-155795 中公布的 IL-6 受体基因/氨基酸序列可以得到小鼠抗 IL-6 受体抗体。

IL-6 受体蛋白质有在细胞膜上表达的和从膜上脱落的 (可溶性

IL-6 受体) (Yasukawa, K. 等人, J. Biochem. (1990) 108, 673-676) 2 种。可溶性 IL-6 受体实质上是由结合在细胞膜上的 IL-6 受体的细胞外区域构成的, 从缺失细胞膜贯通区域或缺失细胞膜贯通区域和细胞内区域这点出发, 它和膜结合型 IL-6 受体不同。IL-6 受体蛋白质, 在本发明中只要能作为制备抗 IL-6 受体抗体的致敏原使用, 可以使用任何一种 IL-6 受体。

将 IL-6 受体的基因序列插入到公知的表达载体系统中, 转化到适当的宿主细胞中后, 用公知的方法纯化该宿主细胞中的或培养上清中的 IL-6 受体蛋白质, 可将该纯化的 IL-6 蛋白质作为致敏原使用。还有, 也可将 IL-6 受体蛋白质和其它蛋白质的融合蛋白作为致敏原使用。

在平成元年(1989年)1月9日, 将含有包含编码人 IL-6 受体的 cDNA 的质粒 pIBIBSF2R 的大肠杆菌 (E. coli) 按照布达佩斯条约作为 HB101-pIBIBSF2R, 寄存编号 FERM BP-2232 向独立行政法人产业技术综合研究所专利生物寄存中心 (茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6) 进行国际寄存。

可以用公知的手段作为多克隆抗体或单克隆抗体得到本发明中使用的 gp130 抗体。本发明中使用的抗 gp130 抗体特别优选来自哺乳动物的单克隆抗体。来自哺乳动物的单克隆抗体是由杂交瘤产生的, 以及通过基因工程方法将含有抗体基因的载体转化到宿主中产生的。该抗体通过和 gp130 结合, 阻碍 IL-6/IL-6 受体复合物向 gp130 的结合, 阻断 IL-6 的生物学活性向细胞内传递。

作为这种抗体, 可列举: AM64 抗体 (特开平 3-219894)、4B11 抗体以及 2H4 抗体 (US 5571513)、B-S12 抗体以及 B-P8 (特开平 8-291199) 等。

基本上使用公知的技术按照下述方法制备产生抗 gp130 单克隆抗体的杂交瘤。即, 用 gp130 作为致敏原, 将其按照通常的免疫方法进行免疫, 将得到的免疫细胞用常规的细胞融合方法和公知的亲本细胞融合, 根据通常的筛选方法, 通过筛选制备产生单克隆抗体的细胞。

具体而言，可以按照下述方法制备单克隆抗体。例如用欧洲专利申请公开号 EP 411946 中公布的 gp130 基因/氨基酸序列可以得到作为获得抗体的致敏原使用的 gp130。

将 gp130 的基因序列插入到公知的表达载体系统中，转化到适当的宿主细胞中后，用公知的方法纯化该宿主细胞中的或培养上清中的 gp130 蛋白质，可以将该纯化的 gp130 蛋白质作为致敏原使用。还有，也可以将表达 gp130 的细胞或者 gp130 蛋白质和其它蛋白质的融合蛋白作为致敏原使用。

作为用致敏原免疫的哺乳动物，没有特定的限制，优选选择考虑到和细胞融合中使用的亲本细胞的适合性，一般使用啮齿类动物，例如：小鼠、大鼠、仓鼠等。

可以按照公知的方法用致敏原免疫动物。例如：可以用将致敏原注射到哺乳动物的腹腔中或皮下的一般性方法。具体而言，用 PBS (Phosphate-Buffered Saline) 或者生理盐水等将致敏原稀释到适当量，按照希望优选将悬浊物和通常的佐剂，例如：弗氏完全佐剂适量混合，乳化后，每 4-12 天对哺乳动物数次给药，还有，可以在致敏原免疫时，使用适当的载体。

经过如此免疫，确认血清中希望的抗体水平上升后，从哺乳动物中取出免疫细胞，进行细胞融合。进行细胞融合的特别优选的免疫细胞是脾细胞。

和上述免疫细胞融合的另外的亲本细胞是哺乳动物的骨髓瘤细胞，已有公知的多种细胞株，例如适于使用：P3X63Ag8.653 (Kearney, J. F. 等人, J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. 等人, Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. 等人, Nature (1978) 276, 269-270)、F0 (de St. Groth, S. F. 等人, J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、

R210(Galfre, G. 等人, Nature (1979) 277, 131-133) 等。

可以基本上按照公知的方法, 如: 按照 Milstein 等人的方法 (Kohler. G. and Milstein, C. , Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等进行上述免疫细胞和骨髓瘤细胞的细胞融合。

更具体而言, 例如, 可以在细胞融合促进剂存在的情况下, 在常规的营养培养液中进行上述细胞融合。作为融合促进剂, 例如使用: 聚乙二醇 (PEG)、仙台病毒 (HVJ) 等, 如果希望提高融合效率可以添加使用二甲亚砜等辅助剂。

免疫细胞和骨髓瘤细胞的使用比例, 例如: 相对骨髓瘤细胞, 优选免疫细胞达到 1~10 倍。作为上述细胞融合所用的培养液, 例如: 适合上述骨髓瘤的增殖的 RPMI1640 培养液、MEM 培养液, 此外, 可以使用培养这种细胞培养的常规培养液, 还有, 还可以并用胎牛血清 (FCS) 等血清添加剂。

细胞融合可将特定量的上述免疫细胞和骨髓瘤细胞在上述培养液混合, 将预先加热到 37℃ 的 PEG 溶液, 例如: 通常为平均分子量 1000~6000 左右的 PEG 溶液, 按照 30~60% (w/v) 的浓度添加、混合, 形成目的的融合细胞 (杂交瘤)。然后, 依次添加适当的培养液、重复离心、去除上清操作, 去除对杂交瘤生长不利的细胞融合剂等。

该杂交瘤用通常的选择培养液, 例如: 用 HAT 培养液 (含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶核苷) 培养进行选择。在该 HAT 培养液中培养为了达到使杂交瘤以外的细胞 (非融合细胞) 死亡的目的, 持续进行充分长的时间, 通常为数天~数周。然后, 实施常规的极限稀释法, 筛选和克隆产生目的的抗体的杂交瘤。

还有, 除了用抗原免疫人以外的动物得到上述杂交瘤之外, 在体外用目的的抗原蛋白质或抗原表达细胞致敏人淋巴细胞, 将致敏的 B 淋巴细胞和人骨髓瘤细胞如: U266 融合, 得到对目的的抗原或抗原表达细胞具有结合活性的目的的人抗体 (参见特公平 1-59878)。还有, 将抗原或抗原表达细胞给予具有人抗体基因文库 (レパトリ) 的转基因动物, 按照上述的方法也可以得到目的的人抗体 (参见国际专

利申请号 WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 94/25585、WO 96/34096、WO 96/33735)。

这样制备得到的产生单克隆抗体的杂交瘤可以在常规的培养液中传代培养，或在液氮中长期保存。

为了从该杂交瘤得到单克隆抗体，按照常规方法培养该杂交瘤，采用得到其上清的方法，或将该杂交瘤给予到与之相适应的哺乳动物中，使之增殖，得到其腹水的方法等。前种方法适于得到高纯度的抗体，另外后面的方法适合于抗体的大量生产。

例如：可以按照特开平 3-139293 所公开的方法制备产生抗 IL-6 受体抗体的杂交瘤。

可以用下述方法制备抗体，将在平成元年(1989年)7月12日按照布达佩斯条约作为 FERM BP-2998 国际寄存在独立行政法人产业技术综合研究所专利生物寄存中心(茨城县筑波市东 1 丁目 1 番地 1 中央第 6)的 PM-1 产生抗体杂交瘤注入到 BALB/c 小鼠腹腔内，得到腹水，从该腹水中纯化 PM-1 的方法，或者用下述方法，将该杂交瘤在适当的培养基，例如：含有 10% 胎牛血清、5% BM-Condimed H1 (Boehringer Mannheim 制造)的 RPMI1640 培养基、杂交瘤 SFM 培养基 (GIBCO-BRL 制造)、PFHM-II 培养基 (GIBCO-BRL 制造) 等中培养，从其上清中纯化 PM-1 抗体。

在本发明中，作为单克隆抗体，可以使用从杂交瘤中克隆抗体基因，重组到适当的载体中，将其导入到宿主中，用基因重组技术产生的重组型抗体(例如：参见 Borrebaeck C.A.K. and Larrick J.W. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990)。

具体而言，从产生目的的抗体的细胞，例如：杂交瘤细胞中分离编码抗体可变(V)区域的 mRNA。用公知的方法分离 mRNA，如：用豚超速离心法(Chirgwin, J.M 等人, Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC 法(Chomczynski.P. 等人, Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159)等制备总 RNA，使用 mRNA

Purification Kit (Pharmacia 制造) 等制备 mRNA。还有, 可以用 QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia 制造) 直接制备 mRNA。

用逆转录酶从得到的 mRNA 合成抗体 V 区域的 cDNA。可以用 AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit 等合成 cDNA。还有, 可以使用 5' -Ampli FINDER RACE Kit (Clontech 制造) 以及采用 PCR 的 5' -RACE 法 (Frohman, M. A. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. 等人, Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2929-2932) 进行 cDNA 的合成和扩增。从得到的 PCR 产物中纯化目的 DNA 片断, 与载体 DNA 连接。还有, 由此制备重组载体, 导入到大肠杆菌等中, 选择克隆, 制备目的重组载体。用公知的方法如: 双脱氧法确认目的 DNA 的碱基序列。

如果得到编码目的的抗体 V 区域的 DNA, 将其与编码目的抗体恒定区域 (C 区域) 的 DNA 连接, 重组到表达载体中。另外也可以将编码抗体 V 区域的 DNA 和含有抗体 C 区域的表达载体重组。

在本发明中使用的抗体制造中, 为了表达后述的抗体基因, 将表达控制区域, 例如: 启动子、增强子的控制元件重组到表达载体中。然后, 将该表达载体转化到宿主细胞中, 使抗体表达。

在本发明中, 可以使用以降低其对人的异种抗原性为目的的人为地改变的基因重组型抗体, 例如: 嵌和 (Chimeric) 抗体、人源化 (Humanized) 抗体、人抗体。可以用已知的方法制造这些改型抗体。

将如前述所示得到的编码抗体 V 区域的 DNA 和编码人抗体 C 区域的 DNA 连接, 将其重组到表达载体中, 导入到宿主中, 使之产生得到嵌和抗体 (参见欧洲专利申请公开号 EP 125023、国际专利申请公开号 WO 92/19759)。用该已知的方法, 可以得到本发明中有用的嵌和抗体。

例如: 含有编码嵌和抗体 PM-1 抗体的 L 链以及 H 链的 V 区载的 DNA 的质粒, 分别命名为 pPM-k3 和 pPM-h1, 将具有该质粒的大肠杆菌在 1991 年 2 月 12 日根据布达佩斯条约分别作为 NCIMB40366 和 NCIMB40362 在国立工业和海洋微生物保藏有限公司 (大不列颠和北爱

尔兰联合王国 Scotland Aberdeen AB2 1RY Macher Drive 大街 23) 进行国际寄存。

人源化抗体又称为重构 (reshaped) 人抗体, 是将人以外的哺乳动物, 例如: 小鼠抗体的互补决定区域 (CDR) 移植到人抗体的互补决定区域中。其常规的基因重组方法也是已知的 (参见欧洲专利申请公开号 EP 125023、国际专利申请公开号 WO 92/19759)。

具体而言, 为了使小鼠抗体的 CDR 和人抗体的框架区域 (FR: Framework region) 连接, 使所设计的 DNA 序列的末端部分含有交叠 (overlap), 以 PCR 法用制备成这样的多个寡核苷酸进行合成, 将得到的 DNA 和编码人抗体 C 区域的 DNA 连接, 然后, 重组到表达载体中, 将其导入到宿主中使之产生目的的抗体 (参见欧洲专利申请公开号 EP 239400, 国际专利申请公开号 WO 92/19759)。

需要选择互补决定区域能形成良好的抗原结合部位的通过 CDR 连接的人抗体的 FR。根据需要, 为了使重构人抗体的互补决定区域形成适合的抗原结合部位, 也可以置换抗体可变区域的框架区域的氨基酸 (Sato, K. 等人, Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

嵌和抗体、人源化抗体使用人抗体 C 区域。作为人抗体 C 区域, 举例如 C_V , 可以使用如: C_V1 、 C_V2 、 C_V3 或 C_V4 。还有, 为了改善抗体或其产生的稳定性, 也可以修饰人抗体 C 区域。

嵌和抗体由来自人以外的哺乳动物的抗体可变区域和来自人抗体的 C 区域构成, 人源化抗体由来自人以外哺乳动物的抗体的互补决定区域和来自人抗体的框架区域以及 C 区域构成, 因为在人体中抗原性低, 所以作为本发明中使用的抗体。

作为在本发明中使用的人源化抗体的优选例, 可举人源化 PM-1 抗体 (参见国际专利申请公开号 WO 92/19759)。

还有, 作为人抗体的取得方法, 除了前面所述的方法之外, 已知有用人抗体库, 通过筛选得到人抗体的技术。例如: 人抗体的可变区域作为单链抗体 (scFv), 通过噬菌体展示法, 使之表达在噬菌体的表面, 选择和抗原结合的噬菌体。解析选择得到的噬菌体的基因,

确定编码与抗原结合的人抗体的可变区域的 DNA 序列。如果明确了与抗原结合的 scFv 的 DNA 序列,将该序列制备成适当的表达载体,可以得到人抗体。这种方法是公知的方法,可以参见 WO 92/01047、WO 92/20791、WO 93/06213、WO 93/11236、WO 93/19172、WO 95/01438、WO 95/15388。

如上所述构建的抗体基因,可以通过公知的方法使之表达,得到抗体。当是哺乳类细胞时,可以用功能性地结合了常用的有用的启动子、要表达的抗体基因、其 3' 侧下游的 polyA 信号的 DNA 或含有上述序列的载体进行表达。例如:作为启动子/增强子,可以列举:人巨细胞病毒近早期启动子/增强子(human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer)。

此外,在本发明中使用的其它抗体表达中能够使用的启动子/增强子可以是反转录病毒、多面体病毒、腺病毒、猴空泡病毒 40 (SV40) 等病毒启动子/增强子或人延长因子 1 α (HEF1 α) 等来自哺乳类动物的启动子/增强子。

例如:使用 SV40 启动子/增强子时,按照 Mulligan 等人的方法(Mulligan. R. C. 等人, Nature (1979) 277, 108-114), 还有,在使用 HEF1 α 启动子/增强子时,按照 Mizushima 等人的方法(Mizushima, S. and Nagata, S. Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322 容易实施。

大肠杆菌时,可将常用的有用的启动子、使抗体分泌的信号序列、所表达的抗体基因功能性地结合,并使之表达。例如:作为启动子,可以使用 LacZ 启动子、araB 启动子。使用 lacZ 启动子时,按照 Ward 等人的方法(Ward, E. S. 等人, Nature (1989) 341, 544-546; Ward, E. S. 等人, FASEB J. (1992) 6, 2422-2427), 使用 araB 启动子时,按照 Better 等人的方法(Better, M. 等人, Science (1988) 240, 1041-1043)。

作为用于抗体分泌的信号序列,在大肠杆菌的周质腔中产生时,可以使用 pelB 信号序列(Lei, S.P. 等人, J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383)。分离在周质腔中产生的抗体

后,可以适当地使抗体的结构折叠(refold)(例如:参见 W096/30394)。

作为复制起点,可以使用 SV40、多面体病毒、腺病毒、牛乳头瘤病毒(BPV)等来源的物质。还有,为了使在宿主细胞系中的基因拷贝数扩增,表达载体可以含有磷酸转移酶(APH)基因、胸苷激酶(TK)基因、大肠杆菌黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(Ecogpt)基因、二氢叶酸还原酶(dhfr)基因等作为选择性标记。

为了制造在本发明中使用的抗体,可以使用任意的生产系统。用于抗体制造的生产系统有体外(in vitro)和体内(in vivo)生产系统。作为体外的生产系统,可以使用真核细胞的生产系统或使用原核细胞的生产系统。

使用真核细胞时,可用动物细胞、植物细胞或真菌细胞作为生产系统。作为动物细胞已知有(1)哺乳类细胞,例如:CHO、COS、骨髓瘤、BHK(baby hamster kidney)、HeLa、Vero 等,(2)两栖类细胞,例如:非洲爪蟾卵母细胞或(3)昆虫细胞,例如:sf9、sf21、Tn5 等。作为植物细胞已知有来自烟草(Nicotiana tabacum)来源的细胞,可以将其力尔培养。作为真菌细胞,酵母,已知啤酒酵母(Saccharomyces)属,例如:酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、丝状菌,例如:曲霉(Aspergillus)属、例如:黑曲霉(Aspergillus niger)等。

使用原核细胞时,有细菌细胞的生产系统。作为细菌细胞,已知有大肠杆菌(E. coli)、枯草杆菌。

将目的的抗体基因通过转化导入到这些细胞中,通过在体外培养转化的细胞得到抗体。按照公知的方法进行培养。例如:可以用 DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM 作为培养液,也可以并用胎牛血清(FCS)等血清添加液。还有,也可以通过将导入抗体基因的细胞转移到动物的腹腔中,在体内生产抗体。

一方面,作为体内生产系统,例如:使用动物细胞的生产系统或使用植物的生产系统。使用动物时,可使用哺乳类动物、昆虫的生产系统等。

作为哺乳类动物，可以使用山羊、猪、羊、小鼠、牛等 (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993)。还有，作为昆虫，可以使用蚕。使用植物时，例如可以使用烟草。

将抗体基因导入到这些动物或植物中，使之在动物或植物的体内产生抗体，回收。例如：将抗体基因插入到编码如山羊 β 酪蛋白这种在乳汁中固有性产生的蛋白质中，作为融合基因进行制备。将含有插入的抗体基因的融合基因 DNA 片断注入到山羊的胚中，将该胚导入到雌性山羊体内。从接受胚的山羊生出的转基因山羊或其后代所产生的乳汁得到目的的抗体。为了增加转基因山羊所产生的含抗体的乳汁量，也可以对转基因山羊使用适当的激素 (Ebert, K.M. 等人, Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

此外，使用蚕时，将插入目的的抗体基因的核型多角体病毒来感染蚕，从该蚕的体液中得到希望的抗体 (Maeda, S. 等人, Nature (1985) 315, 592-594)。还有，使用烟草时，将目的的抗体基因插入到用于植物表达的载体如：pMON 530 中，将该载体导入如 *Agrobacterium tumefaciens* 的农杆菌中。用该农杆菌感染烟草，如：*Nicotiana tabacum*，从该烟草的叶子得到希望的抗体 (Julian, K.-C. Ma 等人, Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

在如上所述的体外或体内的生产系统中生产抗体时，也可以将编码抗体重链 (H 链) 或轻链 (L 链) 的 DNA 分别重组到表达载体中，使之同时转化到宿主中，或将编码 H 链和 L 链的 DNA 重组到单独的表达载体中，使之转化到宿主中 (参见国际专利申请公开号 WO 94/11523)。

在本发明中使用的抗体，只要适合本发明，也可以是抗体的片断或其修饰物。例如：作为抗体片断，可列举 Fab、 $F(ab')_2$ 、Fv 或 H 链和 L 链的 Fv 用适当的连接链 (linker) 连接的单链 Fv (scFv)。

具体而言，将抗体用酶，例如：木瓜蛋白酶、胃蛋白酶处理产生抗体片断，或构建编码这些抗体片断的基因，将其导入的到表达载体后，在适当的宿主中表达 (参见例如：Co, M. S. 等人, J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology

(1989) 178, 476-496、Pluekthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496、Lamoyi, E., Methods in enzymology (1989) 121, 652-663、Rousseaux, J. 等人, Methods in Enzymology (1989) 121, 663-66、Bird, R. E. 等人, TIBTECH (1991) 9, 132-137)。

可以通过连接抗体的 H 链的 V 区域和 L 链的 V 区域得到 scFv。在该 scFv 中, H 链 V 区域和 L 链 V 区域的连接链优选通过连接肽链连接 (Huston, J. S. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1988) 85, 5879-5883)。scFv 中的 H 链 V 区域和 L 链 V 区域可以使用任何来源的上述记载的抗体。作为 V 区域的连接肽, 例如: 用有 12-19 个氨基酸残基组成的任意的单链肽。

以编码上述抗体的 H 链、或 H 链 V 区域的 DNA 以及编码 L 链或 L 链 V 区域的 DNA 为模板, 用特定的两端的引物对通过 PCR 法扩增这些序列中编码希望的氨基酸序列的 DNA 部分, 然后, 组合特定的能将编码连接肽部分的 DNA 和其两端的 H 链、L 链连接的引物对, 通过扩增得到编码 scFv 的 DNA。

还有, 一旦制备编码 scFv 的 DNA, 可以按照常规方法制备含有该 DNA 的表达载体以及转化该表达载体的宿主, 按照常规方法用该宿主得到 scFv。

可以用和上述同样的方法得到这些抗体片断的基因, 并使之表达, 在宿主中生产。本发明中所说的“抗体”包括这些抗体的片断。

作为抗体的修饰物, 可以使用与聚乙二醇 (PEG) 等各种分子结合的抗体。本发明中所说的“抗体”中包括这些抗体修饰物。可以对得到的抗体实施化学性修饰, 由此得到这种抗体修饰物。这些方法是在该领域内已经建立的方法。

可以从细胞内外、宿主中分离直至纯化到均匀为止上述产生、表达的抗体。本发明中所用的抗体的分离、纯化可以用亲和层析。在亲和层析中所用的柱, 例如: 蛋白 A 柱、蛋白 G 柱。蛋白 A 柱所用的载体, 例如: HyperD、POROS、Sephacrose F. F. 等。此外, 也可使用常规

蛋白质中使用的分离、纯化方法，没有任何限定。

例如：也可以适当选择、组合上述亲和层析以外的层析、过滤、超滤、盐析、透析等，分离、纯化本发明中所使用的抗体。作为层析，例如：离子交换层析、疏水层析、凝胶过滤等。这些层析还适用 HPLC (High performance liquid chromatography)。此外还可以使用逆相 HPLC (reverse phase HPLC)。

可以通过吸光度的测定或 ELISA 等对上述得到的抗体的浓度进行测定。即，用吸光度进行测定时，用 PBS (-) 适当稀释后，测定 280nm 的吸光度，按照 1mg/ml 为 1.350D 进行计算。用 ELISA 时，可如下测定。即，将以 0.1M 重碳酸缓冲液 (pH9.6) 稀释到 1 μ g/ml 的山羊抗人 IgG (TAG 制造) 按照 100 μ l 加入 96 孔板 (Nunc 制造) 中，4℃ 温育 1 夜，固定抗体。封闭后，添加 100 μ l 适当稀释的本发明中使用的抗体或含抗体样本或标准品的人 IgG (CAPPEL 制造)，室温温育 1 小时。

洗涤后，加入 5000 倍稀释后的碱性磷酸酶标记的抗人 IgG (BIO SOURCE 制造) 100 μ l，在室温温育 1 小时。洗涤后，添加基质溶液温育后，用 MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 制造) 测定 405nm 处的吸光度，计算目的的抗体的浓度。

在本发明中使用的 IL-6 突变体是具有和 IL-6 受体的结合活性，并且不能传递 IL-6 的生物学活性的物质。即，IL-6 突变体和 IL-6 竞争性地结合 IL-6 受体，因为不传递 IL-6 的生物学活性，所以阻断了 IL-6 造成的信号传递。

通过置换 IL-6 的氨基酸序列中的氨基酸残基，导入变异，制备 IL-6 突变体。不考虑作为 IL-6 突变体的最初的 IL-6 的来源，如果考虑到抗原性等，优选人 IL-6。

具体而言，IL-6 的突变体是用公知的分子建模程序例如：WHATIF (Vriend 等人, J.Mol.Graphics (1990) 8, 52-56) 对 IL-6 氨基酸序列的二级结构进行预测，然后评价所置换氨基酸对整体产生的影响，确定适当的置换氨基酸残基后，以含有编码人 IL-6 基因的碱基序列的载体为模板，由常规的 PCR 法导入可实现氨基酸的置换的突变，得到

编码 IL-6 突变体的基因。根据需要, 将其重组到适当的表达载体中, 按照上述重组抗体的表达、生产以及纯化方法, 得到 IL-6 突变体。

IL-6 突变体的具体例已经公布于 Brakenhoff 等人, J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93、以及 Savino 等人, EMBO J. (1994) 13, 1357-1367、WO 96/18648、WO 96/17869。

在本发明中使用的 IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽是分别具有和 IL-6 受体或 IL-6 的结合活性, 并且不传递 IL-6 的生物学活性的物质。即, IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽可以结合 IL-6 受体或 IL-6, 通过捕捉这些物质特异性地阻碍 IL-6 向 IL-6 受体的结合。其结果, 因为不传递 IL-6 的生物学活性, 阻断了 IL-6 的信号传递。

IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽, 是由 IL-6 或 IL-6 受体的氨基酸序列中的 IL-6 和 IL-6 受体结合区域的一部分或全部氨基酸序列所组成的肽。这种肽通常由 10~80、优选 20~50、更优选 30~40 个氨基酸残基所组成。

IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽特定在 IL-6 或 IL-6 受体氨基酸序列上的 IL-6 和 IL-6 受体结合的区域, 按照通常所知的方法例如: 基因工程学方法或肽合成法制备该区域的部分或全部氨基酸序列。

在用基因工程方法制备 IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽时, 可以将编码所望的肽的 DNA 序列重组到表达载体中, 按照表达、生产、纯化上述重组抗体的方法得到。

在用肽合成方法制造 IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽时, 可以在肽合成中, 用例如: 固相合成法或液相合成法。

具体而言, 可以按照“续药品开发”第 14 卷肽合成、监修矢岛治明, 广川书店 1991 年记载的方法进行。作为固相合成法, 例如: 在有机溶剂不溶性载体上结合希望合成的肽的 C 末端所对应的氨基酸, 将用适当的保护基团保护 α -氨基酸基团以及侧链官能基团的氨基酸按照从 C 末端到 N 末端的方向依次和每一个基团进行缩合反应, 该反应和使在树脂上结合的氨基酸或肽的 α -氨基酸基团的该保护基团脱离的反应交替反复进行, 使肽链延长。固相肽合成法所用的保护基团

的种类在 Boc 法和 Fmoc 法中有很大不同。

这样合成目的的肽后，进行脱保护反应以及肽链从载体上的切断反应。在与肽链的切断反应中，通常可以使用 Boc 法中氟化氢或三氟甲磺酸或 Fmoc 法中的 TFA。在 Boc 法中，例如：在氟化氢中，在甲氧基苯存在的情况下处理上述保护肽树脂。然后，回收脱去保护基团的并从载体上的切断的肽。通过将其冻干，得到粗品肽。另一方面，在 Fmoc 法中，例如：在 TFA 中，用和上述同样的操作进行脱保护反应以及肽链与载体的切断反应。

所得到的粗品肽可以通过 HPLC 进行分离、纯化。可以在洗脱时，使用蛋白质纯化中通常使用的水-乙腈类溶剂，在最适条件下进行该操作。分别收取相应的得到的层析流出峰对应的组分，将其冻干。通过质谱分析对这样得到纯化的肽组分进行分子量解析、氨基酸组成分析或氨基酸序列分析等。

IL-6 部分肽和 IL-6 受体部分肽的具体例子已经公布于特开平 2-188600、特开平 7-324097、特开平 8-311098 以及美国专利公报 US 5210075。

可以用通常采用的方法评价在本发明中使用的 IL-6 拮抗剂的 IL-6 信号传导阻断活性。具体而言，培养 IL-6 依赖性人骨髓瘤株 (S6B45, KPMM2)、人 T 细胞淋巴瘤细胞株 KT3 或 IL-6 依赖性细胞 MH60.BSF2，向其中加入 IL-6，同时使之与 IL-6 拮抗剂共存，由此测定 IL-6 依赖性细胞对 ^3H -胸腺嘧啶的摄取。还有，培养 IL-6 受体表达细胞 U266，添加 ^{125}I 标记的 IL-6，同时添加 IL-6 拮抗剂，由此测定 IL-6 受体表达细胞上结合的 ^{125}I 标记 IL-6。在上述的分析体系中，在存在 IL-6 拮抗剂的组中加入不含 IL-6 拮抗剂的阴性对照组，比较二者得到的结果，评价 IL-6 拮抗剂的 IL-6 阻断活性。

如后述的实施例所示，通过给予抗 IL-6 受体抗体，在脊髓损伤患者中确认了治疗效果。在本发明中的治疗对象是哺乳动物。治疗对象的哺乳动物优选是人。

本发明的脊髓损伤治疗剂，可以经口或非经口、全身或局部给药。

例如：可以选择点滴等静脉内注射、肌肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、栓、肠内注射、经口性肠溶剂等。可以根据患者的年龄、症状来选择适当的给药方法。

每一次对应于每 1kg 体重，从 0.01mg ~ 100mg 的范围内选择有效给药量。或每个患者 1 ~ 1000mg，优选 5 ~ 50mg 的给药量。优选的给药量、给药方法，例如：用抗 IL-6 受体抗体时，血中完全存在抗体的程度的量为有效给药量，作为具体例，每 1kg 体重 1 个月（4 周）从 0.5mg ~ 40mg，优选将 1mg ~ 20mg 分为 1 次 ~ 数次给药。例如：按照 2 次/周、1 次/周、1 次/2 周、1 次/4 周等给药方案，用静脉内注射、皮下注射等方法作为给药方法。给药方案可以边观察病情以及观察血液检查值的动向，边将给药间隔从 2 次/周或 1 次/周延长到 1 次/2 周、1 次/3 周、1 次/4 周等加以调整。

本发明的脊髓损伤治疗剂，按照给药途径可含有医药上许可的载体或添加物。作为这种载体和添加物的例子，可列举水、药物可容许的有机溶剂、胶原、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、羧基乙烯共聚物、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、藻酸钠、水溶性糊精、羧甲基淀粉钠、果胶、甲基纤维素、乙基纤维素、黄原胶、阿拉伯胶、酪蛋白、明胶、琼脂、双甘油、丙二醇、聚乙二醇、凡士林、石蜡、硬脂酰醇、硬脂酸、人血清白蛋白（HSA）、甘露糖醇、山梨糖醇、乳糖、作为医药添加物所允许的表面活性剂等。所使用的添加物，相应于剂型，可以从上述中适当选择或组合。添加物不限于这些物质。

实施例

下面用实施例和参考例对本发明进行具体说明，本发明不限于这些。

实施例 1

材料和方法

动物：

所有实验组中都使用成体（18 ~ 22g）雌性 C57BL/6J 小鼠。

脊髓损伤:

用氯胺酮 (100mg/kg) 和二甲代苯胺 (キシラジン) (10mg/kg) 通过腹腔内注射, 麻醉雌性小鼠。剃除背部的毛, 切开 20mm 的中线皮肤, 然后露出脊柱。使背面肌肉向侧面分离, 将脊柱胸部区域露出后, 露出 T7-T13 椎骨的棘突起。在第 9 胸椎水平切除锥弓, 注意不损伤硬膜, 同时使脊索露出。在 T7 和 T11 棘突起以及韧带上用钳子和夹子固定脊柱, 然后使沉在底座上的身体挺起来后, 用 NYU Impactor 造成脊髓损伤 (SCI)。将 3g 的重量 (直径 1.2mm 的端部) 从 25mm 的高度落向 T9 水平的脊髓。层状闭合肌肉和切开部分, 并且将动物放在温度调节室内直至使动物再次建立热调节。由手动膀胱压出使之排尿直至建立自然排尿为止, 每天进行 2 次。

实验计划和大鼠抗小鼠 IL-6 受体 mAb (MR16-1) 的注入:

损伤后, 按照每 1kg 体重 100 μ g 的 MR16-1 剂量进行单次腹腔内注入 (MR16-1 组, n = 15), 对照组腹腔内注入等量的大鼠 Ig-G (对照组, n = 15)。从为了标记分裂细胞而进行 BrdU (50mg/kg 体重) 腹腔内注入手术之日起进行 2 周关于两组的组织学以及免疫学的分析。

运动功能评价:

本发明人用 3 种不同的实验, 对受到损伤后的运动功能的恢复性进行评价。功能评价持续到损伤后的第 6 周。

下肢运动功能评价: 为了评价 SCI 的功能效果, 本发明人用通常广泛使用的 Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) 分值进行了运动功能评价。3 个不同的检查员经过 4 分钟对每个动物进行双盲评价, 对于每个动物的下肢功能给予确定的评分 (0 ~ 21)。所有实验记录到录像带上。

SCANET: SCANET 是由配备有红外线传感装置的笼子组成的自动动物移动分析系统, 用该系统监视小的 (M1) 和大的 (M2) 水平移动和垂直移动 (RG), 即起立的次数, 对一定时间内动物自发进行的运动量进行定量。特别是据说 RG 评分和 BBB 尺度评分间存在统计学的正的相关关系。

转棒仪旋转 (Rota rod treadmill): 将小鼠置于有塑料棒组成的旋转棒装置上, 通过强制步行对四肢协调运动进行评价。在 5、10 以及 15rpm 的速度的旋转棒上放置小鼠, 在 120 秒内监视直至落下的潜伏时间。分别从平均值和最大值对协调运动功能进行评价。

免疫组织化学:

为了组织学的研究, 通过吸入二乙醚麻醉小鼠, 经心脏循环流动 4% 的仲甲醛, 固定。摘出脊髓, 在室温下, 用 4% 的仲甲醛进行固定数小时。将组织样本在 10% 蔗糖中于 4℃ 下浸泡 24 小时, 置于 30% 的蔗糖中 48 小时, 在 OTC 复合物中进行包埋。将包埋组织在液氮中冷冻, 在 -80℃ 下保存。冷冻切片在切片机按照纵向切断、横向切断制成 20 微米的厚度, 用 HE 染色或免疫荧光进行双重染色。

在免疫荧光双重标记实验中, 将脊髓切片在 0.01M 的 PBS (pH 7.4) 中、0.03% Triton X-100 以及 10% 正常山羊血清封闭 30 分钟。用兔抗-GFAP 抗体、大鼠抗-Brd-U 抗体以及人抗 Hu 抗体 (作为神经元标记物) 作为一抗, 在 4℃ 温育一晚。使用 FITC-conjugated 的兔 IgG 抗体以及 Texas Red-conjugated 大鼠抗体作为二抗进行双重染色。洗涤载片, 浸润-固定, 在荧光显微镜下分析。

Western blot 分析:

自造成损伤 12 小时后 (每组 $n=4$), 切除 8mm 的脊髓片断 (从外伤中心开始, 向吻侧 4mm, 向尾侧 4mm), 在含有蛋白酶抑制剂的 MAPK 溶菌缓冲液中均化, 并且用超声波处理后, 在 15000rpm 下离心分离, 用 SDS-PAGE 分离每个样本上清液的蛋白质, 然后通过电泳印记到聚偏二氟乙烯膜上。将膜在含有 5% 脱脂奶粉、150mM 的 NaCl 以及 0.05% Tween 20 (pH 7.5) 的 TBST 缓冲液中在室温下封端 (blocking) 1 小时后, 用多克隆兔抗 stat3 抗体或兔抗磷酸化 stat3 抗体或兔抗 IL-6R α 抗体中的任何一个抗体作为一抗, 然后用 HRP-conjugated 兔 IgG 抗体作为二抗, 共同温育。通过自动成像仪, 制成像片, 用 α -imager 定量。

结果:

(1) 下肢运动功能评价

给予抗 IL-6 受体抗体 (MR16) 的脊髓损伤的 15 只小鼠和未给予上述抗体的脊髓损伤的 15 只小鼠 (对照) 相比, 在图 1 中以图表示 BBB 分值的平均值。可以确定脊髓损伤后, 给予 MR16 抗体的小鼠组在 7 天后运动的恢复良好, 在 5 周以及 6 周时具有有意义的差。

(2) SCANET

对于给予抗 IL-6 受体抗体 (MR16) 的脊髓损伤的 15 只小鼠和未给予上述抗体的脊髓损伤的 15 只小鼠 (对照), 水平运动和起立的次数的比较结果是水平运动没有有意义的差, 在给予抗 IL-6 受体抗体 (MR16) 的脊髓损伤的 15 只小鼠中有 12 只有起立运动, 另一方面, 在未给予抗体的脊髓损伤的 15 只小鼠 (对照) 中只有 3 只。该差在 Fisher' s exact probability test 中 $p < 0.05$, 是有意义的。

(3) 转棒仪旋转

对于给予抗 IL-6 受体抗体 (MR16) 的脊髓损伤的 15 只小鼠和未给予上述抗体的脊髓损伤的 15 只小鼠 (对照), 用上述方法进行实验时, 在棒的旋转数为 10rpm (每 1 分钟旋转数为 10 转) 和 15rpm 时未看到有意义的差, 在 5rpm 时, 如图 2 所示, 脊髓损伤后 35 天以后, 给予抗 IL-6 受体抗体 (MR16) 的脊髓损伤的小鼠的恢复和未给予上述抗体的脊髓损伤的小鼠 (对照) 相比, 有意义地 ($p < 0.05$) 高。

(4) 免疫组织化学观察

即使在成体脊髓内存在内源性的神经干细胞, 也不会产生该细胞分化所形成的骨髓修复。认为其理由是在损伤脊髓内, 内源性神经干细胞分化成胶质细胞, 进一步分化成星形胶质细胞, 所以不能向神经元类细胞分化。通过上述的方法, 对于给予抗 IL-6 受体抗体 (MR16) 的脊髓损伤的 4 只小鼠的损伤部分的脊髓和未给予上述抗体 (MR16) 的脊髓损伤的 4 只小鼠 (对照) 的损伤部分的脊髓, 用抗 GFAP 抗体和抗 BrDU 抗体通过免疫荧光法计算反应性星形胶质细胞的形成, 如图 3 所示, 通过给予上述抗体, 反应性星形胶质细胞的形成有意义地 ($p < 0.01$) 减少了。

(5) Western blot 分析

对于脊髓损伤的 4 只小鼠和脊髓损伤的 4 只小鼠（对照）在脊髓损伤后第 12 小时，通过 Western blot 法调查 IL-6 受体的表达。结果如图 4 所示。只有在脊髓损伤的小鼠中，确定 IL-6 受体的表达。还有，如图 5 所示，通过给予 MR16 抑制了磷酸化 STAT3 的量，显示出腹腔内给予的 MR16 在脊髓发挥了作用。

综上所述，可以确认 IL-6 受体的拮抗剂能促进脊髓损伤的修复。

参考例 1. 人可溶性 IL-6 受体的制备

用按照 Yamasaki 等人的方法(Yamasaki, K. 等人, Science(1988) 241, 825-828)得到的含有编码 IL-6 受体的 cDNA 的质粒 pBSF2R. 236, 通过 PCR 法制备可溶性 IL-6 受体。用限制性酶 SphI 消化质粒 pBSF2R. 236, 得到 IL-6 受体 cDNA, 将其插入到 mp18(Amersham 制造)。为了向 IL-6 受体 cDNA 中导入终止密码子, 用设计合成的寡聚引物, 通过突变引入系统(Amersham 制造)用 PCR 向 IL-6 受体 cDNA 中导入突变。通过该操作在氨基酸 345 的位置上导入终止密码子, 得到编码可溶性 IL-6 受体的 cDNA。

为了在 CHO 细胞中表达可溶性 IL-6 受体 cDNA, 使之和质粒 pSV (Pharmacia 制造) 连接, 得到质粒 pSVL344。向含有 dhfr 的 cDNA 的质粒 pECEdhfr 中插入用 Hind III-Sal I 切断的可溶性 IL-6 受体 cDNA, 得到 CHO 细胞表达质粒 pECEdhfr344。

将 10 μ g 的质粒 pECEdhfr344 通过磷酸钙沉淀法 (Chen, C. 等人, Mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745-2751) 转染到 dhfr-CHO 细胞 mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745-2751) 使细胞株 DXB-11 (Urlaub, G. 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216 - 4220) 转染。将转染的 CHO 细胞在含有 1mM 谷氨酰胺、10% 透析 FCS、100U/ml 的青霉素和 100 μ g/ml 链霉素的不含核苷的 α MEM 的选择培养液中培养 3 周。

用极限稀释法筛选选择的 CHO 细胞, 得到单一的 CHO 细胞克隆。在甲基喋呤浓度 20nM ~ 200nM 的条件下扩增该 CHO 细胞克隆, 得到人

可溶性 IL-6 受体产生 CHO 细胞株 5E27。将 CHO 细胞株 5E27 在含有 FBS のイシコーブ改性ダルベコ培养液 (IMDM, Gibco 制造) 中进行培养。回收培养上清, 用 ELISA 测定培养上清中的可溶性 IL-6 受体的浓度。其结果, 确认在培养上清中存在可溶性 IL-6 受体。

参考例 2. 抗人 IL-6 抗体的制备

用 10 μ g 的重组型 IL-6 (Hirano, T. 等人, Immunol. Lett. (1988) 17, 41) 和完全弗氏佐剂一起, 免疫 BALB/c 小鼠, 直到能在血清中检测到抗 IL-6 抗体为止, 持续每周进行一次免疫。从局部淋巴结摘出免疫细胞, 用聚乙二醇 1500 使之和骨髓瘤细胞株 P3U1 融合。用 HAT 培养液按照 Oi 等人的方法 (Selective Methods in Cellular Immunology, W. H. freeman and Co. San Francisco, 351, 1980) 选择杂交瘤, 建立产生抗人 IL-6 抗体的杂交瘤。

产生抗人 IL-6 抗体的杂交瘤按照下述方法进行 IL-6 结合分析。即, 向柔软的聚乙烯制成的 96 孔微孔板 (Dynatech Laboratories 公司制造, Alexandria, VA) 加入 100 μ l 的在 0.1M 的 carbonate-hydrogen carbonate 缓冲液 (pH 9.6) 中的山羊抗小鼠 Ig (10 μ l/ml, Cooper Biomedical 公司制造, Malvern, PA), 4 $^{\circ}$ C 包被一晚。然后用 100 μ l 含有 1% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 PBS 在室温下处理平板 2 小时。

将其用 PBS 洗涤后, 每孔中加入 100 μ l 杂交瘤培养上清, 在 4 $^{\circ}$ C 温育 1 晚。洗涤平板, 向各孔中添加 125 I 标记的重组 IL-6, 使之达到 2000cpm/0.5ng/well。洗涤后, 用 γ 计数器 (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA) 测定各孔的放射活性。通过 IL-6 结合分析确定在 216 个杂交瘤克隆中有 32 个杂交瘤克隆是阳性的。在这些克隆中, 最后得到了稳定的 MH166.BSF2。该杂交瘤产生的抗 IL-6 抗体 MH166 具有 IgG1 κ 的亚型。

然后, 用 IL-6 依赖性的小鼠杂交瘤克隆 MH60.BSF2, 对 MH166 抗体造成的和杂交瘤的增殖相关的中和活性进行调查。按照 1×10^4 /200 μ l/孔分别注入 MH60.BSF2 细胞, 向其中加入含 MH166 抗体的样本, 培养 48 小时, 添加 0.5 μ Ci/孔的 3 H-胸腺嘧啶 (New England

Nuclear, Boston, MA) 后, 再继续培养 6 小时。将细胞置于感光胶片上, 用自动曝光 (Labo Mash Sciene Co. Tokyo, Japan) 处理, 用兔抗 IL-6 抗体作为对照。

其结果, MH166 抗体以剂量性依赖地阻断了 IL-6 所诱导的 MH60. BSF2 细胞的 ^3H -胸腺嘧啶的摄取。由此, 证明 MH166 抗体能够中和 IL-6 的活性。

参考例 3. 抗人 IL-6 受体抗体的制备

将按照 Hirata 等人的方法 (Hirata, Y. 等人, J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906) 制成的抗 IL-6 受体抗体 MT18 和 CNBr 活化的琼脂糖 4B (Pharmacia Fine Chemicals 制造) 按照添加配方使之结合, 纯化 IL-6 受体 (Yamasaki, K. 等人, Science (1988) 241, 825-828)。用 1% 毛地黄皂苷 (ジギトニン) (Wako Chemicals 制造) 溶化人骨髓瘤细胞株 U266, 用含有 1mM p-パラアミノフェニルメタンスルフォニルオライドハイドロクロリド (Wako Chemicals 制) (毛地黄皂苷缓冲液) 溶化 10mM 三乙醇胺 (pH7.8) 以及 0.15M NaCl。使之与和琼脂糖 4B 珠结合的 MT18 抗体混合, 之后, 用毛地黄皂苷缓冲液洗涤珠 6 次, 作为用于免疫的部分纯化的 IL-6 受体。

用从 3×10^9 个的 U266 细胞中得到的上述部分纯化的 IL-6 受体每隔 10 天免疫 BALB/c 小鼠, 共 4 次, 然后按照常规方法制成杂交瘤。按照下述的方法对成长阳性孔中的杂交瘤培养上清和 IL-6 受体的结合活性进行调查。用 ^{35}S 甲硫氨酸 (2.5mCi) 标记 5×10^7 个的 U266 细胞, 用上述毛地黄皂苷缓冲液溶化。将溶化的 U266 细胞和与 0.04ml 容量的琼脂糖 4B 珠结合的 MT18 抗体混合, 然后, 用毛地黄皂苷缓冲液洗涤 6 次, 用 0.25ml 的毛地黄皂苷缓冲液 (pH3.4) 洗脱 ^{35}S 甲硫氨酸标记的 IL-6 受体, 用 0.025ml 的 1M Tris (pH7.4) 中和。

将 0.05ml 的杂交瘤培养上清和 0.01ml 的 Protein G 琼脂糖 (Pharmacia 制造) 混合。洗涤后, 和用琼脂糖制备的 0.005ml 的 ^{35}S 标记的 IL-6 受体溶液一起温育。用 SDS-PAGE 分析免疫沉淀物质, 对和 IL-6 受体反应的杂交瘤上清进行调查。其结果, 建立反应阳性的杂

交瘤 PM-1 (FERM BP-2998)。由杂交瘤 PM-1 产生的抗体为 IgG1 κ 亚型。

用人骨髓瘤细胞株 U266 调查杂交瘤 PM-1 产生抗体的对人 IL-6 受体的 IL-6 的结合阻断活性。用大肠杆菌制备人重组型 IL-6 (Hirano, T. 等人, Immunol. Lett. (1988) 17, 41-45)、用ボルトン-ハンター试剂 (New England Nuclear, Boston, MA) 进行 ^{125}I 标记 (Taga, T. 等人, J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981)。

将 4×10^5 个的 U266 细胞和 70% (v/v) 杂交瘤 PM-1 的培养上清以及 14000cpm 的 ^{125}I 标记的 IL-6 一起培养 1 小时。将 70 μl 的样本置于 400 μl 的マイクロフュージ聚乙烯管的 300 μl 的 FCS 上、离心后测定细胞上的放射活性。

其结果,明确了杂交瘤 PM-1 产生的抗体阻断了 IL-6 的 IL-6 受体的结合。

参考例 4. 抗小鼠 IL-6 受体抗体的制备

按照 Saito, T. 等人, J. Immunol. (1991) 147, 168-173 所记载的方法制备针对小鼠 IL-6 受体的单克隆抗体。

将产生小鼠可溶性 IL-6 受体的 CHO 细胞在含 10% FCS 的 IMDM 培养液中培养,从该上清中用固定在 Affigel 10 凝胶 (Biorad 制造) 上的抗小鼠 IL-6 受体抗体 RS12 (参见上述 Saito, T. 等人) 的亲合柱,纯化小鼠可溶性 IL-6 受体。

将 50 μg 得到的小鼠可溶性 IL-6 受体和弗氏完全佐剂混合,注入到 Winstar 大鼠的腹部中,2 周后用弗氏不完全佐剂追加免疫。在第 45 天摘取大鼠的脾脏细胞,将 2×10^8 个细胞和 1×10^7 个的小鼠骨髓瘤细胞 P3U1、50% 的 PEG1500 (Boehringer Mannheim 制造) 按照常规方法使细胞融合,在 HTA 培养基中筛选杂交瘤。

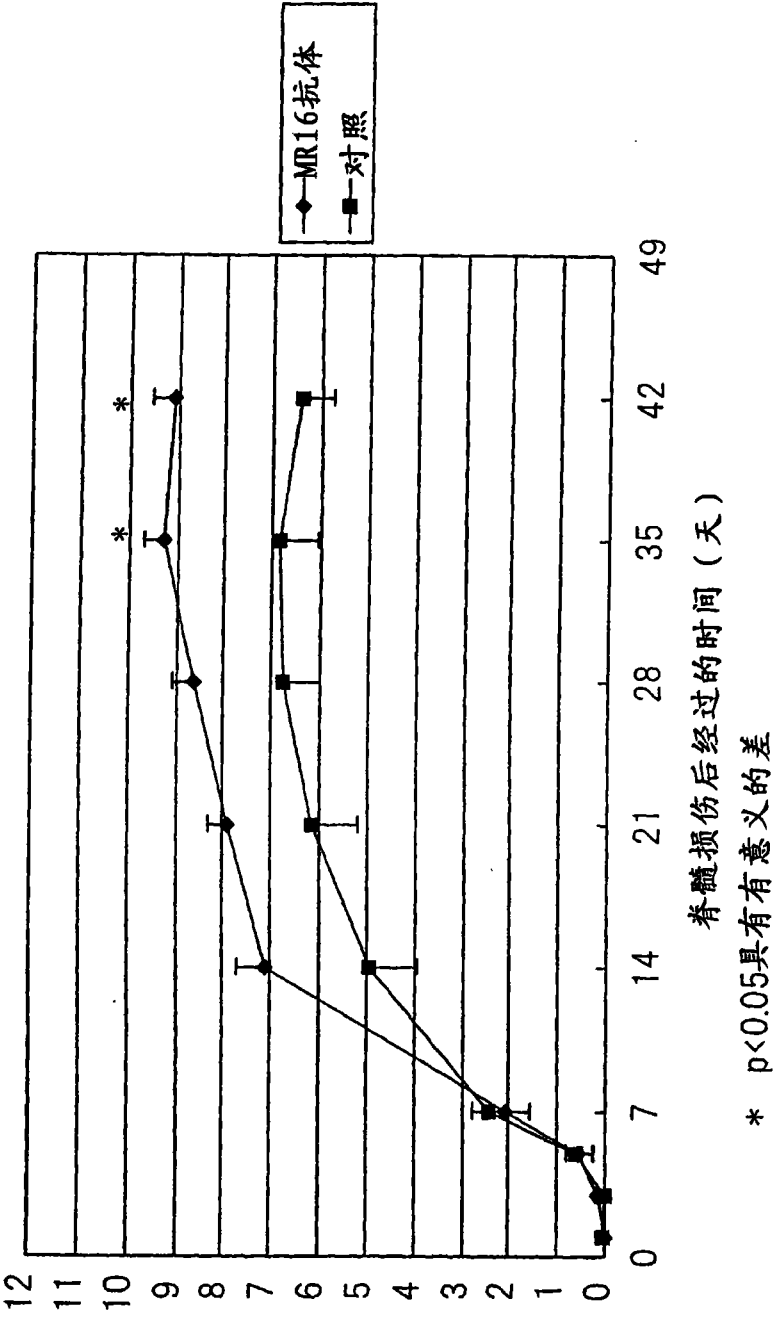
向包被了兔抗大鼠 IgG 抗体 (Cappel 制造) 的平板上添加杂交瘤培养上清后,使之和小鼠可溶性 IL-6 受体反应。然后,用兔抗大鼠 IL-6 受体抗体和碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 通过 ELISA 法筛选产生针对可溶性 IL-6 受体的抗体的杂交瘤。对确认的产生抗体的杂交瘤

进行 2 次亚克隆, 得到单一的杂交瘤, 将此克隆命名为 MR16-1。

用 MH60.BSF2 细胞 (Matsuda, T 等人, J. Immunol. (1988) 18, 951-956) 的 ^3H -胸腺嘧啶摄取调查该杂交瘤产生的抗体的在小鼠 IL-6 信号传递中的中和活性。向 96 孔板中按照 1×10^4 个/200 μl /孔加入 MH60.BSF2 细胞。向该平板中加入 10pg/ml 的小鼠 IL-6 和 12.3 ~ 1000ng/ml 的 MR16-1 抗体或 RS12 抗体, 在 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 中培养 44 小时后, 按照 1 μCi /孔加入 ^3H -胸腺嘧啶。4 小时后, 测定 ^3H -胸腺嘧啶的摄取。其结果 MR16-1 抗体抑制了 MH60.BSF2 细胞的 ^3H -胸腺嘧啶摄取。

所以, 确认了杂交瘤 MR16-1 (FERM BP-5875) 产生的抗体阻断了 IL-6 的 IL-6 受体的结合。

图1



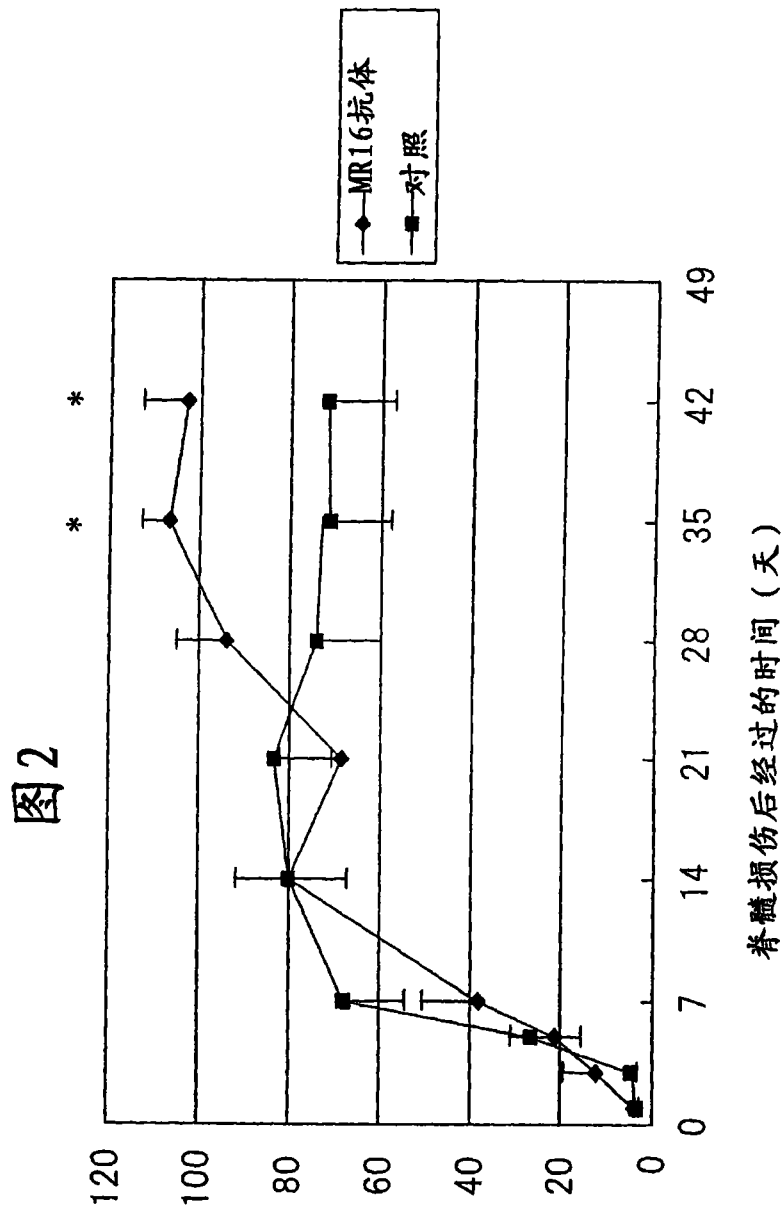


图 3

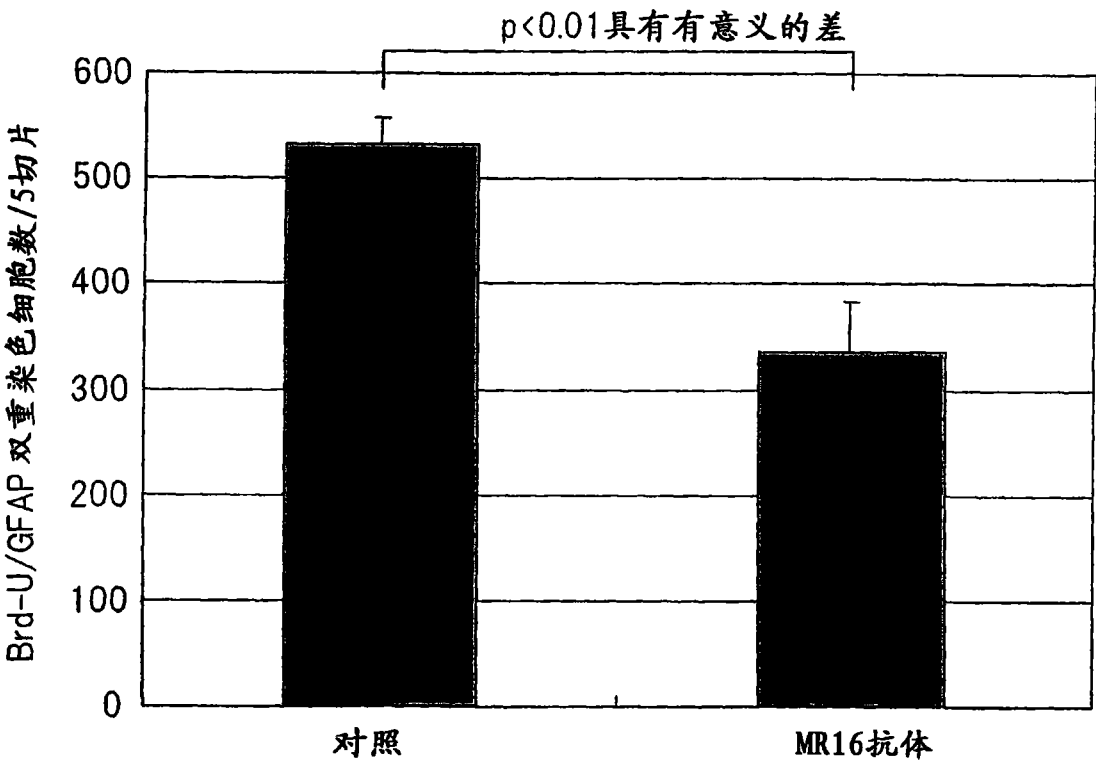


图 4

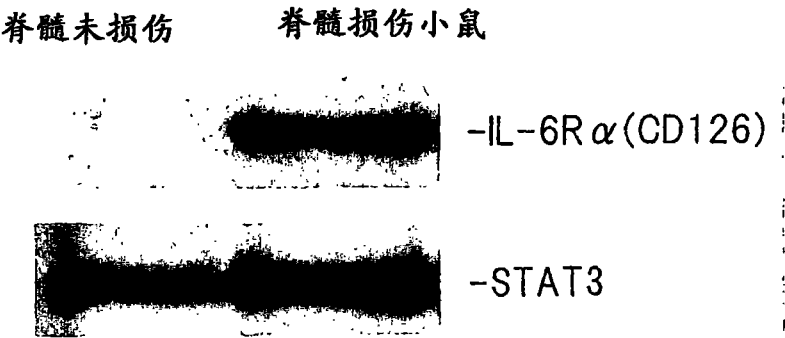


图 5

