



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I868126 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 01 月 01 日

(21)申請案號：109112785

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 04 月 16 日

(51)Int. Cl.：

*A61K39/395 (2006.01)**A61K31/28 (2006.01)**A61K45/06 (2006.01)**A61P13/00 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2019/04/17

日本

2019-078928

(71)申請人：國立大學法人廣島大學 (日本) HIROSHIMA UNIVERSITY (JP)

日本

學校法人東京女子醫科大學 (日本) TOKYO WOMEN'S MEDICAL UNIVERSITY

(JP)

日本

日商中外製藥股份有限公司 (日本) CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

(JP)

日本

(72)發明人：本田浩章 HONDA, HIROAKI (JP)；小島浩平 KOBATAKE, KOHEI (JP)

(74)代理人：洪澄文；洪茂

(56)參考文獻：

TW 200803894A

CN 103476410A

期刊 Katarzyna Sawa-Wejksza and Martyna Kandefer-Szerszeń, Tumor-Associated Macrophages as Target for Antitumor Therapy, Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2018; 66(2) Published online 2017 Jun 28, Page 97-111.

期刊 Lu Wang and Ali Shilatifard, UTX Mutations in Human Cancer, Cancer Cell, 2019 Feb 11; 35(2), 2019 Feb 11, 168-176.

審查人員：劉祥音

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：3 共 45 頁

(54)名稱

以組合投予 IL-6 抑制劑與 CCR2 抑制劑為特徵之泌尿器官癌的治療劑

(57)摘要

提供以同時抑制 IL-6 活性與 CCR2/CCL2 活性為特徵之泌尿器官癌，特別是離胺酸(K)特異性脫甲基酶 6A (lysine (K)-specific demethylase 6A, KDM6A)之功能降低的泌尿器官癌的治療劑與治療方法。

指定代表圖：

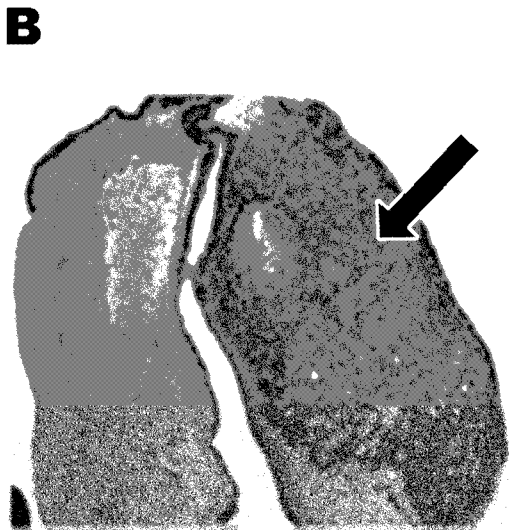
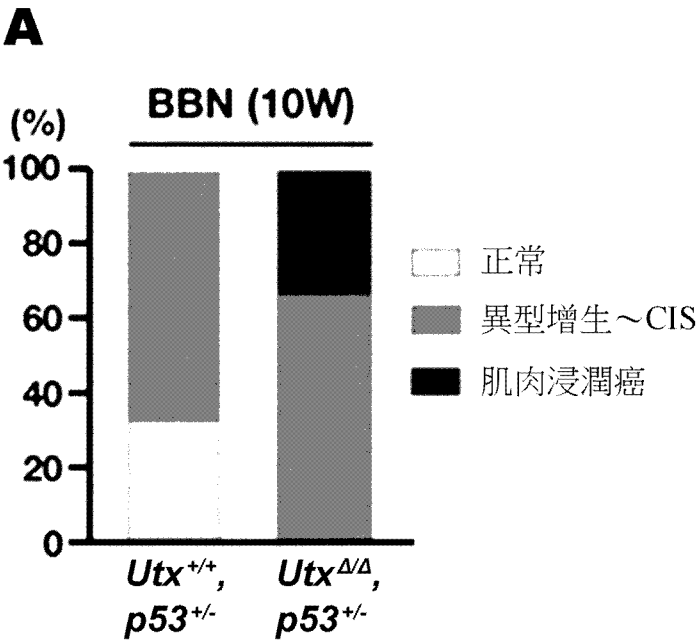


圖 1



I868126

【發明摘要】

【中文發明名稱】 以組合投予IL-6抑制劑與CCR2抑制劑為特徵之泌尿器官癌的治療劑

【中文】

提供以同時抑制IL-6活性與CCR2/CCL2活性為特徵之泌尿器官癌，特別是離胺酸(K)特異性脫甲基酶6A (lysine (K)-specific demethylase 6A, KDM6A)之功能降低的泌尿器官癌的治療劑與治療方法。

【指定代表圖】 圖1

【代表圖之符號簡單說明】 無

【發明說明書】

【中文發明名稱】 以組合投予IL-6抑制劑與CCR2抑制劑為特徵之泌尿器官癌的治療劑

【技術領域】

【0001】 本發明係關於以組合投予IL-6抑制劑與CCR2抑制劑為特徵之泌尿器官癌，特別是離胺酸(K)特異性脫甲基酶6A (lysine (K)-specific demethylase 6A, KDM6A)之功能降低之泌尿器官癌的治療劑。

【先前技術】

【0002】 膀胱癌是尿路上皮細胞的惡性腫瘤，並且隨著人口老齡化其發病率傾向於增加。儘管早期淺表癌可以藉由經尿道之膀胱腫瘤切除術來治療，然而其具有復發的特徵。另外，晚期肌肉浸潤性癌與轉移性病例的預後並未改善，需要基於分子病理學的新治療方法。

【0003】 UTX (經普遍轉錄的四三肽重複X染色體(ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat X chromosome)，也稱為離胺酸(K)特異性脫甲基酶6A (lysine (K)-specific demethylase 6A, KDM6A))是對於組蛋白H3K27的脫甲基酶，並且已在各種人類腫瘤中報導了功能喪失的變異（非專利文獻1）。在變異中，膀胱癌(Bladder cancer)的頻率最高，前列腺癌(Prostate cancer)與陰莖癌(Penile cancer)的比例也很高，UTX功能缺失被認為與泌尿器官領域之腫瘤發生密切相關（非專利文獻2、非專利文獻3）。

【0004】 作為顯示在Utx之膀胱癌發病之參與的論文，已經報導了對使用具有Utx變異之人類膀胱癌細胞系之免疫不全小鼠的移植實驗模型（非專利文獻4），此為使用培養細胞進行異種移植的結果，難以說是反映體內Utx功能缺失

的模型。迄今為止，尚無報導專注於膀胱癌，且使用基因改變之手法製備膀胱特異性Utx缺失（Utx^{ΔΔ}）小鼠並進行分析的研究。

【0005】 IL-6是一種細胞激素，也稱為B細胞刺激因子2(BSF2)或干擾素β2。IL-6被發現是參與B淋巴樣細胞活化的分化因子（非專利文獻5），之被確認為影響多種細胞之功能的多功能細胞激素（非專利文獻6）。已經報導了IL-6誘導T淋巴細胞的成熟化（非專利文獻7）。

【0006】 CCL2是與先天性免疫與Th2效應子應答及CD4+T細胞分化等相關的趨化因子，也被稱為CC趨化因子配體2，單核球趨化蛋白1、MCP-1（非專利文獻8）。作為CCL2的受體已知為CCR2。

【0007】 迄今為止，已有報導藉由在將小鼠膀胱癌MB49細胞懸浮培養後，針對獲得的球形(sphrer)形成細胞(sMB49)於體外將IL-6阻斷，降低了球形形成MB49細胞之浸潤能力（非專利文獻9）。

此外，已報導對浸潤性之乳癌的小鼠投予抗IL-6抗體與抗CCL2抗體的結果，抑制了癌的浸潤並且延長了生存期間（非專利文獻10）。

然而，尚未報導藉由IL-6抑制劑與CCR2抑制劑的組合使用之膀胱癌的治療效果。

先前技術文獻

非專利文獻

【0008】 非專利文獻1：van Haaften et al. Nature Genetics, volume 41, number 5, 2009

非專利文獻2：Van der Meulen et al. Epigenetics, volume 9, Issue 5, 2014

非專利文獻3：Lu Wang, et al., UTX mutation in Human Cancer. Cancer Cell, 2019

非專利文獻4：Ler et al, Science Translational Medicine, 9, eaai8321 (2017)

第 2 頁，共 39 頁(發明說明書)

2125-18322PF-TW

非專利文獻5：Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76

非專利文獻6：Akira, S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78

非專利文獻7：Lotz, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258

非專利文獻8：Paul, W. E., Fundamental Immunology, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, (Philadelphia, 2003) p.801-840

非專利文獻9：Annals of Surgical Oncology, Nov. 2018, vol.25, Issue 12, pp3518-3526

非專利文獻10：Nature, Vol.515, 6, 2014, 130-133

【發明內容】

發明所欲解決的問題

【0009】 有鑑於此種情況而做出了本發明。本發明以提供一種新穎之泌尿器官癌之治療劑為目的。

用於解決課題的手段

【0010】 為了解決上述課題，本發明人等進行了深入研究。結果發現，對於泌尿器官癌，特別是離胺酸(K)特異性脫甲基酶6A (lysine (K)-specific demethylase 6A, KDM6A) 之功能降低的泌尿器官癌，藉由共同抑制CCL2/CCR2活性與IL-6活性可以顯著地抑制腫瘤增大。

【0011】 本發明基於這樣的知識，並且具體地包括以下內容。

[1] 一種用於與CCR2抑制劑組合投予之泌尿器官癌的治疗劑及/或預防劑，其包括IL-6抑制劑。

[2] 一種用於與IL-6抑制劑組合投予之泌尿器官癌的治疗劑及/或預防劑，其包括CCR2抑制劑。

[3] 一種泌尿器官癌的治疗劑及/或預防劑，其包括IL-6抑制劑與CCR2抑制

劑的組合。

[4] 如[1]-[3]之任一項之治療劑及/或預防劑，其中前述IL-6抑制劑為抗IL-6抗體或抗IL-6受體抗體。

[5] 如[4]之治療劑及/或預防劑，其中前述抗IL-6抗體與抗IL-6受體抗體為嵌合抗體、人源化抗體或人類抗體。

[6] 如[1]-[5]之任一項之治療劑及/或預防劑，其中前述CCR2抑制劑為CCL2抑制劑。

[7] 如[1]-[6]之任一項之治療劑及/或預防劑，其中前述CCR2抑制劑為抗CCL2抗體或丙帕鎇(propagermanium)。

[8] 如[7]之治療劑及/或預防劑，其中前述抗CCL2抗體為嵌合抗體、人源化抗體或人類抗體。

[9] 如[1]-[8]之任一項之治療劑及/或預防劑，其中前述癌為癌症為膀胱癌、前列腺癌、腎癌。

[10] 如[1]-[9]之任一項之治療劑及/或預防劑，其中前述癌為膀胱癌。

[11] 如[1]-[10]之任一項之治療劑及/或預防劑，其中前述癌為離胺酸(K)特異性脫甲基酶6A (lysine (K)-specific demethylase 6A, KDM6A) 之表現或功能降低的癌。

[12] 如[1]-[11]之任一項之治療劑及/或預防劑，其中前述癌為KDM6A基因中具有變異的癌。

[13] 如[12]之治療劑及/或預防劑，其中前述KDM6A基因之變異為功能缺失型變異。

[14] 如[1]-[13]之任一項之治療劑及/或預防劑，其中前述癌為p53之表現或功能降低的癌。

[15] 如[1]-[14]之任一項之治療劑及/或預防劑，其中前述癌為p53基因中具有

變異的癌。

[16] 如[1]-[10]之任一項之治療劑及/或預防劑，係用於投予被判定為具有KDM6A之功能的降低、KDM6A之表現的降低及/或KDM6A基因之變異的個體。

[17] 如[1]-[10]與[16]之任一項之治療劑及/或預防劑，係用於投予被判定為具有p53之表現的降低、功能的降低及/或p53基因之變異的個體。

【0012】 本發明更包括以下態樣。

[18] 一種IL-6抑制劑，係用於與CCR2抑制劑組合而於泌尿器官癌之治療及/或預防中使用。

[19] 一種CCR2抑制劑，係用於與IL-6抑制劑組合而於泌尿器官癌之治療及/或預防中使用。

[20] 一種IL-6抑制劑與CCR2抑制劑之組合，係用於在泌尿器官癌之治療及/或預防中使用。

[21] 一種泌尿器官癌之治療及/或預防方法，包括對個體投予有效量之IL-6抑制劑的步驟與對個體投予有效量之CCR2抑制劑的步驟。

[22] 一種泌尿器官癌之治療及/或預防方法，包括對個體投予有效量之IL-6抑制劑與CCR2抑制劑之組合的步驟。

[23] 一種IL-6抑制劑在用於與CCR2抑制劑組合投予之泌尿器官癌之治療劑及/或抑制劑的製造中的用途。

[24] 一種CCR2抑制劑在用於與IL-6抑制劑組合投予之泌尿器官癌之治療劑及/或抑制劑的製造中的用途。

[25] 一種IL-6抑制劑與CCR2抑制劑之組合在泌尿器官癌之治療劑及/或抑制劑之製造中的用途。

[26] 如[18]-[25]之任一項之抑制劑、組合、治療方法、預防方法或用途，其中前述IL-6抑制劑為抗IL-6抗體或抗IL-6受體抗體。

[27] 如[26]之抑制劑、組合、治療方法、預防方法或用途，其中前述抗IL-6抗體與抗IL-6受體抗體為嵌合抗體、人源化抗體或人類抗體。

[28] 如[18]-[27]之任一項之抑制劑、組合、治療方法、預防方法或用途，其中前述CCR2抑制劑為CCL2抑制劑。

[29] 如[18]-[27]之任一項之抑制劑、組合、治療方法、預防方法或用途，其中前述CCR2抑制劑為抗CCL2抗體或丙帕緒。

[30] 如[29]之抑制劑、組合、治療方法、預防方法或用途，其中前述抗CCL2抗體為嵌合抗體、人源化抗體或人類抗體。

[31] 如[18]-[30]之任一項之抑制劑、組合、治療方法、預防方法或用途，其中前述癌為癌症為膀胱癌、前列腺癌、腎癌。

[32] 如[18]-[31]之任一項之抑制劑、組合、治療方法、預防方法或用途，其中前述癌為膀胱癌。

[33] 如[18]-[32]之任一項之抑制劑、組合、治療方法、預防方法或用途，其中前述癌為離胺酸(K)特異性脫甲基酶6A (lysine (K)-specific demethylase 6A, KDM6A) 之表現或功能降低的癌。

[34] 如[18]-[33]之任一項之抑制劑、組合、治療方法、預防方法或用途，其中前述癌為KDM6A基因中具有變異的癌。

[35] 如[34]之抑制劑、組合、治療方法、預防方法或用途，其中前述KDM6A基因之變異為功能缺失型變異。

[36] 如[18]-[35]之任一項之抑制劑、組合、治療方法、預防方法或用途，其中前述癌為p53之表現或功能降低的癌。

[37] 如[18]-[36]之任一項之抑制劑、組合、治療方法、預防方法或用途，其中前述癌為p53中具有基因變異的癌。

[38] 如[18]-[32]之任一項之抑制劑、組合、治療方法、預防方法或用途，係

用於投予被判定為具有KDM6A之功能的降低、KDM6A之表現的降低及/或KDM6A基因之變異的個體。

[39] 如[18]-[32]與[38]之任一項之抑制劑、組合、治療方法、預防方法或用途，係用於投予被判定為具有p53之表現的降低、功能的降低及/或p53基因之變異的個體。

發明的效果

【0013】 藉由本發明，提供新穎之泌尿器官癌的治療劑。

【圖式簡單說明】

【0014】

[圖1] 圖1A為顯示在從投予N-丁基-N-(4-氫-氧丁基)硝苯胺(N-butyl-N-(4-hydroxybutyl) nitorosamine, BBN)10週後之對照小鼠($Utx^{+/+}$ 、 $p53^{+/+}$ 小鼠)與 $Utx^{\Delta\Delta}$ 、 $p53^{+/+}$ 小鼠的膀胱中、正常組織(正常(Normal))、異型增生~上皮內癌(異型增生~CIS(Dysplasia~CIS))與往肌肉層之浸潤癌(肌肉浸潤癌(Muscle invasive cancer))的比率的圖。圖1B為顯示將從投予BBN之 $Utx^{\Delta\Delta}$ 、 $p53^{+/+}$ 小鼠的膀胱採集之組織切片蘇木精-曙紅染色的結果的照片。圖中的箭頭表示往肌肉層之浸潤癌。

[圖2] 圖2顯示，使用從在BBN投予4週之時間點之對照之 $Utx^{+/+}$ 小鼠與 $Utx^{\Delta\Delta}$ 小鼠之尿路上皮萃取之RNA的轉錄解析與經由KEGG之途徑解析的結果的圖。圖2A為對照小鼠與 $Utx^{\Delta\Delta}$ 小鼠之途徑比較結果的圖，顯示相較於對照小鼠，在 $Utx^{\Delta\Delta}$ 小鼠表現增加的途徑。圖2B顯示，對照小鼠與 $Utx^{\Delta\Delta}$ 小鼠之“細胞激素-細胞激素受體相互作用(Cytokine-cytokine receptor interaction)”途徑之142個基因的表現比較結果。

[圖3] 圖3A為顯示將在來自小鼠膀胱癌細胞株MBT2之Utx表現株(EV殖株

(clone)) 與Utx缺失株 (KO殖株) 中之UTX蛋白質的表現，經由使用抗UTX抗體或抗 β 肌動蛋白抗體之西方墨點法解析之結果的照片。圖3B為顯示腫瘤移植小鼠中丙帕鍺(Propagermanium)及/或MR16-1之投予方案的圖。圖3C與D為顯示作為將Utx表現株 (C) 或Utx缺失株 (D) 移植至C3H小鼠的結果所產生之腫瘤的腫瘤體積 (估計之腫瘤體積(Estimated tumor volume)) 與腫瘤重量(Tumor weight) 的圖。

【實施方式】

【0015】 作為本發明的一個非限制性方面，提供了以同時抑制IL-6活性與CCR2/CCL2活性為特徵之泌尿器官癌的治療劑或預防劑 (也被表現為泌尿器官癌之治療或預防用的醫藥組成物) 與組合療法。在該方面的一態樣中，泌尿器官癌為膀胱癌、前列腺癌、腎癌或陰莖癌。在該方面的一態樣中，泌尿器官癌為離胺酸(K)特異性脫甲基酶6A (lysine (K)-specific demethylase 6A, KDM6A)之表現降低的癌或KDM6A之功能降低的癌，且任意地為在KDM6A基因中具有變異 (例如，具有功能缺失變異) 的癌。在該方面的一態樣中，泌尿器官癌為在p53中具有變異的泌尿器官癌。在該方面的一態樣中，藉由組合IL-6抑制劑與CCR2抑制劑，與單獨藉由IL-6抑制劑或CCR2抑制劑的處置相比，可以在泌尿器官癌之治療或預防中獲得協同效果。

【0016】 在上述方面的一態樣中，提供了一種包含IL-6抑制劑作為有效成分且用於與CCR2抑制劑組合投予之泌尿器官癌的治療劑或預防劑。在該態樣中，含有IL-6抑制劑之泌尿器官癌的治療劑或預防劑係與CCR2抑制劑同時、分別或依序投予。這些抑制劑的劑型可以是相同劑型或不同劑型。例如，雙方可為非經口製劑、注射劑、點滴劑與靜脈內點滴劑中的一種，並為互相不同的劑型，又雙方也可為非經口製劑、注射劑、點滴劑與靜脈內點滴劑中的一種，並

且為同種的劑型。該態樣可以表現為一種用於與CCR2抑制劑組合而在泌尿器官癌之治療或預防中使用的IL-6抑制劑；一種治療或預防泌尿器官癌的方法，包括投予IL-6抑制劑的步驟與投予CCR2抑制劑的步驟；或者，一種IL-6抑制劑在用於與CCR2抑制劑組合投予之泌尿器官癌的治療劑或預防劑的製造中的用途。

【0017】 在上述方面的另一態樣中，提供了一種包含CCR2抑制劑作為有效成分且用於與IL-6抑制劑組合投予之泌尿器官癌的治療劑或預防劑。在該態樣中，含有CCR2抑制劑之泌尿器官癌的治療劑或預防劑係與IL-6抑制劑同時、分別或依序投予。這些抑制劑的劑型可以是相同劑型或不同劑型。例如，雙方可為非經口製劑、注射劑、點滴劑與靜脈內點滴劑中的一種，並為互相不同的劑型，又雙方也可為非經口製劑、注射劑、點滴劑與靜脈內點滴劑中的一種，並且為同種的劑型。該態樣可以表現為一種用於與IL-6抑制劑組合而在泌尿器官癌之治療或預防中使用的CCR2抑制劑；一種治療或預防泌尿器官癌的方法，包括對個體投予有效量之IL-6抑制劑的步驟與對個體投予有效量之CCR2抑制劑的步驟；或者，一種CCR2抑制劑在用於與IL-6抑制劑組合投予之泌尿器官癌的治療劑或預防劑的製造中的用途。

【0018】 在上述方面的另一態樣中，提供了一種泌尿器官癌的治療劑或預防劑，其包含IL-6抑制劑與CCR2抑制劑的組合作為有效成分。該態樣可表現為，一種用於泌尿器官癌之治療或預防的IL-6抑制劑與CCR2抑制劑的組合；一種治療或預防泌尿器官癌的方法，包括對個體投予有效量之IL-6抑制劑與CCR2抑制劑之組合的步驟；或者，一種IL-6抑制劑與CCR2抑制劑之組合在泌尿器官癌之治療劑或預防劑的製造中的用途。

【0019】 本發明中所謂「IL-6抑制劑」係為阻斷經由IL-6的信號傳達，並抑制IL-6之生物學活性的物質。IL-6抑制劑，較佳為對於IL-6、IL-6受體與gp130之任一種之結合具有抑制作用的物質。

作為本發明之IL-6抑制劑，可舉出例如，抗IL-6抗體、抗IL-6受體抗體、抗gp130抗體、IL-6改變體、可溶性IL-6受體改變體，或者IL-6或IL-6受體之部分胜肽及顯示與這些同樣之活性的低分子物質，但並無特別限制。作為本發明的IL-6抑制劑，較佳為可舉出識別IL-6受體的抗體。

【0020】 IL-6係藉由兩種蛋白質在細胞上傳達其生物學活性。一種為與IL-6結合之分子量為約80kD之配體結合性蛋白的IL-6受體（非專利文獻4與5）。IL-6受體，除了貫穿細胞膜並在細胞膜上表現的膜結合型以外，也主要作為由其細胞外區域所形成之可溶性IL-6受體存在。

另一種為，關於非配體結合信號傳達之分子量為約130 kD的膜蛋白gp130。IL-6與IL-6受體形成IL-6/IL-6受體複合物，接著藉由與gp130結合，將IL-6的生物學活性傳達至細胞內(Taga,T.et al.,Cell(1989)58,573-581)。

【0021】 本發明中的「CCR2抑制劑」是阻斷經由CCL2、CCL7或CCL8的信號傳達並抑制CCL2、CCL7及/或CCL8之生物學活性的物質，包括CCL2抑制劑、CCL7抑制劑與CCL8抑制劑。本發明中的「CCL2抑制劑」是阻斷CCL2的信號傳達並阻斷CCL2之生物學活性的物質。

作為本發明的CCL2抑制劑，可舉出，例如抗CCL2抗體，針對為CCL2之受體之CCR2的抗體（抗CCR2抗體）、與CCR2結合且阻斷經由CCL2之信號傳達的低分子物質，但並無特別限制。作為本發明的CCL2抑制劑，較佳為可舉出，抗CCL2抗體、與CCR2結合且阻斷經由CCL2之信號傳達的低分子物質（例如，丙帕鍺(propagermanium)）。

【0022】 CCL2是與先天免疫及Th2效應子反應及CD4+T細胞分化等相關的趨化因子，也稱為CC趨化因子配體2、單核細胞趨化蛋白1、MCP-1 (Paul, W. E., Fundamental Immunology, 5th Edition, Lippincott Williams & Wilkins, (Philadelphia, 2003) p.801-840)。已知CCL2經由結合趨化因子受體CCR2而傳達信號。CCR2為

在包含單核球、T細胞、B細胞及嗜鹼性球之許多細胞上表現的7個跨膜結構域G蛋白偶聯受體。

【0023】 對本發明中的抗體的來源沒有特別限制，但可舉出較佳為哺乳動物來源，更較佳為人類來源。

本發明中使用的抗IL-6抗體、抗IL-6受體抗體、抗gp130抗體、抗CCL2抗體與抗CCR2抗體可以經由使用公知方法作為多株或單株抗體而獲得。作為本發明中使用的抗IL-6抗體、抗IL-6受體抗體、抗gp130抗體、抗CCL2抗體與抗CCR2抗體，特別是哺乳動物來源的單株抗體較佳。作為哺乳動物來源的單株抗體，具有由融合瘤所產生者，及由藉由基因工程手法而被以含有抗體基因之表現載體轉形的宿主所產生者。如此之抗IL-6抗體，藉由與IL-6結合，抑制IL-6朝向IL-6受體的結合而阻斷IL-6之生物學活性之朝向細胞內的傳達。

作為如此之抗IL-6抗體，可舉出MH166(Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol. (1988) 18,951-956)、SK2抗體 (Sato, K. et al.,第21回 日本免疫學會總會、學術紀錄(1991)21,166)等。以下，作為本發明中使用的各種抗體的例子，記載抗IL-6抗體的製造方法，但是，對於其他抗體，基本上也可使用相同的方法與公知技術(抗CCL2抗體也可藉由參考日本專利第9067399號，日本專利公開第05276986號，WO03048083、US20040047860、US20060039913與WO2006/125202的記載)來製備。

【0024】 產生抗IL-6抗體之融合瘤，基本上可以使用公知技術如下製備。即，使用IL-6作為敏化抗原，可按照通常的免疫方法進行免疫，藉由通常的細胞融合方法將得到的免疫細胞與公知的親代細胞融合，經由通常的篩選方法，篩選單株之抗體的產生細胞來製備。

具體地，製造抗IL-6抗體如下進行即可。例如，作為抗體取得之敏化抗原而被使用的人IL-6為藉由使用Eur. J. Biochem (1987) 168, 543-550、J.

Immunol.(1988)140, 1534-1541、或Agr. Biol. Chem.(1990)54, 2685-2688中公開的IL-6基因/胺基酸序列可獲得。

將IL-6之基因序列插入公知的表現載體系統以將合適的宿主細胞轉形後，以公知方法從此宿主細胞中或培養上清液中純化目標之IL-6蛋白質，並將此純化的IL-6蛋白質作為敏化抗原使用即可。另外，也可將IL-6蛋白質與其他蛋白質的融合蛋白作為敏化抗原使用。

【0025】 本發明中使用的抗IL-6受體抗體可以使用公知的手段獲得為多株或單株抗體。作為本發明中使用的抗IL-6受體抗體，特別是哺乳動物來源的單株抗體較佳。作為哺乳動物來源的單株抗體，具有由融合瘤所產生者，及由藉由基因工程手法而被以含有抗體基因之表現載體轉形的宿主所產生者。如此之抗體，藉由與IL-6受體結合，抑制IL-6朝向IL-6受體的結合而阻斷IL-6之生物學活性之朝向細胞內的傳達。

作為如此之抗體，可舉出MR16-1抗體（Tamura, T. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924-11928）、PM-1抗體（Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906）、AUK12-20抗體、AUK64-7抗體或AUK146-15抗體（國際專利申請公開號WO 92-19759）等。其中，作為對人IL-6受體之較佳的單株抗體，以PM-1抗體示例，又作為對小鼠IL-6受體之較佳的單株抗體，可舉出MR16-1抗體。

【0026】 產生抗IL-6受體抗體之融合瘤，基本上可以使用公知技術如下製備。即，使用IL-6受體作為敏化抗原，可按照通常的免疫方法進行免疫，藉由通常的細胞融合方法將得到的免疫細胞與公知的親代細胞融合，經由通常的篩選方法，篩選單株之抗體的產生細胞來製備。

具體地，製造抗IL-6受體抗體如下進行即可。例如，作為抗體取得之敏化抗原而被使用的人IL-6受體為藉由使用在歐洲專利申請公開號EP 325474中，而小鼠IL-6受體為藉由使用日本專利申請公開號3-155795中公開的IL-6受體基因/胺

基酸基酸序列可獲得。

【0027】 IL-6受體蛋白具有在細胞膜上表現者，與從細胞膜上脫離者（可溶性IL-6受體）（Yasukawa, K. et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676）兩種類。可溶性IL-6受體由與細胞膜結合之IL-6受體的實質上細胞外區域所構成，以缺乏跨膜區域或者跨膜區域與細胞內區域的點，而與膜結合型的IL-6受體不同。IL-6受體蛋白，可以使用任何IL-6受體，只要其可作為本發明中所使用之抗IL-6受體抗體之製備的敏化抗原即可。

將IL-6受體之基因序列插入公知的表現載體系統以將合適的宿主細胞轉形後，以公知方法從此宿主細胞中或培養上清液中純化目標之IL-6受體蛋白質，並將此純化的IL-6受體蛋白質作為敏化抗原使用即可。另外，也可將表現IL-6受體之細胞、IL-6受體蛋白質與其他蛋白質的融合蛋白等作為敏化抗原使用。

【0028】 本發明中使用的抗gp130抗體可以使用公知的手段獲得為多株或單株抗體。作為本發明中使用的抗gp130抗體，特別是哺乳動物來源的單株抗體較佳。作為哺乳動物來源的單株抗體，具有由融合瘤所產生者，及由藉由基因工程手法而被以含有抗體基因之表現載體轉形的宿主所產生者。如此之抗體，藉由與gp130結合，抑制IL-6/IL-6受體複合體朝向gp130的結合而阻斷IL-6之生物學活性之朝向細胞內的傳達。

作為如此之抗體，可舉出AM64抗體（特開平3-219894）、4B11抗體與2H4抗體（US5571513）B-S12抗體與B-P8抗體（特開平8-291199）等。

【0029】 產生抗gp130抗體之融合瘤，基本上可以使用公知技術如下製備。即，使用gp130作為敏化抗原，可按照通常的免疫方法進行免疫，藉由通常的細胞融合方法將得到的免疫細胞與公知的親代細胞融合，經由通常的篩選方法，篩選單株之抗體的產生細胞來製備。

具體地，單株抗體如下進行即可。例如，作為抗體取得之敏化抗原而被使

用的gp130為藉由使用歐洲專利申請公開號EP 411946中公開的gp130基因/胺基酸序列可獲得。

將gp130之基因序列插入公知的表現載體系統以將合適的宿主細胞轉形後，以公知方法從此宿主細胞中或培養上清液中純化目標之gp130蛋白質，並將此純化的gp130蛋白質作為敏化抗原使用即可。另外，也可將表現gp130之細胞、gp130蛋白質與其他蛋白質的融合蛋白等作為敏化抗原使用。

【0030】 作為以敏化抗原被免疫的哺乳動物沒有特別限制，但是考慮到與在細胞融合中使用之親代細胞的適合性而選擇者，較佳為使用一般嚙齒類之動物，例如小鼠、大鼠，倉鼠等。

將敏化抗原對動物進行免疫，為根據公知方法進行。例如，作為一般方法，藉由將敏化抗原注射至哺乳動物之腹腔內或皮下來進行。具體地，將敏化抗原以PBS（磷酸鹽緩衝鹽水）、生理食鹽水等適量地稀釋、懸浮者，根據需要與通常之佐劑，例如弗氏完全佐劑適量混合，並乳化後，對哺乳動物每4至21天投予數次為較佳。另外，在致敏抗原免疫時可以使用合適的載體。

以如此之方式免疫並確認血清中所需的抗體程度已經升高後，將免疫細胞從哺乳動物中取出並進行細胞融合。作為進行細胞融合之較佳的免疫細胞，特別是脾細胞可被舉出。

【0031】 作為與前述免疫細胞融合的另一個親代細胞的哺乳動物骨髓瘤細胞，已適當地使用公知的各種細胞株，例如P3X63Ag8.653 (Kearney, J. F. et al. J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550)、P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519)、MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415)、SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270)、FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21)、S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148,

313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133)。

【0032】 前述免疫細胞與骨髓瘤細胞的細胞融合基本上為公知的方法，例如可以根據Milstein等人的方法(Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46)等來進行。

更具體地，前述細胞融合，例如在細胞融合促進劑存在下，在通常之營養培養基中實施。作為融合促進劑，例如，使用聚乙二醇(PEG)、仙台病毒(HVJ)等，並且為了如所需提高融合效率，可以添加使用二甲基亞砷等之補助劑。

【0033】 免疫細胞與骨髓瘤細胞的使用比例，例如對於骨髓瘤細胞將免疫細胞作為1~10倍。作為在前述細胞融合中使用的培養基，例如，可以使用適合於前述骨髓瘤細胞株的增殖的RPMI1640培養液、MEM培養液，其他使用於此種之細胞培養之通常的培養液，又，也可以併用胎牛血清(FCS)等血清補液。

【0034】 細胞融合，為藉由將預定量的前述免疫細胞與骨髓瘤細胞在前述培養基中充分混合，且通常以30~60%(w/v)之濃度添加預熱至約37°C的PEG溶液，例如，平均分子量為約1000~6000的PEG溶液並混合而形成目標融合細胞(融合瘤)。隨後，藉由重複依次添加適當的培養基並離心去除上清液之操作，可以去除對於融合瘤的生長不佳的細胞融合劑等。

該融合瘤藉由在通常之選擇性培養基例如HAT培養基（含有次黃嘌呤、氨基蝶呤與胸苷的培養液）中培養被選擇。在該HAT培養液之培養，持續足以殺死目標融合瘤以外的細胞（非融合細胞）的時間，通常幾天至幾週。然後，實施通常之限制稀釋方法以進行產生目標抗體之融合瘤的篩選與選殖(cloning)。

【0035】 又，除了以抗原免疫人類以外之動物以獲得上述融合瘤之外，可以所需抗原蛋白質或抗原表現細胞在體外(in vitro)使人淋巴細胞敏化，並將敏化的B淋巴細胞與人骨髓瘤細胞，例如U266融合，以獲得具有對所需抗原或抗原表現細胞之結合活性的人抗體（參見特公平1-59878）。此外，也可以將抗原或抗

原表現細胞投予至具有人抗體基因組譜(gene repertoire)的基因轉殖動物，以根據上述方法獲得所需的人抗體(國際專利申請公開號WO 93/12227、WO 92/03918、WO 94/02602、WO 94/25585、WO 96/34096、WO 96/33735)。

如此製備之產生單株抗體的融合瘤可以在通常培養液中繼代培養，並且可以在液態氮中長期保存。

【0036】 在從該融合瘤獲得單株抗體中，採用按照通常之方法培養該融合瘤並獲得為其培養上清液的方法，或者將融合瘤投予於與其相容的哺乳動物並使其增殖，並獲得為其腹水的方法等。前者之方法適合於獲得高純度的抗體，而後者之方法適合於抗體的大量生產。

例如，可以藉由特開平3-139293中公開的方法進行產生抗IL-6受體抗體之融合瘤的製備。可進行將產生PM-1抗體的融合瘤注入至BALB/c小鼠之腹腔內中以獲得腹水，並從此腹水純化PM-1抗體的方法、將該融合瘤培養於合適培養基，例如10%胎牛血清，含有5%BM-Condimed H1 (Boehringer Mannheim製)的RPMI1640培養基、融合瘤SFM培養基 (GIBCO-BRL製)、PFHM-II培養基 (GIBCO-BRL製)等，並從其培養上清液純化PM-1抗體的方法等。

【0037】 在本發明中，作為單株抗體，可使用將抗體基因從融合瘤選殖，並嵌入合適的載體，且將此導入宿主，並使用基因重組技術所產生的重組抗體(參見，例如，Borrebaeck C. A. K. and Larrick J. W. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990)。

具體而言，從產生目標抗體的細胞，例如融合瘤，單離編碼抗體的可變(V)區的mRNA。mRNA的單離，藉由公知方法，例如，脈超速離心法(Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法(Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987)162, 156-159)等製備全RNA，然後使用mRNA Purification Kit

(Pharmacia製)等製備mRNA。另外，可藉由使用QuickPrep mRNA純化套組(Pharmacia製)直接製備mRNA。

【0038】 使用反轉錄酶從獲得的mRNA合成抗體V區域的cDNA。cDNA之合成，可以使用AMV反轉錄酶第一鏈cDNA合成套組(AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit)等來進行。此外，在進行cDNA之合成與擴增中，可使用5'-Ampli FINDER RACE套組(Clontech製)與使用PCR的5'-RACE方法(Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1988)85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res.(1989)17, 2919-2932)。從獲得的PCR產物純化目標DNA片段，並與載體DNA連接。此外，由此製備重組載體，並將其導入大腸桿菌等並選擇菌落以製備所需的重組載體。藉由公知的方法，例如雙去氧法來確認目標DNA的鹼基序列。

一旦獲得了編碼目標抗體V區域之DNA，將其與編碼所需抗體恆定區(C區域)之DNA連接，並將其嵌入至表現載體中。或者，也可以將編碼抗體之V區域的DNA嵌入包含抗體C區域之DNA的表現載體中。

【0039】 在製造在本發明中被使用的抗體中，如下所述，將抗體基因，以在表現控制區，例如增強子、啟動子之控制下表現的方式嵌入表現載體中。接著，可以藉由該表現載體將宿主細胞轉形以表現抗體。

【0040】 在本發明中，可使用將降低對人之異種抗原性作為目的而經人為改變的基因重組型抗體，例如，嵌合(Chimeric)抗體，人源化(Humanized)抗體、人類(Human)抗體。這些改變的抗體可以使用已知方法來製造。

【0041】 嵌合抗體為藉由將如前所述獲得之編碼抗體V區域的DNA與編碼人抗體C區域的DNA連接，將其嵌入表現載體並導入宿主中以產生而可獲得(參見歐洲專利申請公開號EP 125023、國際專利申請公開號WO 92-19759)。可使用此已知方法獲得對本發明有用之嵌合抗體。

【0042】 人源化抗體也稱為重塑(reshaped)人抗體或人型化抗體，並且是人以外之哺乳動物，例如，小鼠抗體的互補決定區(CDR)移植到人抗體互補決定區者，其一般之基因重組手法也是已知的（參見歐洲專利申請公開號EP 125023與國際專利申請公開號WO 92-19759）。

具體而言，以將小鼠抗體的CDR與人抗體的構架區（FR；構架區）連接之方式所設計的DNA序列藉由PCR從以末端具有重疊之方式所製備之數個寡核苷酸合成。藉由將獲得的DNA與編碼人抗體C區域的DNA連接，接著嵌入表現載體中，並將此導入宿主中以產生而獲得（參見歐洲專利申請公開號EP 239400，國際專利申請公開號WO 92-19759）。

對於經由CDR被連接之人抗體的FR，選擇互補性決定領域形成良好的抗原結合部位者。如有必要，也可以重塑人抗體的互補決定區形成適當的抗原結合部位之方式來置換抗體之可變區域的構架區域的胺基酸（Sato, K.et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856）。

【0043】 嵌合抗體與人源化抗體中使用人抗體C區域。作為人抗體C區域，可舉出C γ ，例如可以使用C γ 1、C γ 2、C γ 3或C γ 4。另外，可以修飾人抗體C區域以改善抗體或其生產的穩定性。

嵌合抗體由人類以外之哺乳動物來源之抗體的可變區與人類抗體之C區域構成，並且人源化抗體是人類以外之哺乳動物來源的抗體及人類抗體的構架區與C區域構成。由於兩者在人體中的抗原性均降低，因此可用作本發明中使用的抗體。

【0044】 作為本發明中被使用之抗IL-6受體抗體之人源化抗體的較佳具體例，可舉出人源化PM-1抗體（參見國際專利申請公開號WO 92-19759）。

又，除了上述獲得人抗體的方法之外，也已知通過使用人類抗體庫經由淘選獲得人抗體的技術。例如可將人抗體的可變區作為單鏈抗體(scFv)，經由噬菌

體展示法(phage display)在噬菌體表面表現，選擇與抗原結合之噬菌體。分析選取的噬菌體基因，可決定編碼與抗原結合的人抗體之可變區的DNA序列。如果得知與抗原結合的scFv之DNA序列，可製作包含該序列之適合表現載體而取得人抗體。這些方法為已知，可參考WO92/01047，WO 92/20791，WO 93/06213，WO 93/11236，WO 93/19172，WO 95/01438與WO 95/15388

【0045】 如上所述構築的抗體基因可以藉由公知的方法表現。當使用哺乳動物細胞時，其可以藉由常用的有用的啟動子，待表現的抗體基因，在其3'端下游與poly A信號功能性連接的DNA或包含其的載體表現。例如，作為啟動子/增強子，可舉出人類巨細胞病毒即刻早期啟動子/促進子(human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer)。

另外，作為其他可於本發明中被使用之可於抗體表現中使用的啟動子/增強子，也可使用反轉錄病毒，多瘤病毒、腺病毒、猴病毒40(SV40)等病毒啟動子/促進子、人類延伸因子(elongation factor)1 α (HEF1 α)等源自哺乳細胞之啟動子/促進子。

例如，當使用SV40啟動子/增強子時，依照Mulligan等人的方法(Mulligan, R. C. et al., Nature (1979) 277, 108-114)，而當使用HEF1 α 啟動子/增強子時，可以根據Mizushima等人的方法(Mizushima, S. and Nagata, S. Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322)容易地實施。

【0046】 在大腸桿菌的情況下，可以將常用的啟動子、抗體分泌的信號序列與要被表現的抗體基因功能上連接並表現。例如，作為啟動子，可舉出lacZ啟動子、araB啟動子。當使用lacZ啟動子時，可依照Ward等人的方法(Ward, E. S. et al., Nature (1989) 341, 544-546；Ward, E. S. et al. FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)，當使用araB啟動子時，可依照Better等人的方法(Better, M. et al. Science (1988) 240, 1041-1043)。

作為用於抗體分泌之信號序列，當在大腸桿菌的周質(periplasm)中產生時，可以使用pelB信號序列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383)。於將在周質中產生的抗體分離之後，適當地重折疊(refold)抗體的結構而使用（參見，例如，WO96/30394）。

【0047】 作為複製起點，可以使用源自SV40、多瘤病毒、腺病毒、牛乳頭瘤病毒(BPV)等，此外，為了在宿主細胞系統中擴增基因複本(copy)數，表現載體，可以包括胺基醣苷磷酸轉移酶(APH)基因、胸嘧啶激酶(TK)基因、大腸桿菌黃嘌呤鳥糞嘧啶基核苷轉移酶(Ecogpt)基因、二氫葉酸還原酶(dhfr)基因等作為選擇標記。

【0048】 任何產生系統均可用於生產本發明中使用的抗體的製造。用於抗體製造的產生系統具有體外(in vitro)與體內(in vivo)之產生系統。作為體外產生系統，可舉出使用真核細胞的產生系統、使用原核細胞的產生系統等。

【0049】 當使用真核細胞時，具有使用動物細胞、植物細胞或真菌細胞的產生系統。作為動物細胞，(1)哺乳動物細胞，例如CHO、COS、骨髓瘤、BHK（倉鼠胎腎）、HeLa、Vero等；(2)兩棲類細胞，例如非洲爪蟾卵母細胞，或(3)昆蟲細胞，例如sf9、sf21、Tn5等為已知的。作為植物細胞，已知源自菸草(Nicotiana tabacum)的細胞，亦可將此為癒創組織(callus)培養。作為真菌細胞，已知酵母，例如，酵母菌(Saccharomyes)屬，例如釀酒酵母(Saccharomyes cerevisiae)、絲狀菌，例如，麴黴菌(Aspergillus)屬，例如黑黴菌(Aspergillus niger)等。

【0050】 當使用原核細胞時，有使用細菌細胞的產生系統。作為細菌細胞，已知大腸菌(E.coli)、枯草桿菌。

【0051】 於這些細胞中，經由轉形導入目標抗體基因，藉由體外培養經轉形的細胞可獲得抗體。培養係根據公知的方法進行。例如，作為培養液，可使用DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM，亦可併用胎牛血清(FCS)等血清輔助液。

再者，藉由將經導入抗體基因的細胞移入動物的腹腔等，亦可於體內產生抗體。

【0052】 另一方面，作為體內的產生系統，可列舉使用動物的產生系統與使用植物的產生系統。使用動物的情況，有使用哺乳類動物、昆蟲的產生系統。

作為哺乳動物，可使用山羊、豬、綿羊、小鼠、牛等(Vicki Glaser, SPECTRUM Niotechnology Appliocation,1993)。再者，作為昆蟲，可使用蠶。使用植物的情況，例如可使用菸草。

抗體基因導入至這些動物或植物，於動物或植物的體內產生抗體、回收。例如，將抗體基因插入至編碼如山羊 β 酪蛋白之固有產生於乳汁中之蛋白質的基因中間，而調製作為融合基因。將包含經插入抗體基因的融合基因的DNA片段注入至山羊胚胎，將該胚胎導入至雌性山羊。由接受胚胎的山羊所生的基因轉殖山羊或其後代所產生的乳汁可獲得所期望的抗體。為增加包含由基因轉殖山羊產生所期望的抗體的乳汁量，亦可於基因轉殖山羊使用適宜的激素(Ebert,K.M.et al.,Bio/Technology(1994)12,699-702)。

再者，使用蠶的情況，以經插入目的之抗體基因的棒狀病毒感染蠶，可由該蠶的體液獲得所期望的抗體(Waeda,S.et al.,Nature(1985)315,592-594)。再者，使用菸草的情況，將目的之抗體基因插入至植物表現用載體，例pMON530，將該載體導入如根瘤農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)之細菌。將該細菌感染菸草，例如菸草(*Nicotiana tabacum*)，由本菸草葉可獲得所期望的抗體(Julian,K.-C.Ma et al.,Eur.J.Immunol.(1994)24,131-138)。

【0053】 如上所述，以體外或體內的產生系統產生抗體的情況，可將編碼抗體重鏈(H鏈)或輕鏈(L鏈)的DNA分別嵌入表現載體而同時使其轉形宿主，或者亦可將編碼H鏈或L鏈的DNA嵌入單一的表現載體，使其轉形宿主(參照國際專利申請公開號WO 94/11523)。

【0054】 本發明所使用之抗體，以可適合使用於本發明為限，可為抗體的

片段與其修飾物。例如，作為抗體的片段，可列舉Fab、F(ab')₂、Fv或H鏈與L鏈的Fv以適當的連結子(linker)連結之單鏈Fv(scFv)。

具體而言，抗體以酵素，例如，木瓜酵素(papain)、胃蛋白酶(pepsin)處理而生成抗體片段，或構築編碼該等抗體片段之基因，將其導入至表現載體後，以適當的宿主細胞使其表現（例如，參照Co, M. S. et al., *I. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976，Better, M. & Horwitz, A. H. *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496，Plueckthun, A. & Skerra, A. *Methods in Enzymology* (1989) 178, 497-515，Lamoyi, E. *Methods in Enzymology* (1989) 121, 652-663)，Rousseaux, J. et al., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 663-66，Bird, R. E. et al., *TIBTECH* (1991) 9, 132-137)。

【0055】 scFv為經由連接抗體的H鏈V區域與L鏈V區域獲得。於此scFv中，H鏈V區域與L鏈V區域經由連結子，較佳為胜肽連接子連接(Huston, J. S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) 85, 5879-5883)。scFv中的H鏈V區域與L鏈V區域可以源自上述抗體中的任何一種。作為連接V區域的胜肽連結子，例如，使用由12-19個胺基酸殘基組成的任何單鏈胜肽。

【0056】 編碼scFv的DNA，可藉由將編碼前述抗體的H鏈或H鏈V區域的DNA，以及編碼L鏈及L鏈V區域的DNA作為模板，使用其兩端規定的引子對經由PCR法擴增該等序列之中編碼所期望的胺基酸序列的DNA部分，之後組合使各H鏈、L鏈連結之規定的引子對擴增編碼肽連結子部分的DNA及其兩端而獲得。

再者，一旦製作編碼scFv的DNA，可根據慣用方法獲得含有該DNA之表現載體，以及經表現載體轉形之宿主，再者，根據慣用方法使用該宿主，可獲得scFv。

這些抗體的片段，可與前述同樣方式取得該基因使其表現，經由宿主使其

產生。本發明之「抗體」亦包含該等抗體的片段。

【0057】 作為抗體的修飾物，可使用與聚乙二醇(PEG)等各種分子結合的抗體。本發明之「抗體」亦包含該等抗體修飾物。要得到這樣的抗體修飾物，可藉由於所得抗體施行化學性修飾而獲得。該等方法已於此項技術領域中確立。

【0058】 如前述方式所產生、表現的抗體，可由細胞內外、宿主均一地分離而純化。本發明中所使用抗體的分離、純化可經由親和層析進行。作為親和層析所使用的管柱，例如，可列舉蛋白質A管柱、蛋白質G管柱。作為蛋白質A管柱使用的擔體，例如，可列舉HyperD、POROS、SspharoseF.F等。此外，可使用通常蛋白質中所使用之分離、純化方法，並無任何特別限定。

例如，適宜選擇、組合上述親和層析以外的層析、過濾、超過濾、鹽析、透析等，可分離、純化本發明中所使用之抗體。作為層析，例如，可列舉離子交換層析、疏水層析、凝膠過濾等。該等層析可適用於HPLC(高效液相層析(High performance liquid chromatography))。再者，亦可使用逆向HPLC (reverse phase HPLC)。

【0059】 上述所得抗體的濃度測定可經由吸光度的測定或ELISA等而進行。亦即，經由吸光度的測定的情況，以PBS(-)適當稀釋後，測定280nm的吸光度，以1mg/ml作為1.35OD算出。再者，經由ELISA的情況可如以下的方式測定。亦即，以0.1M碳酸氫鹽緩衝液(pH9.6)稀釋山羊抗人類IgG (TAG製)為1μg/ml，添加100μl至96孔盤(Nunc製)，於4°C培養一夜，固相化抗體。封閉(block)後，添加100μl之經適宜稀釋之本發明中所使用的抗體或包含抗體的樣品，或作為標準品的IgG (CAPPEL製)，於室溫培養1小時。

【0060】 洗淨後，添加100μl之經5000倍稀釋的鹼性磷酸酶標識抗人類IgG (BIO SOURCE製)，於室溫培養1小時。洗淨後，加入受質溶液培養後，使用MICROPLATE READER Model 3550(Bio-Rad製)測定450nm的吸光度，算出目

的抗體的濃度。

【0061】 本發明所使用之IL-6變異體，係具有與IL-6受體的結合活性，且不傳遞IL-6生物學活性的物質。亦即，IL-6變異體對於IL-6受體為與IL-6競爭性結合，但由於不傳遞IL-6的生物學活性，阻斷來自IL-6的信號傳遞。

【0062】 IL-6變異體係經由置換IL-6的胺基酸序列的胺基酸殘基，導入變異而製作。雖然不論IL-6變異體原本之IL-6其來源，但考慮抗原性等，較佳為人類IL-6。

具體而言，IL-6的胺基酸序列使用習知的分子模型程式，例如WHATIF(Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56)預測其二級結構，進一步地經由評估置換胺基酸殘基對於全體的影響來進行。決定適當的置換胺基酸殘基後，以包含編碼人類IL-6基因的鹼基序列的載體作為模板，經由通常進行的PCR法而置換胺基酸的方式而導入變異，可獲得編碼IL-6變異體的基因。必要時將其組裝至適當的表現載體，可依據前述重組型抗體的表現、產生及純化方法獲得IL-6變異體。

作為IL-6變異體的具體例，揭示於Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93及Savino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367、WO 96-18648、WO 96-17869。

【0063】 本發明中所使用之IL-6部分胜肽或IL-6受體部分胜肽，係各具有與IL-6受體或IL-6的結合活性，且不傳遞IL-6生物學活性的物質。亦即，IL-6部分胜肽或IL-6受體部分胜肽係與IL-6受體或IL-6結合，藉由捕捉這些而特異性地抑制IL-6對IL-6受體的結合。其結果，由於不傳遞IL-6的生物學活性，阻斷經由IL-6的信號傳遞。

【0064】 IL-6部分胜肽或IL-6受體部分胜肽，係由在IL-6或IL-6受體的胺基酸序列中之IL-6與IL-6受體結合相關區域的一部分或全部的胺基酸序列構成的胜肽。此類胜肽通常由10至80個，較佳為20至50個，更佳為20至40個胺基酸

殘基所構成。

【0065】 IL-6部分胜肽或IL-6受體部分胜肽，係於IL-6或IL-6受體的胺基酸序列中，指定IL-6與IL-6受體結合相關區域，該經指定之區域的一部分或全部的胺基酸序列為基準，經由通常已知的方法，例如基因工程學的手法或胜肽合成法而可製作。

【0066】 經由基因工程學的手法製作IL-6部分胜肽或IL-6受體部分胜肽時，將編碼所期望的胜肽的DNA序列組裝至表現載體，可依據前述重組型抗體的表現、產生及純化方法獲得。

【0067】 IL-6部分胜肽或IL-6受體部分胜肽經由胜肽合成法製作時，可使用胜肽合成中通常使用的方法，例如固相合成法或液相合成法。

具體而言，亦可依據「續醫藥品的開發 第14卷 肽合成（監修：矢島治明，廣川書店，1991年）」記載的方法進行。作為固相合成法，例如使用以合成於有機溶劑為不溶性的支持體的方式使對應於胜肽C末端的胺基酸結合， α -胺基及側鏈官能基以適當的保護基保護的胺基酸，由C末端向N末端方向的順序為1的胺基酸使其逐個縮合的反應，以及使經結合於樹脂上的胺基酸或胜肽的 α -胺基的該保護基脫離的反應，交互重複而使胜肽鏈伸長的方法。固相肽合成法，依據所使用之保護基大致分類為Boc法及Fmoc法。

【0068】 此方式之合成目的胜肽後，進行脫保護反應及由胜肽鏈的支持體之切斷反應。與胜肽鏈的切斷反應中，於Boc法通常可使用氟化氫或三氟甲磺酸，於Fmoc法通常可使用TFA。於Boc法，例如於氟化氫中將上述保護胜肽樹脂於苯甲醚的存在下處理。其次，進行保護基的脫離及由支持體的切斷而回收肽。經由將其冷凍乾燥，可得粗製肽。另一方面，於Fmoc法，例如可於TFA中與上述同樣方式進行脫保護反應及肽鏈由支持體的切斷反應。

【0069】 所得粗製胜肽，可經由適用之HPLC分離、純化。在其溶出時，

使用蛋白質的純化中通常使用之水-乙腈系溶劑於最適條件下進行即可。分取相當於所得層析分布的波峰之分液，將其冷凍乾燥。關於藉此所純化之肽分液，經由以質譜分析之分子量解析、胺基酸組成分析、或胺基酸序列解析等而鑑定。

IL-6 部分胜肽及 IL-6 受體部分胜肽的具體例，揭示於日本專利特開平 2-188600、特開平 7-324097、特開平 8-311098 及美國專利公報 US5210075。

【0070】 使用於本發明之抗體，亦可為經與聚乙二醇(PEG)、放射性物質、毒素等各種分子結合的接合(conjugate)抗體。該等接合抗體可藉由對所得抗體施用化學性修飾而獲得。又，抗體的修飾方法已於此項技術領域中確立。本發明之「抗體」亦包含該等接合抗體。

此外，本發明中的「抗體」包括經過轉譯後修飾的抗體。轉譯後修飾包括，經由麩醯胺酸或麩胺酸的焦麩胺醯胺酸化將重鏈或輕鏈 N 末端修飾為焦麩胺酸，但不限於此。

【0071】 作為本發明之「IL-6 受體抗體」的較佳例，可列舉人源化抗 IL-6 受體-IgG1 抗體之托西珠單抗，以及進行托西珠單抗的可變區域及恆定區域的改變的人源化抗 IL-6 受體抗體及與托西珠單抗結合於相同抗原決定位之抗體。

具體而言，可列舉包含具有序列編號: 1 之序列的重鏈可變區域（托西珠單抗重鏈可變區）及具有序列編號: 2 之序列的輕鏈可變區域（托西珠單抗輕鏈可變區）的抗體以及含有序列編號: 5 的重鏈可變區（SA237 重鏈可變區）與序列編號: 6 的輕鏈可變區（SA237 輕鏈可變區）的抗體。

更具體地，可列舉包含具有序列編號: 3 之序列的重鏈可變區域（托西珠單抗之重鏈）及具有序列編號: 4 之序列的輕鏈可變區域（托西珠單抗之輕鏈）的抗體以及含有序列編號: 7 的重鏈可變區（SA237 之重鏈）與序列編號: 8 的輕鏈可變區（SA237 之輕鏈）的抗體。

【0072】 該等抗體可根據，例如 WO 2010/35769、WO 2010/107108、WO

2010/106812等所揭示的方法取得。具體而言，可基於上述IL-6受體抗體的序列，使用所屬技術領域中具有通常知識者習知的基因重組技術而製作（例如，參照 Borrebaeck CAK and Larrick JW, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990）。重組型抗體，可將編碼其之DNA由融合瘤或產生抗體的敏化淋巴球等抗體產生細胞選殖，嵌入適當的載體，將其導入宿主（宿主細胞）而使其產生。

【0073】 該等抗體的分離、純化，只要使用通常抗體的純化中所使用的分離、純化方法即可，並無任何限定。例如，可適宜選擇、組合層析管柱、過濾、超過濾、鹽析、溶劑沉澱、溶劑萃取、蒸餾、免疫沉澱、SDS-聚丙烯醯胺凝膠電泳、等電點電泳、透析、再結晶等分離、純化抗體。

【0074】 與參考抗體「結合於相同抗原決定基的抗體」是指在競爭分析中將參考抗體與其自身抗原的結合阻斷50%以上的抗體，相反，參考抗體在競爭分析中將前述抗體與其自身抗原的結合阻斷50%以上。具體地，與參考抗體「結合於相同抗原決定基的抗體」是指在競爭分析中將參考抗體與其自身抗原的結合阻斷60%以上、70%以上，80%以上或90%以上的抗體。

【0075】 在別的面向中，使用競爭分析以鑑定關於對IL-6受體的結合、與托西珠單抗競爭的抗體。在特定的態樣中，此種競爭抗體結合於與托西珠單抗所結合的相同的抗原決定基(例如，線狀或立體構造抗原決定基)。繪製(mapping)抗體所結合的抗原決定基的詳細的例示的方法由Morris (1996) “Epitope Mapping Protocols,” in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)提供。

【0076】 例示的競爭分析中，將已固定的IL-6受體於溶液中培育，該溶液包含結合於IL-6受體的第1標記抗體（例如，托西珠單抗）及對IL-6受體的結合相關的、關係到與第1抗體的競爭能力的所試驗的第2未標記抗體。第2抗體存在

於融合瘤上清。作為對照，將已固定的IL-6受體培育於含有第1標記抗體但不含有第2未標記抗體的溶液中。在容許第1抗體對IL-6受體結合的條件下培育後，除去未結合的多餘抗體，測定結合於已固定的IL-6受體的標記的量。將結合於已固定的IL-6受體的標記的量與對照樣本相比，當試驗樣本為實質減少的情況時，顯示第2抗體與參與對IL-6受體的結合的第1抗體的競爭。參照Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)。

【0077】 作為本發明中的「抗CCL2抗體」的例子，可舉出在日本特許第9067399號、日本特許公開平05276986號、WO03048083、US20040047860、US20060039913、WO2006/125202中描述的抗體，不限於此。做為更具體的例子可給出ABN912與CNT0888 (carlumab)。這些抗體可以根據日本國特許第9067399號、日本特許公開平05276986號、WO03048083號、US20040047860號、US20060039913號、WO2006/125202號中描述的方法，任意地使用已知技術來製備。

【0078】 當CCR2抑制劑是低分子物質時，作為該物質的例子，可給出丙帕鍺（3-氧鍺丙酸聚合物）、INBC3344、RS-504393或WO2006/187393中描述的那些，但不限於此。

【0079】 本發明的治療劑或預防劑，根據需要，可混合調製適當的藥學上所容許的擔體、媒介物等，作成冷凍乾燥製劑或溶液製劑。作為適當的藥學上所容許的擔體、媒介物，例如，可列舉滅菌水或生理食鹽水、安定劑、賦形劑、抗氧化劑（抗壞血酸等）、緩衝劑（磷酸、檸檬酸、組胺酸、其他有機酸等）、防腐劑、界面活性劑（PEG、Tween等）、螯合劑（EDTA等）、結合劑等。再者，亦可包含其他的低分子量多胜肽、血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白等蛋白質，甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、麩胺酸、天冬胺酸、甲硫胺酸、精胺酸及

離胺酸等胺基酸，多糖及單糖等之糖類與碳水化合物，甘露醇及山梨醇等之糖醇。作為注射用水溶液的情況，例如亦可併用生理食鹽水、包含葡萄糖與其他輔助劑的等張液、例如，可列舉D-山梨醇、D-甘露糖、D-甘露醇、氯化鈉等，適當的溶解輔助劑，例如醇（乙醇等）、多元醇（丙二醇、PEG等）、非離子性界面活性劑（聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯20、波洛姆-188、HCO-50）。再者，藉由於製劑中混合透明質酸酶(hyaluronidase)，可將更大液量進行皮下投藥(Expert Opin Drug Deliv. 2007 Jul;4(4): 427-40)。再者，本發明之醫藥組成物亦可預先填入至注射筒。又，溶液製劑可根據WO 2011/09088記載的方法製作。

【0080】 再者，根據需要本發明之醫藥組成物也可封入微膠囊（羥甲基纖維素、明膠、聚[甲基丙烯酸甲酯]等微膠囊），作成膠體藥物遞送系統（微脂體、白蛋白微球體、微乳化物、奈米粒子及奈米膠囊等））（參照“Ramington’s Pharmaceutical Science 16th edition”, Oslo Ed. (1980)等）。進一步地，將藥劑作成緩釋性藥劑的方法亦為習知，本發明之醫藥組成物可適用(Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 15: 267-277 (1981); Langer, Chemtech. 12: 98-105 (1982); 美國專利第3,773,919號; 歐洲專利申請公開(EP)第58,481號; Sidman et al., Biopolymers 22: 547-556 (1983); EP第133,988號)。

【0081】 當本發明的治療劑或預防劑包含低分子量物質作為活性成分時，可藉由與合適的藥學上可接受的載體等混合以作為片劑、膠囊劑、顆粒劑、散劑、丸劑等。

作為藥學上所容許之載體使用之材料之例子可列舉、乳糖、葡萄糖、蔗糖等糖類；玉米澱粉、馬鈴薯澱粉等澱粉類；纖維素及羧甲基纖維素鈉、乙基纖維素、甲基纖維素等衍生物；黃蓍膠粉末；麥芽；明膠；滑石；硬脂酸或硬脂酸鎂等固形潤滑劑；硫酸鈣；花生油、綿子油、芝麻油、橄欖油、玉米油、植物油、可可油等植物油；丙二醇、甘油、山梨醇、甘露醇及聚乙二醇等多元醇；

藻酸；TWEEN等乳化劑；卵磷脂等濕潤劑；著色劑；香料；錠劑化劑(tableting agent)；安定化劑；抗氧化劑；防腐劑；無熱原之水；等張鹽水溶液；及磷酸緩衝液等，但不限於此。

【0082】 本發明之治療劑或預防劑的投予，可經由任意的合適途徑投予至患者。例如，作為濃注劑(bolus)或歷經一定期間之持續注入而藉由靜脈內、肌肉內、腹腔內、腦脊髓內、經皮、皮下、關節內、舌下、滑液內、經口、吸入、局部或外用之途徑投藥至患者。

作為投予量，可以在例如每1次每1kg體重0.0001mg~100mg活性成分的範圍內選擇。或者，例如，當投予於人類患者時，每位患者活性成分可以在0.001~1000mg/kg·體重的範圍內選擇。在含有抗體作為有效成分之IL-6抑制劑或CCR2抑制劑的情況下，作為每1次給藥的投予量，例如含有約0.01至50mg/kg·體重為較佳。

【0083】 組合療法與醫藥組成物

在本發明的一個非限制性態樣中，本發明的組合療法提供了一種包括投予IL-6抑制劑與CCR2抑制劑的有效量、抑制細胞增殖、抑制腫瘤重量、腫瘤體積、治療癌或預防癌的方法。在一些實施態樣中，相較於IL-6抑制劑或CCR2抑制劑之單獨療法，本發明的組合療法抑制細胞增殖、抑制腫瘤重量、抑制腫瘤體積、治療癌症或預防癌之效果較高。在另一個實施態樣中，本發明的組合療法具有抑制細胞增殖、抑制腫瘤重量、抑制腫瘤體積、治療癌或預防癌的協同或累加效果。

【0084】 在一些實施態樣中，本發明的「有效量」是指為了治療或預防個體的疾病（本發明中特別是泌尿器官癌），有效之IL-6抑制劑及/或CCR2抑制劑的用量。例如，當IL-6抑制劑是抗體時，例如每1次之投予每1kg體重，例如以從0.0001mg至1000mg，較佳為從0.001mg至100mg，更佳為從0.01~50mg之範圍的

用量，例如每1~10週，較佳為每1~8週，更佳為每1~4週投予1次，但不限於此。又，當CCR2抑制劑是抗CCL2抗體時，例如每1次之投予每1kg體重，以從0.0001mg至1000mg，較佳為從0.001mg~100mg，更佳為從0.01~50mg之範圍的用量，例如每1~10週，較佳為每1~8週，更佳為每1~4週投予1次，但不限於此。又，當CCR2抑制劑是結合於CCR2阻斷CCL2之訊號的低分子物質時，可以給出，每一次之投予，例如，以每1日每1kg體重從0.01至40mg之範圍，較佳為以每1日每1kg體重從0.25至10mg之範圍每日投予。當CCR2抑制劑是丙帕鏽時，例如，以每1日20-40mg之範圍，較佳為以每1日30mg，例如分成2-4次，較佳分成3次投予，不限於這些。

本發明中的泌尿器官癌沒有特別限制，但是較佳為膀胱癌。

【0085】 在一些實施態樣中，本發明中之「治療」意指，藉由本發明的組合療法抑制個體的泌尿系統中的腫瘤增大、減少癌細胞數量、抑制癌細胞的增殖、減少腫瘤體積、減少腫瘤重量、抑制癌細胞的轉移，或改善由癌症引起的各種症狀。又，在一些實施態樣中，本發明中之「預防」意指，防止經由被減少的癌細胞再度增殖之癌細胞數量的增加、防止增殖被抑制的癌細胞的再增殖、防止經減少之腫瘤尺寸再度增大，或者預防經由局部治療從肉眼上消失（或已治愈）的癌再度肉眼出現。

【0086】 在一些實施態樣中，本發明的組合療法提供一種藉由使用IL-6抑制劑，在經由CCR2抑制劑之癌的治疗或預防症時，增強該CCR2抑制劑之治療或預防效果的方法。在另一個實施態樣中，本發明的組合療法提供一種藉由使用CCR2抑制劑，在經由IL-6抑制劑之癌的治疗或預防症時，增強該IL-6抑制劑之治療或預防效果的方法。於此，治療或預防效果的增強是指，例如，提高了治療的反應率、減少了用於治療被投予之IL-6抑制劑或CCR2抑制劑的量，及/或經由IL-6抑制劑或CCR2抑制劑的治療期間變短，但不限於此。在另一個實施態

樣中，本發明的組合療法提供了包括投予IL-6抑制劑與CCR2抑制劑之有效量，增加個體的無進展生存期間的方法。

【0087】 在一些實施態樣中，本發明的組合療法包括IL-6抑制劑與CCR2抑制劑的投予。IL-6抑制劑與CCR2抑制劑可以藉由本技術領域已知的任何合適的方法來投予。例如，IL-6抑制劑與CCR2抑制劑可以並行（即同時）或連續（即在不同時間點）投予。在一些實施態樣中，該IL-6抑制劑與CCR2抑制劑被連續地（即，在不同的時間）投予時，IL-6抑制劑與CCR2抑制劑的投予間隔沒有特別限制，可以考慮投予途徑、劑型等因素來設定。例如，其為0～168小時，較佳為0～72小時，又較佳為0～24小時，更佳為0～12小時，但不限於此。

【0088】 在一些實施態樣中，IL-6抑制劑與CCR2抑制劑被同時投予。在一些實施態樣中，IL-6抑制劑被間歇地（即，斷續地）投予。在一些實施態樣中，IL-6抑制劑在CCR2抑制劑的投予之前被投予。在一些實施態樣中，IL-6抑制劑在CCR2抑制劑的投予之後被投予。

【0089】 在一些實施態樣中，CCR2抑制劑被間歇地（即，斷續地）投予。在一些實施態樣中，CCR2抑制劑在IL-6抑制劑的投予之前被投予。在一些實施態樣中，CCR2抑制劑在IL-6抑制劑的投予之後被投予。

【0090】 在一些實施態樣中，公知或本說明書中記載之IL-6抑制劑與CCR2抑制劑可用於本發明的組合療法。

【0091】 在一些實施態樣中，除了IL-6抑制劑與CCR2抑制劑的組合療法之外，還可以進行追加療法。在一些實施態樣中，在對於本發明之組合療法追加之療法中，也可以包括追加之IL-6抑制劑及/或CCR2抑制劑的投予。

【0092】 作為本發明的一個非限制性方面，本發明提供一種包括IL-6抑制劑、CCR2抑制劑或IL-6抑制劑與CCR2抑制劑之組合之細胞增殖抑制劑（細胞增殖抑制劑）、癌細胞或含有癌細胞的腫瘤組織之體積或重量的抑制劑、癌治療

劑或癌預防劑（以下統稱為本發明之醫藥組成物）。在一些實施態樣中，本發明的醫藥組成物可以用於本發明的組合療法。在一些實施態樣中，本發明的醫藥組成物，藉由將IL-6抑制劑與CCR2抑制劑組合使用，相較於其之單獨療法，抑制細胞增殖、抑制癌細胞或含有癌細胞的腫瘤組織之體積或重量，或治療或預防癌之效果較高。在另一個實施態樣中，本發明的醫藥組成物，藉由將IL-6抑制劑與CCR2抑制劑組合使用，具有抑制細胞增殖、抑制癌細胞或含有癌細胞的腫瘤組織之體積或重量，或治療或預防癌的協同或累加效果。

【0093】 在一些實施態樣中，本發明中包含IL-6抑制劑與CCR2抑制劑之組合的醫藥組成物，意指，為了在疾病（在本發明中特別是泌尿器官癌）的治療或預防中同時、分別或依序投予IL-6抑制劑及CCR2抑制劑而組合之醫藥組成物。例如，本發明之醫藥組成物可以同時含有IL-6抑制劑與CCR2抑制劑的組合製劑的形式來提供。此外，例如，本發明的醫藥組成物也可以是，分別提供含有IL-6抑制劑的藥物與含有CCR2抑制劑的藥劑，而這些藥劑同時或依次被使用。泌尿器官癌沒有特別限制，但是較佳為膀胱癌。

【0094】 在一些實施態樣中，本發明提供一種包含IL-6抑制劑作為活性成分，用於與CCR2抑制劑組合使用的醫藥組成物。

在一些實施態樣中，本發明提供一種包含CCR2抑制劑作為活性成分，用於與IL-6抑制劑組合使用的醫藥組成物。

【0095】 在一些實施態樣中，本發明提供一種藉由將IL-6抑制劑與CCR2抑制劑組合，於經由CCR2抑制劑之癌之治療時，用於增強該CCR2抑制劑之治療效果的醫藥組成物。

在一些實施態樣中，本發明提供一種藉由將CCR2抑制劑與IL-6抑制劑組合，於經由IL-6抑制劑之癌之治療時，用於增強該IL-6抑制劑之治療效果的醫藥組成物。

【0096】 在一些實施態樣中，本發明提供一種IL-6抑制劑及/或其CCR2抑制劑在製備包含IL-6抑制劑及/或CCR2抑制劑作為活性成分的藥物組合物中的用途。

【0097】 又，在本發明中，含有IL-6抑制劑及/或其CCR2抑制劑作為有效成分意指，含有IL-6抑制劑及/或其CCR2抑制劑作為主要活性成分，而不限制IL-6抑制劑及/或其CCR2抑制劑的含有率。

【0098】 KDM6A是一種組蛋白修飾蛋白，其基因位於X染色體上。已知KDM6A促進經由JmjC域進行三二甲基化的組蛋白H3的第27號離胺酸殘基（H3K27）的去甲基化，同時，經由稱為TPR（四三肽重複序列(tetratricopeptide repeat)）的蛋白質相互作用域與組蛋白甲基轉移酶MLL3（混合譜系白血病3(mixed lineage leukemia 3)，KMT2C）或MLL4（混合譜系白血病4(mixed lineage leukemia 4)，KMT2D）結合，且作為為蛋白複合物之COMPASS（蛋白質連結Set1之複合物(complex of proteins associated with Set1)）樣複合物的構成要素參與組蛋白H3的第四號離胺酸殘基（H3K4）的甲基化。H3K27甲基化是轉錄抑制的組蛋白標記，H3K4甲基化是轉錄促進的組蛋白標記，並且認為KDM6A藉由上述功能促進目標基因的轉錄激活。

【0099】 在上述方面的一個態樣中，本發明為一種泌尿器官癌之治療用或預防用醫藥組成物（泌尿器官癌的治療劑或預防劑），其包含IL-6抑制劑，CCR2抑制劑或IL-6抑制劑與CCR2抑制劑的組合，並提供評估在從個體（例如，泌尿道癌患者）獲得的生物樣品中具有KDM6A的功能降低、KDM6A的表現降低及/或KDM6A基因之變異（較佳為功能缺失變異）的有無，並將具有KDM6A功能降低，KDM6A表現降低及/或KDM6A基因突變（較佳為功能缺失變異）的個體選擇為對於經由前述醫藥組成物治療或預防的反應者，用於投予該被選擇之個體的前述醫藥組成物。

在另一態樣，本發明為一種用於在泌尿器官癌之治療或預防中使用的IL-6抑制劑、CCR2抑制劑或IL-6抑制劑與CCR2抑制劑的組合，並提供評估在從個體（例如，泌尿道癌患者）獲得的生物樣品中具有KDM6A的功能降低、KDM6A的表現降低及/或KDM6A基因之變異（較佳為功能缺失變異）的有無，並將具有KDM6A功能降低，KDM6A表現降低及/或KDM6A基因突變（較佳為功能缺失變異）的個體選擇為對於前述治療或預防的反應者，用於投予該被選擇之個體的IL-6抑制劑、CCR2抑制劑或IL-6抑制劑與CCR2抑制劑的組合。

在其他態樣中，本發明為包括對個體（例如泌尿器官癌患者）投予有效量之IL-6抑制劑之步驟及對個體投予有效量之CCR2抑制劑之步驟，或投予IL-6抑制劑與CCR2抑制劑之組合的治療或預防泌尿器官癌的方法，且提供包括評估在從個體（例如，泌尿道癌患者）獲得的生物樣品中具有KDM6A的功能降低、KDM6A的表現降低及/或KDM6A基因之變異（較佳為功能缺失變異）的有無之步驟，與將具有KDM6A功能降低，KDM6A表現降低及/或KDM6A基因突變（較佳為功能缺失變異）的個體選擇為對於前述治療或預防的反應者之步驟之治療或預防泌尿器官癌的方法。前述評估步驟與選擇步驟，較佳為在前述投予步驟之前實施。

在這些態樣中，也可以評價個體中p53之表現的降低、p53之功能的降低及/或p53之變異的有無、將具有p53之表現的降低、p53之功能的降低及/或p53之變異的個體選擇為對於前述治療或預防的反應者。評估p53之變異的有無的方法為該技術領域所公知。

【0100】 在本發明中，KDM6A的功能降低，KDM6A的表現降低，KDM6A基因的變異以及KDM6A基因的功能喪失變異，例如，可藉由將從泌尿器官癌患者收集的樣品中使用針對KDM6A的抗體來免疫染色，或對從患者身上收集的樣品進行西方墨點或外顯子測序來確認。

例如，使用針對KDM6A的抗體進行免疫染色的結果，相較於KDM6A陽性對照（例如，從KDM6A功能未降低，KDM6A表現未降低，不具KDM6A基因變異，不具KDM6A基因之功能缺失型變異之患者收集的生物樣品），當KDM6A蛋白的表現顯著降低時，可以確定KDM6A的功能降低，KDM6A的表現降低，具有KDM6A基因具有變異或具有KDM6A基因具有功能缺失型變異。

在本發明中，KDM6A功能的降低包括KDM6A功能的缺失與KDM6A的失活。

在本發明中，KDM6A表現的降低包括KDM6A蛋白的表現顯著降低、KDM6A蛋白不表現。

在本發明中，KDM6A基因變異包括KDM6A基因功能缺失型變異。作為具體之變異，可取出無義(nonsense)變異、移碼變異、剪接(splice)變異、缺失等。

p53基因是具有DNA修復、細胞週期之控制、凋亡等之誘導等功能的腫瘤抑制基因之一，並且p53基因變異在各種癌症中被確認。由於變異型p53蛋白半衰期長並在細胞中積累，因此p53抗體會出現在血清中(Lowe SW, Bodis S, McClatchey A等：p53的狀態與體內癌症治療的功效。266：807-810，1994)。因此，認為以ELIZA法測定血清中的p53抗體對於伴隨基因變異之癌的發現是有用的(Shimada H, Ochiai T, Nomura F et al：Titration of serum p 53 antibodies in 1085 patients with various types of malignant tumors. Cancer 97：682-689, 2003)，自2007年11月以來，作為在食道癌、大腸癌及乳癌的腫瘤標記檢查，被認為保險適應。

在本發明中，p53功能的降低包括p53功能的缺失與p53的失活。

在本發明中，p53表現的降低包括p53蛋白的表現顯著降低並且未檢測到p53蛋白的表現。

在本發明中，作為p53基因變異的具體變異，可舉出無義變異、移碼變異、剪接變異、缺失等。

實施例

【0101】 接下來，將藉由實施例更具體地描述本發明，但是本發明不限於以下實施例。

【0102】 在研究UTX (KDM6A) 缺失在膀胱癌中之參與的目的中，製備並分析了在膀胱上皮特異性缺失UTX的小鼠 (Utx^{ΔΔ})。儘管在Utx^{ΔΔ}小鼠的膀胱上皮中確認了Utx之缺失，但經由長期觀察並未在膀胱中觀察到腫瘤發病，並且認為UTX之單獨缺失不足以導致膀胱癌的發病。

被認為是膀胱癌中最高頻率變異之基因為p53，而Utx缺失與p53變異高頻率合併 (The Cancer Genome Atlas Research Network, Nature 2014, vol. 507, p.315-322)。因此，將Utx^{ΔΔ}小鼠與p53異源(hetro)小鼠進行交配以製作Utx^{ΔΔ}, p53^{+/-}小鼠。有趣的是，Utx^{ΔΔ}, p53^{+/-}小鼠之長期觀察的結果，確認上皮內癌 (原位癌 (carcinoma in situ, CIS)) 的發病，而顯示了Utx缺失為與p53變異協同參與膀胱癌的發病。

【0103】 此外，由於對於膀胱癌而言，認為暴露於吸煙等之變異源對於發病是重要的，因此對小鼠進行為實驗性膀胱癌誘導物質之N-丁基-N-(4-氫-氧丁基) 硝基亞硝胺(N-butyl-N-(4-hydro-oxybutyl) nitorosamine)(BBN)的投予。其結果，自投予10週後，相對於對照之Utx^{+/+}, p53^{+/+}小鼠確認了約60%異型增生～上皮內癌 (異型增生～CIS(Dysplasia～CIS))，Utx^{ΔΔ}, p53^{+/+}小鼠為上皮內癌為100%異型增生～上皮內癌發病 (圖1A)，又一部分發展為往肌肉層之浸潤癌 (肌肉浸潤癌(Muscle invasive cancer)) (圖1B)。這些結果顯示，Utx缺失與p53變異增強了膀胱癌的易感性，並與變異源協同發展為晚期癌症。我們的小鼠被認為是從基因變異的積累與環境變異源的影響之見解來製備人類膀胱腫瘤的第一個體內模型。

【0104】 在分析膀胱癌發病中UTX缺失之參與的目的中，我們在BBN投

第 37 頁，共 39 頁(發明說明書)

予4週之時間點從對照之Utx^{+/+}小鼠與Utx^{ΔΔ}小鼠之膀胱收集了尿路上皮，並萃取RNA，進行轉錄組分析與經由KEGG之途徑分析。其結果，在Utx^{ΔΔ}小鼠之膀胱上皮最增強的途徑為“細胞激素-細胞激素受體相互作用(Cytokine-cytokine receptor interaction)”（圖2A；粗體），並且確認其他“MAPK途徑”與“JAK-STAT途徑”的增強。這些結果，顯示由於UTX缺失激活膀胱上皮中細胞激素途徑，而此結果激活MAPK、JAK-STAT等之細胞內信號轉達系統。此外，當檢查在“細胞激素-細胞激素受體相互作用”途徑中表現增強之基因時，確認表現最高的是趨化因子CCL2，其次是細胞激素IL6（圖2B；粗體）。

【0105】 因此，進行了檢驗是否可以藉由抑制這些細胞激素、趨化因子的功能抑制膀胱癌之進展的治療模型實驗。MBT2是從稱為C3H的小鼠品系建立的膀胱癌腫瘤株。於此，我們藉由將空載體(empty vector, EV)與Utx剔除(knockout, KO)載體導入MBT2中，製備了Utx表現株（EV殖株(clone)）與Utx缺失株（KO殖株）（圖3A）。將此殖株移植到同系C3H小鼠中，並設7天的植入期間，之後，進行經由僅有載劑、僅有丙帕緒(Propagermanium)（CCL2之受體CCR2的抑制劑，以0.005%的濃度混合於飼料連日投予），僅有MR16-1（對於小鼠IL6受體的中和抗體，每隻100μg，每週3次腹腔內注射），及丙帕緒與MR16-1之組合的治療。

【0106】 其結果，相對於如圖3C所示，在移植Utx表現株之結果所產生的EV腫瘤中，任何之治療法相較於僅有載劑並未確認到有意義的治療結果，如圖3D所示，對於移植Utx缺陷株之結果所產生的KO腫瘤，確認丙帕緒與MR16-1之組合(combination)的治療有意義地抑制腫瘤重量。

這些結果顯示，對於Utx缺失膀胱癌，藉由同時抑制CCL2/CCR2活性與IL6活性，可以顯著抑制腫瘤增大。

【0107】 作為顯示在Utx之膀胱癌發病之參與的論文，已經報導了對使用

具有Utx變異之人膀胱癌細胞株之免疫不全小鼠的移植實驗模型(Deer Lee et al. Sci Trans Med 2017)，此為使用培養細胞進行異種移植的結果，難以說是反映體內Utx功能缺失的模型。迄今為止，尚無報導專注於膀胱癌，且使用基因改變之手法製備膀胱特異性Utx缺失（Utx^{ΔΔ}）小鼠並進行分析的研究，關於本發明之研究及其手法被認為是獨特的。

產業上之利用可能性

【0108】 本發明提供了一種對於泌尿器官癌，特別是離胺酸(K)特異性脫甲基酶6A (lysine (K)-specific demethylase 6A, KDM6A) 之功能降低的泌尿器官癌的新穎治療劑。

【符號說明】

無。

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種IL-6抑制劑在製備離胺酸(K)特異性脫甲基酶6A (lysine (K)-specific demethylase 6A, KDM6A)之表現或功能降低的泌尿器官癌的治療劑及/或預防劑的用途，其中前述IL-6抑制劑與CCR2抑制劑組合投予，且其中前述IL-6抑制劑為抗IL-6受體抗體，而前述CCR2抑制劑為丙帕鍺(propagermanium)。

【請求項2】 一種CCR2抑制劑在製備離胺酸(K)特異性脫甲基酶6A (KDM6A)之表現或功能降低的泌尿器官癌的治療劑及/或預防劑的用途，其中前述CCR2抑制劑與IL-6抑制劑組合投予，且其中前述CCR2抑制劑為丙帕鍺，而前述IL-6抑制劑為抗IL-6受體抗體。

【請求項3】 一種IL-6抑制劑與CCR2抑制劑在製備離胺酸(K)特異性脫甲基酶6A (KDM6A)之表現或功能降低的泌尿器官癌的治療劑及/或預防劑的用途，其中前述IL-6抑制劑為抗IL-6受體抗體，而前述CCR2抑制劑為丙帕鍺。

【請求項4】 如請求項1-3之任一項之用途，其中前述抗IL-6受體抗體為嵌合抗體、人源化抗體或人類抗體。

【請求項5】 如請求項1-3之任一項之用途，其中前述癌為膀胱癌、前列腺癌、腎癌。

【請求項6】 如請求項1-3之任一項之用途，其中前述癌為膀胱癌。

【請求項7】 如請求項1-3之任一項之用途，其中前述癌為KDM6A基因中具有變異的癌。

【請求項8】 如請求項1-3之任一項之用途，其中前述KDM6A基因之變異為功能缺失型變異。

【請求項9】 如請求項1-3之任一項之用途，其中前述癌為p53之表現或功

能降低的癌。

【請求項10】如請求項1-3之任一項之用途，其中前述癌為p53基因中具有變異的癌。

【請求項11】一種離胺酸(K)特異性脫甲基酶6A (KDM6A)之表現或功能降低的泌尿器官癌的治療劑及/或預防劑，其包括IL-6抑制劑與CCR2抑制劑的組合，其中前述IL-6抑制劑為抗IL-6受體抗體，且前述CCR2抑制劑為丙帕鍺。

【發明圖式】

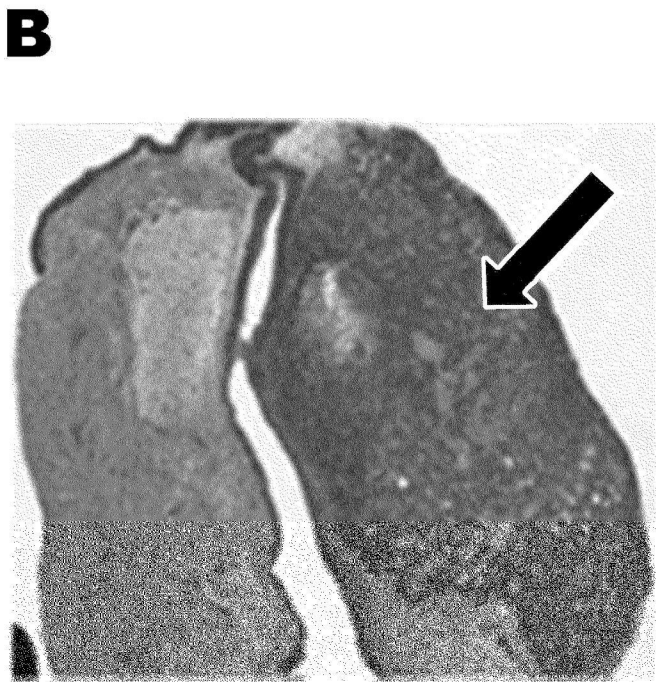
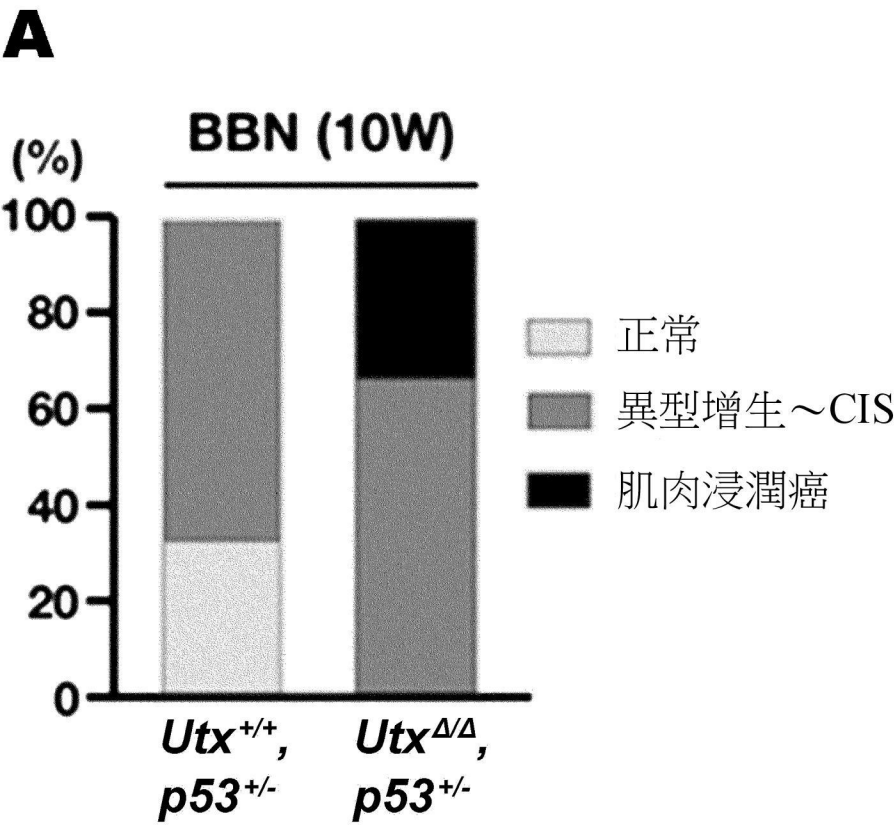
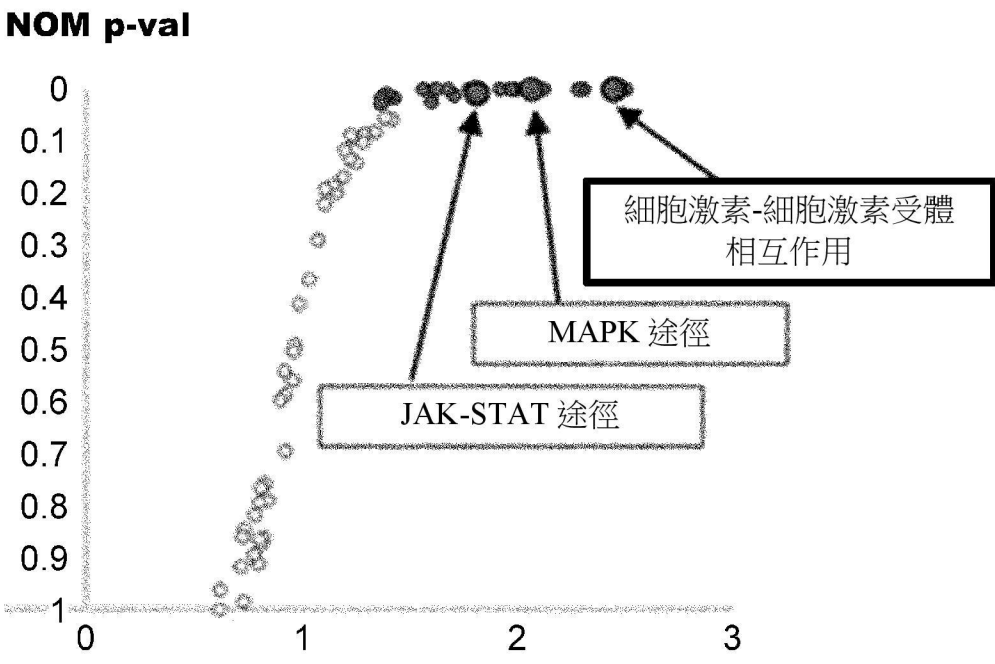


圖 1

A



B

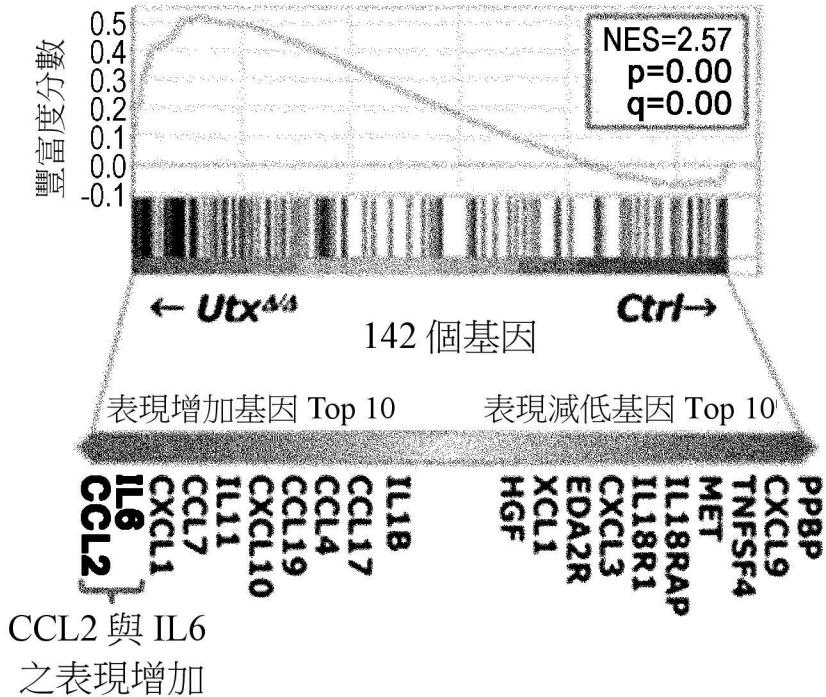


圖 2

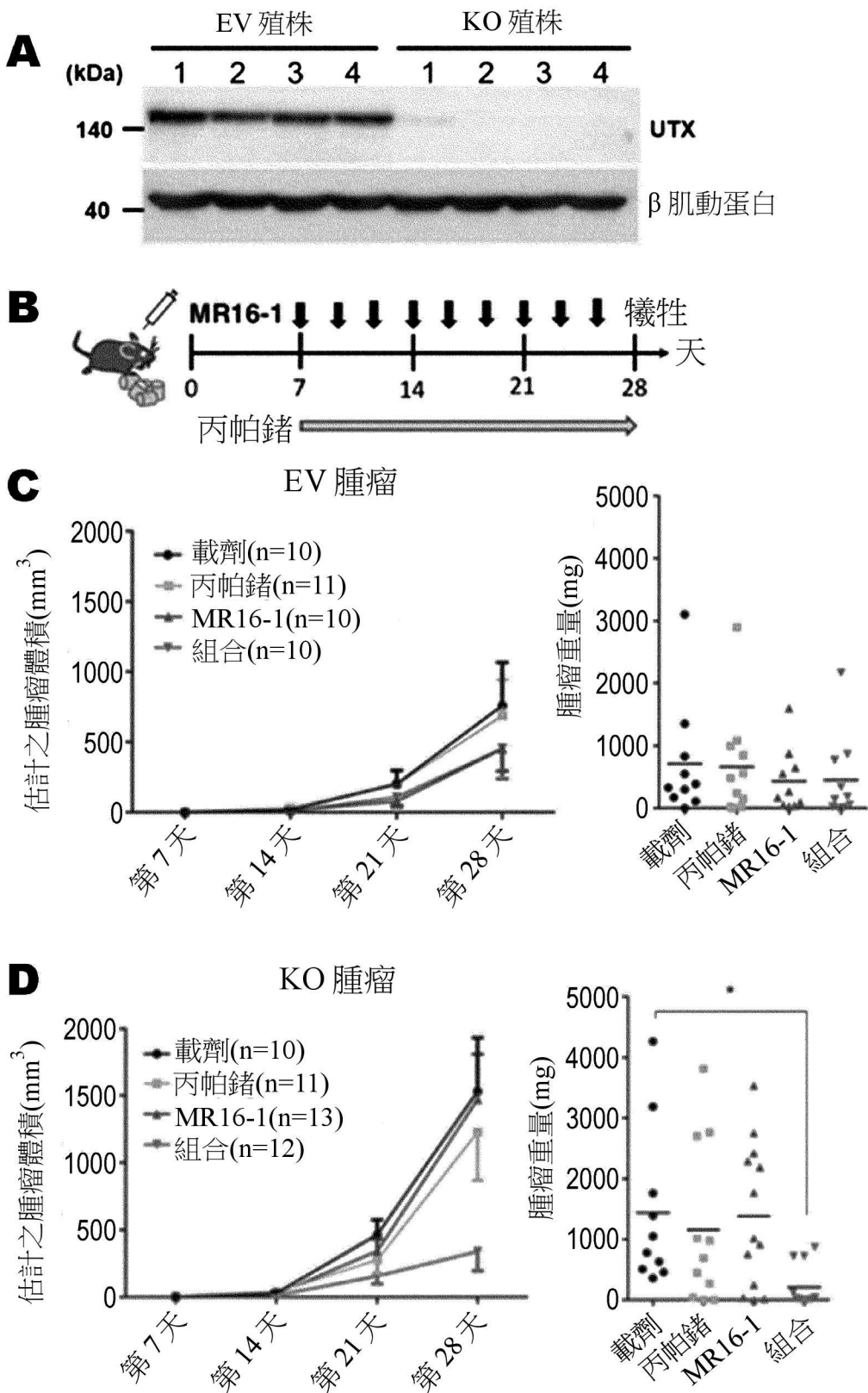


圖 3