

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02829803.9

C07H 21/04

A01K 67/00

A01H 5/00

C07K 16/00

A61K 39/395

C12N 15/00

[43] 公开日 2005 年 11 月 9 日

[11] 公开号 CN 1694894A

[22] 申请日 2002.10.26 [21] 申请号 02829803.9

[86] 国际申请 PCT/US2002/036213 2002.10.26

[87] 国际公布 WO2004/039826 英 2004.5.13

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.25

[71] 申请人 森托科尔公司

地址 美国宾夕法尼亚州

[72] 发明人 J·吉勒斯-科马 D·奈特

D·佩里特 M·特里克哈

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 李波 孟凡宏

权利要求书 7 页 说明书 68 页 序列表 5 页
附图 12 页

[54] 发明名称 抗 IL-6 抗体、组合物、方法和用途

[57] 摘要

本发明涉及至少一种来源于鼠 CLB-8 抗体的新的嵌合、人源化或 CDR 嫁接的抗 IL-6 抗体,包括编码至少一种所述抗 IL-6 抗体的分离核酸、IL-6、载体、宿主细胞、转基因动物或植物、及其制备方法和用途,包括治疗组合物、方法和设备。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种能够抑制人 IL-6 的嵌合、人源化或 CDR 嫁接的抗体或抗体片段，包含至少一个来源于抗 IL-6 鼠单克隆抗体 CLB-8 的重或轻链互补决定区 (CDR) 和来源于一种或多种人抗体的恒定区。
- 5 2. 根据权利要求 1 的 IL-6 抗体，包含至少一个包含 SEQ ID NO: 7 或 8 的重链或轻链可变区。
3. 根据权利要求 1 的抗体，它在体内完全抑制抗 IL-6 鼠 CLB-8 或与其具有基本相同的结合特征的抗体与人 IL-6 的结合。
4. 根据权利要求 1 的 IL-6 抗体或特定部分或变体，其中所述抗体或特定部分或变体以至少 10^{-9} M 的亲和力 (Kd) 与 IL-6 结合。
- 10 5. 根据权利要求 1 的 IL-6 抗体或特定部分或变体，其中所述抗体或特定部分或变体以至少 10^{-11} M 的亲和力 (Kd) 与 IL-6 结合。
6. 根据权利要求 1 的 IL-6 抗体或特定部分或变体，其中所述抗体或特定部分或变体以至少 10^{-12} M 的亲和力 (Kd) 与 IL-6 结合。
- 15 7. 根据权利要求 1 的 IL-6 抗体或特定部分或变体，其中所述抗体是包含至少一个来源于抗 IL-6 鼠单克隆抗体 CLB-8 的重或轻链可变区和来源于一种或多种人抗体的恒定区的嵌合抗体。
8. 根据权利要求 7 的 IL-6 抗体或特定部分或变体，其中所述抗体或特定部分或变体基本中和至少一种 IL-6 的至少一种活性。
- 20 9. 根据权利要求 8 的 IL-6 抗体或特定部分或变体，其中所述活性是选自下组的至少一种：抑制 SKW6.4 细胞分泌 IgM μ 、抑制 IL-6 介导的 MCP-1 产生、抑制 THP-1 人单核细胞白血病细胞中的 IL-6 信号传递、抑制 IL-6 诱导的 HepG2 细胞产生血清淀粉样蛋白 A、抑制 rhIL-6 诱导的细胞增殖。
- 25 10. 一种编码分离的 IL-6 抗体的核酸，包含在严格条件下与编码嵌合、人源化或 CDR 嫁接的抗体或其特定部分或变体杂交或与其具有至少 95% 同一性的核酸，它包含至少一个相当于或互补于 SEQ ID NOS: 1、2、3、4、5、6 中至少一个的至少 90-100% 连续核苷酸的互补决定区 (CDR) 编码序列。
- 30 11. 根据权利要求 10 的编码分离的 IL-6 抗体的核酸，其中所述核酸由至少一个相当于或互补于 SEQ ID NOS: 1、2、3、4、5、6 的至少一个的至少 90-100% 连续核苷酸的互补决定区 (CDR) 编码序列

组成。

12. 根据权利要求 10 的分离的核酸，编码至少一种具有至少一个包含 SEQ ID NO: 7 或 8 的可变区的抗 IL-6 抗体。

13. 一种分离的 IL-6 抗体或特定部分或变体，包含由权利要求 11 5 或 12 的核酸编码的分离的抗体或特定部分或变体。

14. 一种编码 IL-6 抗体的核酸组合物，包含权利要求 10 的分离核酸和载体或稀释剂。

15. 一种抗体载体，包含权利要求 10 的核酸。

16. 权利要求 15 的抗体载体，其中所述载体包含至少一种选自下 10 组的启动子：晚期或早期 SV490 启动子、CMV 启动子、HSV tk 启动子、pgk（磷酸甘油酯激酶）启动子、人免疫球蛋白启动子或 EF-1 α 启动子。

17. 权利要求 15 的抗体载体，其中所述载体包含至少一种选自下 15 组中至少一种的选择基因或其部分：氨甲喋呤(MTX)、绿色荧光蛋白（GFP）、二氢叶酸还原酶(DHFR)、新霉素(G418)、或谷氨酰胺合成酶（GS）。

18. 包含权利要求 10 的分离核酸的宿主细胞。

19. 根据权利要求 18 的宿主细胞，其中所述宿主细胞为至少一种 20 选自下组的细胞：COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, 骨髓瘤，或淋巴瘤细胞，或其任意衍生、永生或转化的细胞。

20. 一种生产至少一种 IL-6 抗体或特定部分或变体的方法，包括 25 在体外、体内或原位条件下翻译权利要求 10 的核酸或在严格条件下与其杂交的内源核酸，使得 IL-6 抗体或特定部分或变体以可检测或可回收量表达。

21. 一种 IL-6 抗体组合物或特定部分或变体组合物，包含权利要求 1 的 IL-6 抗体或特定部分或变体，以及载体或稀释剂。

22. 权利要求 21 的组合物，进一步包含至少一种选自下组的至少 30 一种化合物或蛋白：TNF 拮抗剂、抗风湿药物、肌肉松弛剂、麻醉药、非甾体类抗炎药(NSAID)、镇痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、糖尿病相关试剂、矿物质、营养剂、甲状腺制剂、维生

素、钙相关激素、抗腹泻药、止咳药、抗呕吐药、抗溃疡药、通便药、抗凝剂、促红细胞生成素、非尔司啉、沙拉斯、疫苗、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢药、有丝分裂抑制剂、放射性药物、
5 抗抑郁剂、抗精神病药物、抗躁狂药、抗精神病药物、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药物、刺激剂、donepezil、他克林、抗哮喘药、 β 激动剂、吸入性类固醇、白三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、9-氨基四氢吡啶、肾上腺素或类似物、 α 链道酶、细胞因子、细胞因子拮抗剂。

23.一种治疗细胞、组织、器官或动物中的免疫病症或疾病的方法，
10 包括：使所述细胞、组织、器官或动物接触或给予所述细胞、组织、器官或动物至少一种选定的免疫调节有效量的至少一种权利要求 1 的 IL-6 抗体或特定部分或变体。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述动物是灵长类动物。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述灵长类动物是猴或人。

15 26. 权利要求 25 的方法，其中所述免疫状况是选自下组的至少一种：类风湿性关节炎/血清阴性关节病、骨关节炎、炎性肠病、系统性红斑狼疮、虹膜睫状体炎/葡萄膜炎/视神经炎、特发性肺纤维化、系统性血管炎/韦格纳肉芽肿、肉样瘤病、睾丸炎/输精管切除逆转程序、
20 过敏性/特应性疾病、哮喘、过敏性鼻炎、湿疹、过敏性接触性皮炎、过敏性结膜炎、过敏性肺炎、移植、器官移植排斥、移植物抗宿主疾病、全身炎症反应综合征、脓毒症综合征、革兰氏阳性菌脓毒症、革兰氏阴性菌脓毒症、培养阴性菌脓毒症、真菌脓毒症、中性粒细胞减少性发热、尿脓毒症、脑膜炎球菌血症、创伤/出血、烧伤、离子辐射暴露、急性胰腺炎、成人呼吸窘迫综合征、系统性红斑狼疮和类风湿
25 性关节炎、酒精诱导的肝炎、慢性炎性病变、肉样瘤病、克隆氏病、镰状细胞贫血、糖尿病、肾病、特应性疾病、过敏反应、过敏性鼻炎、枯草热、终年性肺炎、结膜炎、哮喘、风疹、全身过敏、皮炎、恶性贫血、溶血性疾病、血小板减少症、任何器官或组织的移植排斥、肾移植排斥、心脏移植排斥、肝移植排斥、胰腺移植排斥、肺移植排斥、
30 骨髓移植(BMT)排斥、皮肤同种异体移植排斥、软骨移植排斥、骨移植排斥、小肠移植排斥、胎儿胸腺移植排斥、甲状旁腺移植排斥、任何器官或组织的异种移植排斥、同种异体排斥、抗受体过敏反应、格

雷夫斯病、雷诺氏病、B型胰岛素抵抗糖尿病、哮喘、重症肌无力、抗体介导的细胞毒性、III型过敏反应、系统性红斑狼疮、天疱疮、硬皮病、混合性结缔组织病、特发性阿狄森氏病、糖尿病、慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、白癜风、血管炎、MI心脏切开后综合征、IV型过敏、接触性皮炎、过敏性肺炎、同种异体排斥、细胞内生物引起的肉芽肿、药物过敏、代谢性/特发性威尔逊氏病、血色素沉着病、 α -1-抗胰凝乳蛋白酶缺陷、糖尿病肾病、桥本氏甲状腺炎、骨质疏松症、下丘脑-垂体-肾上腺轴评估、原发性胆汁性肝硬化、甲状腺炎、脑脊髓炎、恶液质、囊性纤维化、家族性血巨噬细胞淋巴细胞组织细胞增多症、皮肤病学状况、牛皮癣、斑秃、肾病综合征、肾炎、血液透析、尿毒症、中毒、okt3治疗、抗cd3治疗、细胞因子治疗、化疗、放疗（如包括，但不限于虚弱、贫血、恶液质等）、慢性水杨酸盐中毒。

27. 权利要求 23 的方法，其中所述有效量是 0.001-50mg/kg 所述细胞、组织、器官或动物。

28. 权利要求 28 的方法，其中所述有效量是 0.0001-50mg/kg 所述细胞、组织、器官或动物。

29. 一种调节细胞、组织、器官或动物中的至少一种癌性病征或状况的方法，包括：使所述细胞、组织、器官或动物接触或给予所述细胞、组织、器官或动物至少一种选定的感染调节有效量的至少一种权利要求 1 的 IL-6 抗体或特定部分或变体。

30. 权利要求 29 的方法，其中所述动物是灵长类动物。

31. 权利要求 30 的方法，其中所述灵长类动物是猴或人。

32. 权利要求 29 的方法，其中所述感染性或癌性病征或状况是选自下组的至少一种：白血病、急性白血病、急性成淋巴细胞白血病 (ALL)、B 细胞、T 细胞或 FAB ALL、急性髓细胞白血病 (AML)、慢性髓细胞白血病 (CML)、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、毛细胞白血病、骨髓发育不良综合征 (MDS)、淋巴瘤、何杰金氏病、恶性淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、布加氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、卡波西肉瘤、结直肠癌、胰腺癌、肾细胞癌、前列腺细胞癌、鼻咽癌、恶性组织细胞增多症、副癌综合征/恶性高钙血症、实体瘤、腺癌、肉瘤和恶性黑色素瘤。

33. 权利要求 23 的方法，其中所述有效量是 0.01-100mg/kg 所述

细胞、组织、器官或动物。

34. 权利要求 23-33 的任一项的方法，其中所述接触或给药是通过选自下组的至少一种模式：静脉内、肌内、快速注射、皮下、呼吸道、吸入、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内或经皮。

5 35. 权利要求 23-33 的任一项的方法，进一步包括在所述(1)接触或给药之前、同时和/或之后，给予至少一种包含治疗有效量的至少一种选自下组的至少一种化合物或蛋白的组合物：TNF 拮抗剂、抗风湿药物、肌肉松弛剂、麻醉药、非甾体类抗炎药(NSAID)、镇痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、糖尿病相关试剂、矿物质、营养剂、甲状腺制剂、维生素、钙相关激素、抗腹泻药、止咳药、抗呕吐药、抗溃疡药、通便药、抗凝剂、促红细胞生成素、非尔司啉、沙拉斯、疫苗、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢药、有丝分裂抑制剂、放射性药物、抗抑郁剂、抗精神病药物、抗躁狂药、抗精神病药物、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药物、刺激剂、donepezil、他克林、抗哮喘药、 β 激动剂、吸入性类固醇、白三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、9-氨基四氢吡啶、肾上腺素或类似物、 α 链道酶、细胞因子、细胞因子拮抗剂。

10 15 20 36. 一种医学设备，包含至少一种权利要求 1 的 IL-6 抗体或特定部分或变体，其中所述设备适用于通过选自下组的至少一种模式接触或给予所述至少一种 IL-6 抗体或特定部分或变体：静脉内、肌内、快速注射、皮下、呼吸道、吸入、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内或经皮。

25 37. 一种人抗体或其特定部分或变体，其中所述抗体或特定部分或变体与权利要求 1 的 IL-6 抗体或特定部分或变体结合相同的表位或抗原性区域。

30 38. 一种制剂，包含至少一种权利要求 1 的 IL-6 抗体或特定部分或变体和选自无菌水和无菌缓冲水的至少一种物质或至少一种选自下组的防腐剂：苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、亚硝酸苯汞、苯氧基乙醇、甲醛、氯丁醇、氯化镁、对羟基苯甲酸烷基酯、苯扎氯铵、苯索氯铵、脱氢乙酸钠和乙基汞硫代水杨酸钠，或其

在一种水性稀释液中的混合物。

39. 权利要求 38 的制剂，其中 IL-6 抗体或特定部分或变体的浓度是大约 0.1mg/ml - 大约 100mg/ml。

40. 权利要求 39 的制剂，还包含等渗剂。

5 41. 权利要求 39 的制剂，还包含生理可接受的缓冲剂。

42. 一种制剂，包含第一容器中的冻干形式的至少一种权利要求 1 的 IL-6 抗体或特定部分或变体和任选的第二容器，所述容器包含无菌水、无菌缓冲水、或选自下组的至少一种防腐剂：苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、亚硝酸苯汞、苯氧基乙醇、甲醛、
10 氯丁醇、氯化镁、对羟基苯甲酸烷基酯、苯扎氯铵、苯索氯铵、脱氢乙酸钠和乙基汞硫代水杨酸钠，或其在水性稀释液中的混合物。

43. 权利要求 42 的制剂，其中 IL-6 抗体或特定部分或变体的浓度重构为大约 0.1mg/ml - 大约 500mg/ml 的浓度。

44. 权利要求 42 的制剂，还包含等渗剂。

15 45. 权利要求 42 的制剂，还包含生理可接受的缓冲剂。

46. 一种治疗至少一种 IL-6 介导的状况的方法，包括给予有需要的患者权利要求 42 的制剂。

47. 一种治疗至少一种 IL-6 介导的状况的方法，包括给予有需要的患者权利要求 42 的制剂。

20 48. 一种人类药用制品，包含包装材料和容器，容器中含有溶液或冻干形式的至少一种权利要求 1 的 IL-6 抗体或特定部分或变体。

49. 权利要求 49 的制品，其中所述容器是具有用于多次使用给药的停止器的玻璃或塑料容器。

25 50. 权利要求 49 的制品，其中所述容器是起泡包装，能够被刺穿并且用于静脉内、肌内、快速注射、皮下、呼吸道、吸入、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内或经皮给药。

51. 权利要求 49 的制品，其中所述容器是静脉内、肌内、快速注射、皮下、呼吸道、吸入、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内或经皮递送设备或系统的一个成分。

30 52. 权利要求 49 的制品，其中所述容器是用于静脉内、肌内、快速注射、皮下、呼吸道、吸入、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内或经皮给药的注射器或笔式注射器设备或系统的一个成分。

53. 一种制备至少一种 IL-6 抗体或特定部分或变体的制剂的方法，包括在至少一种含盐水或盐的缓冲液中混合至少一种权利要求 1 的 IL-6 抗体或特定部分或变体。

54. 一种制备至少一种权利要求 1 的 IL-6 抗体或特定部分或变体的制剂的方法，包括提供能够以可回收量表达所述抗体或特定部分或变体的宿主细胞或转基因动物或转基因植物或植物细胞。

55. 权利要求 54 的方法，其中所述宿主细胞是哺乳动物细胞、植物细胞或酵母细胞。

56. 权利要求 54 的方法，其中所述转基因动物是哺乳动物。

57. 权利要求 56 的方法，其中所述转基因哺乳动物选自山羊、牛、绵羊、马和非人灵长类动物。

58. 表达至少一种权利要求 1 的抗体的转基因动物或植物。

59. 由权利要求 54 的方法制备的至少一种 IL-6 抗体或特定部分或变体。

60. 一种分离的 IL-6 嵌合、人源化或 CDR 嫁接的抗体或其特定部分或变体，包含鼠可变区和人恒定区，其中所述抗体或特定部分或变体特异性结合包含人 IL-6 的氨基酸 Gln29 - Lev34 中至少 1-3 个氨基酸的至少一种表位。

61. 权利要求 60 的 IL-6 抗体或特定部分或变体，其中所述抗体或特定部分或变体以至少 10^{-9} M 的亲和力与 IL-6 结合。

62. 权利要求 60 的 IL-6 抗体或特定部分或变体，其中所述抗体或特定部分或变体以至少 10^{-11} M 的亲和力与 IL-6 结合。

63. 权利要求 60 的 IL-6 抗体或特定部分或变体，其中所述抗体或特定部分或变体以至少 10^{-12} M 的亲和力与 IL-6 结合。

64. 权利要求 60 的 IL-6 抗体或特定部分或变体，其中所述抗体或特定部分或变体基本中和至少一种活性。

65. 权利要求 64 的 IL-6 抗体或特定部分或变体，其中所述活性是选自下组的至少一种：抑制 IL-6 诱导的 IFN- γ 分泌、抑制 LAK 细胞毒性、抑制 IFN γ mRNA 转录、抑制细胞内 IFN γ CD3+ 细胞和 CD95 表达。

抗 IL-6 抗体、组合物、方法和用途

发明背景

5 发明领域

本发明涉及至少一种白介素-6(IL-6, 也称作干扰素 β 2)蛋白或其片段的特异性抗体, 包括特定的部分或变体, 以及编码所述抗 IL-6 抗体的核酸、其互补核酸、载体、宿主细胞及其准备方法和用途, 包括治疗制剂、给药和设备。

10

背景技术

白介素-6(IL-6)是一种由多种不同的细胞类型产生的促炎细胞因子。体内刺激的单核细胞、成纤维细胞和内皮细胞代表了 IL-6 的主要来源。其它细胞, 如巨噬细胞、T 和 B 淋巴细胞、粒细胞、角质形成细胞、肥大细胞、成骨细胞、软骨细胞、胶质细胞和平滑肌细胞在刺激后也产生 IL-6(Kishimoto, T., *Blood* 74: 1-10(1989)和 Kurihara, N. et al., *J. Immunology* 144: 4226-4230 (1990))。一些肿瘤细胞也产生 IL-6 (Smith, P. C. et al. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 12: 33-40 (2001)), 并且最近表明 IL-6 是前列腺癌进展的预后因子(Nakashima, J. et al. *Clinical Cancer Research* 6: 2702-2706(2000))。可以通过 IL-6 自身调节 IL-6 产生, 并且取决于细胞类型, IL-6 可以刺激或抑制其自身的合成。

IL-6 可以与有丝分裂原激活的 B 细胞、T 细胞、外周单核细胞和某些肿瘤上表达的 IL-6 受体结合(Ishimi, Y. et al., *J. Immunology* 145: 3297-3303 (1990))。IL-6 受体具有至少两种不同的成分, 并且由负责 IL-6 结合的称作 gp80 的 α 链和信号传导所需的称作 gp130 的 β 链组成 (Adebanjo, O. et al., *J. Cell Biology* 142: 1347-1356 (1998) and Poli, V. et al., *EMBO* 13: 1189-1196 (1994))。包括 IL-6, LIF, 制癌蛋白 M, IL-11, CNTF 和 CT-1 的细胞因子家族在其受体中均具有 gp130 亚基。此外, IL-6 细胞因子的所有成员都可以诱导急性期蛋白的肝表达(Bellido, T. et al., *J. Clin. Investigation* 97: 431-437 (1996))。87908790。

IL-6 有至少两种主要的生物学功能：介导急性期蛋白和作为分化和激活因子(Avvisti, G. et al. , *Baillieres Clinical Hematology* 8: 815-829 (1995) 和 Poli, V. et al. , *EMBO* 13: 1189-1196 (1994))。已知急性期蛋白调节免疫应答，介导炎症，并且在组织重塑中起作用。作为分化和激活因子，IL-6 诱导 B 细胞分化和分泌抗体，它诱导 T 细胞分化为细胞毒性 T 细胞，激活细胞信号传递因子，并且促进造血(Ishimi, Y. et al., *J. Immunology* 145: 3297-3303 (1990))。IL-6 显著参与许多关键的身体功能和过程。因此，可以采用抗体操作 IL-6 的体内生物活性而增强、阻抑或防止包括骨代谢、肿瘤性转化以及免疫和炎症反应的生理过程(Adebanjo,O. et al. , *J. Cell Biology* 142: 1347-1356 (1998))。

尽管 IL-6 参与许多途径，IL-6 剔除小鼠具有正常的表型，它们可以存活并且是可育的，并且这些动物表现出 T 细胞数目的少量减少以及对组织损伤的急性期蛋白反应的减少 (Kopf M et al., *Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice*, *Nature*; 368 (6469):339-42, 1994)。相反，超量表达 IL-6 的转基因小鼠发生神经病，如神经退化、星形胶质细胞增多、脑血管发生，并且这些小鼠不发育出血脑屏障 (Campbell et al., *Neurologic Disease Induced in Transgenic Mice by cerebral Overexpresion of Interleukin 6* *PNAS* 90:10061-10065. 1993)。

最近的研究表明，IL-6 的单克隆抗体可以抑制前列腺肿瘤 (Smith, P. C. and Keller, E. T. , *The Prostate in press* 和 Okamoto, M. etal., *Cancer Research* 57: 141-146 (1997)和肾癌(Weissglas, M. etal., *The Journal of Urology* 153: 554-557 (1995))的体内生长。除了对肿瘤生长的直接作用，阻断 IL-6 产生也可以化学致敏和增强细胞毒性效力 (Smith, P. C. et al. *Cytokine and Growth Factor Reviews* 12: 33-40 (2001))。总体上，文献教导我们，阻断 IL-6 活性可以抑制骨降解、肿瘤生长和癌症恶液质。

采用非人、多克隆(如抗血清)或单克隆抗体(Mabs)及其片段(如其蛋白水解消化产物)的被动免疫是被开发为多种疾病的疗法的可能治疗剂。然而，已知由非人部分组成的抗体在给予人时引发免疫应答。该免疫应答使得重复的抗体给药通常不适于治疗，并且可能导致免疫

复合物介导的抗体从循环中的清除，从而降低了对患者的治疗益处。由非人部分组成的抗体的重复给药可能导致的状况的例子是血清病和过敏。

5 在尝试避免这些和其它问题的尝试中，已采用了包括嵌合和“人源化”的许多方法，以降低抗体/其片段的免疫原性。这些方法产生了具有降低的免疫原性的抗体。这些抗体基本是来源于人的，只有互补决定区(CDR's)和某些影响 CDR 构象的构架残基是来源于人的。因此，新的人或人源化单克隆抗体特别可以单独或与现存的分子联合用于免疫治疗用途。

10 因此，需要提供能够克服这些问题中的一个或多个的高度亲和的、中和性嵌合或人抗 IL-6 抗体或片段，以及改进已知的抗体或其片段，用于防止、治疗、缓解或诊断与 IL-6 相关的状况。

由杂交瘤细胞系产生的鼠单克隆抗 IL-6 抗体见例如，美国专利 5,618,700。美国专利 5,856,135 公开了来源于小鼠抗体 SK2 的人 IL-6 15 的重塑的人抗体，其中来自于小鼠抗体 SK2 的可变区的互补决定区(CDR's)被移植到人抗体的可变区，并且与人抗体的恒定区连接。

已经描述了其它鼠单克隆抗体，并且分类为阻止受体结合的中和性抗体或非中和性抗体(Brakenhoff et al, J. Immunol. (1990) (145: 561)。在该组抗体中，IL-6 的中和性抗体可以分为两组；IL-6 分子 20 上的推测表位称作位点 I 和位点 II。位点 I 阻止与 gp80 (IL6R)的结合，并因此阻止 gp130 活化。位点 I 表位进一步的特征在于包含 IL-6 分子的氨基末端和羧基末端部分。位点 2 结合物阻止 gp130 活化并因此可以识别参与信号传递的构象表位。

称作 CLB-8 的鼠 IL-6 单克隆抗体是已知的，它具有高亲和力并且结合位点 I gp130 表位(Brakenhoff et al supra)。但是，如上文所述，鼠抗体在人体内是高度免疫原性的，因此它的治疗价值是有限的。仍然需要具有高亲和力以及有利的药理学曲线的 IL-6 抗体。

发明概述

30 本发明提供如这里所描述和实现的分离的人、灵长类、啮齿类、哺乳动物、嵌合、人源化和/或 CDR 嫁接的抗 IL-6 抗体、免疫球蛋白、其裂解产物及特定的部分和变体，以及抗 IL-6 抗体组合物、其编码

或互补核酸、载体、宿主细胞、组合物、制剂、设备、转基因动物、转基因植物及其制备方法和用途，它们结合了本领域已知的成分。本发明的抗体以高亲和力特异性中和人 IL-6。

5 本发明提供了至少一种此处描述的分离的嵌合、人源化或 CDR 嫁接的抗 IL-6 CLB-8 抗体 (“cCLB-8 抗体”)。本发明的 cCLB-8 抗体包括任何包含至少一种来源于鼠 CLB-8 单克隆抗体的重链或轻链互补决定区(CDR)或其配体结合部分的蛋白或肽分子，它们与可以掺入本发明的抗体的重链或轻链恒定区、构架区、或其任意部分结合。在一种实施方案中，本发明涉及包含两个轻链和两个重链的抗 IL-6 嵌合
10 抗体，每条链包含人恒定区的至少一部分和来源于对人 IL-6 具有特异性的鼠 c-CLB8 单克隆抗体可变区(v)的至少一部分，所述抗体以高亲和力与人 IL-6 的抑制性和/或中和性表位结合，如抗体 cCLB-8。本发明还包括所述抗体的片段或衍生物，如抗体链的一个或多个部分，如重链恒定区、连接区或可变区，或轻链恒定区、连接区或可变区。

15 所述抗体可以包含来源于鼠 CLB-8 单克隆抗体的至少一种互补决定区(CDR) (如重链或轻链可变区的 CDR1、CDR2 或 CDR3) 的至少一个特定部分，和/或至少一种恒定区或可变区构架区或其任意部分。抗体氨基酸序列可以进一步任选包含至少一种此处描述或本领域公知的特定取代、插入或缺失。

20 本发明的优选抗体包括那些嵌合的、人源化的和/或 CDR 嫁接的抗体，它们将竞争性抑制与人 IL-6 的体内结合，所述抗体包括抗 IL-6 鼠 CLB-8、嵌合抗 IL-6 CLB-8、或具有基本相同的结合特征的抗体，及其片段或区域。

25 本发明的优选抗体是那些结合由 CLB-8 和 cCLB-8 识别的表位的抗体，所述表位包括在 Brackenhoff 等 (上文) 描述的位点 I 表位中。用于通过竞争性抑制确定单克隆抗体特异性和亲和力的优选方法可见于 Harlow, et al, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1988), 在此引入本申请中作为参考。本发明的至少一种抗体结合至少一种特异于至少一种 IL-6 蛋白、其亚基、片段、部分或其任意组合的特定表位。
30 所述至少一种表位可以包含至少一种抗体结合区，它包含所述蛋白的至少一部分，该表位优选由其至少一部分的至少 1-5 个氨基酸组成，

所述至少一部分例如，但不限于，所述蛋白的至少一个功能性、细胞外、可溶的、亲水的、外部或细胞质结构域，或其任意部分。

一方面，本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗 IL-6 cCLB-8 抗体，包含至少一种包含 SEQ ID NO:7 或 8 的可变区及其编码核苷酸序列 (SEQ ID NO:15 或 16)。

另一方面，本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗 IL-6 cCLB-8 抗体，包含 (i) SEQ ID NOS:1, 2 和 3 的全部重链互补决定区(CDR) 氨基酸序列及其编码核苷酸序列 (SEQ ID NO:9 - 11); 或(ii)SEQ ID NOS:4, 5 和 6 的全部轻链 CDR 氨基酸序列及其编码核苷酸序列 (SEQ ID NO:12 - 14)。

另一方面，本发明提供了至少一种分离的哺乳动物抗 IL-6 cCLB-8 抗体，包含具有 SEQ ID NOS:1, 2, 3, 4, 5 或 6 的至少一种的氨基酸序列的至少一种重链或轻链 CDR 及其编码核苷酸序列 (SEQ ID NO:9 - 14)。

另一方面，本发明提供了至少一种分离的哺乳动物嵌合、人源化或 CDR 嫁接的抗 IL-6 cCLB-8 抗体，包含至少一种人 CDR，其中所述抗体特异性结合于包含人 IL-6 的至少 1 - 3 个氨基酸的至少一种表位，它结合 cCLB-8 抗体。

所述至少一种抗体可以任选进一步以至少 10^{-9} M、优选至少 10^{-10} M 的亲合力 (Kd) 结合 IL-6，和/或基本上中和至少一种 IL-6 蛋白的至少一种活性。在一种优选的实施方案中，所述抗体以至少 1×10^{-11} M 的亲合力 (Kd) 结合 IL-6，优选以 5×10^{-11} M 的亲合力中和人 IL-6。

本发明的一方面提供了一种分离的核酸分子，它包含、互补于或杂交于编码前述特异性抗 IL-6 抗体的多核苷酸，包括其至少一个特定序列、结构域、部分或变体。本发明进一步提供了包含所述抗 IL-6 抗体的核酸分子的重组载体，含所述核酸和/或重组载体的宿主细胞，以及这种抗体核酸、载体和/或宿主细胞的制备方法和/或使用方法。因此，本发明包括编码至少一种分离的哺乳动物抗 IL-6 cCLB-8 抗体的核酸；包含所述分离的核酸的分离的核酸载体，和/或包含所述分离的核酸的原核或真核宿主细胞。所述宿主细胞可以任选是选自下组的至少一种：COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, 骨髓瘤，或淋巴瘤细胞，或其任意衍生、永生

化或转化的细胞。还提供了产生至少一种抗 IL-6 cCLB-8 抗体的方法，包括在体外、体内或原位条件下翻译抗体编码核酸，使得 IL-6 抗体以可检测或可回收的量表达。

5 本发明进一步提供了本发明的至少一种 cCLB-8 抗 IL-6 抗体的至少一种 IL-6 抗独特型抗体。该抗独特型抗体包括任何含有包含免疫球蛋白分子的至少一部分的分子的蛋白或肽，所述部分可以是，但不限于可以掺入本发明抗体的抗独特型抗体的至少一种重链或轻链或其配体结合部分的互补决定区(CDR)、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、构架区、或其任意部分。本发明的抗独特型抗体可以包括或
10 来源于任何哺乳动物，例如，但不限于人、小鼠、兔、啮齿类动物、灵长类动物等。

本发明的一方面提供一种分离的核酸分子，它包含、互补于或杂交于一种编码至少一种 IL-6 抗独特型抗体的多核苷酸，该抗体包含至少一种其特定序列、结构域、部分或变体。本发明进一步提供了包
15 含所述 IL-6 抗独特型抗体的编码核酸分子的重组载体，含所述核酸和/或重组载体的宿主细胞，以及这种抗独特型抗体核酸、载体和/或宿主细胞的制备方法和/或使用方法。

本发明也提供了至少一种在宿主细胞中表达至少一种前述抗 IL-6 抗体、或 IL-6 抗独特型抗体的方法，包括按照此处的描述在至少一
20 种抗 IL-6 抗体以可检测和/或可回收的量表达的条件下培养宿主细胞。

本发明也提供了至少一种组合物，它包含(a)如此处描述的分离的抗 IL-6 cCLB-8 抗体的编码核酸和/或抗体；和(b)合适的载体或稀释液。载体或稀释液可以任选是药学可接受的已知载体或稀释液。该组
25 合物可以任选进一步包含至少一种其它的化合物、蛋白或组合物。

本发明进一步提供了至少一种抗 IL-6 cCLB-8 抗体方法或组合物，用于在本领域已知的和/或这里所描述的相关状况之前、之后或之时以治疗有效量给药，以便调节或治疗细胞、组织、器官、动物或病人中的至少一种 IL-6 相关状况。因此，本发明还提供了一种诊断或
30 治疗细胞、组织、器官、或动物中的 IL-6 相关状况的方法，包括使所述细胞、组织、器官、或动物接触或给予所述细胞、组织、器官、或动物包含有效量的至少一种分离的本发明的抗 IL-6 CLB-8 抗体的

组合物。该方法可任选进一步包括使用 0.001-50 mg/kg 细胞、组织、器官、或动物的有效量。该方法可任选进一步包括通过选自下组的至少一种方式进行接触或给药：肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、5 支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、盆腔内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、快速注射、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内或经皮。该方法可任选进一步包括进一步包括在所述接触或给药之前、同时或之后给予至少一种包含有效量的选自下组的至少10 一种化合物或蛋白的组合物：至少一种可检测标记或报道分子、TNF 拮抗剂、抗风湿药物、肌肉松弛剂、麻醉药、非甾体类抗炎药(NSAID)、镇痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、促红细胞生成素、疫苗、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素替代药物、放射性药物、抗抑郁剂、抗精神病药物、刺激剂、抗哮喘药、 β 激动剂、15 吸入性类固醇、肾上腺素或类似物、细胞因子或细胞因子拮抗剂。

本发明进一步提供了至少一种抗 IL-6 cCLB-8 抗体方法，用于在本领域已知的和/或这里所描述的相关状况之前、之后或之时诊断细胞、组织、器官、动物或病人中的至少一种 IL-6 相关状况。

20 本发明也提供了至少一种用于诊断本发明的至少一种抗 IL-6 抗体的至少一种组合物、设备和/递送或方法。

还提供了一种包含至少一种分离的嵌合抗 IL-6 cCLB-8 抗体和至少一种药学可接受载体或稀释剂的组合物。所述组合物可以任选进一步包含有效量的至少一种选自下组的至少一种化合物或蛋白：可检测25 标记或报道分子、细胞毒性或其它抗癌剂、抗代谢药如氨甲喋呤、抗增殖剂、细胞因子或细胞因子拮抗剂、TNF 拮抗剂、抗风湿药物、肌肉松弛剂、麻醉药、非甾体类抗炎药(NSAID)、镇痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、促红细胞生成素、疫苗、免疫球蛋白、免疫抑制剂、生长激素、激素替代药物、放射性药物、抗抑郁剂、30 抗精神病药物、刺激剂、抗哮喘药、 β 激动剂、吸入性类固醇、肾上腺素或类似物。

本发明还提供了一种医学设备，包含本发明的至少一种分离的哺乳动物抗 IL-6 抗体，其中所述设备适于所述至少一种抗 IL-6 抗体的接触或给药，该接触或给药是通过选自下组的至少一种方式进行的：
5 肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、盆腔内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、快速注射、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内或经皮。

还提供了一种用于人药用或诊断用途的制品，包括包装材料和一个容器，其中包含至少一种本发明的分离的哺乳动物抗 IL-6 抗体的溶液或冷冻干燥形式。所述制品可以任选包含至少一个作为肠胃外、
10 皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、盆腔内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、
15 直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、快速注射、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内或经皮递送设备或系统的成分的容器。

本发明进一步提供了此处描述的任何发明。

20 附图说明

图 1: 表示 cCLB8 与人重组 IL-6 的结合的曲线图。

图 2: 表示 cCLB8 抑制 SKW6.4 细胞分泌 IL-6 介导的 IgM mu 分泌的曲线图。

图 3: 表示 cCLB8 抑制 IL-6 介导的 MCP-1 产生的曲线图。

25 图 4: 表示 cCLB8 抑制 THP-1 人单核细胞白血病细胞中的 IL-6 信号传递的图像。

图 5: 表示 cCLB8 抑制 IL-6 诱导的 HepG2 细胞产生血清淀粉样 A 的曲线图。

图 6: 表示 cCLB8 中和 rhIL-6 诱导的细胞增殖能力的曲线图。

30 图 7: 表示用抗人和抗小鼠 IL-6 抗体处理的携带人肿瘤的小鼠中宿主体重损失的相对减少的曲线图。

图 8A - C: 表示 7 种抗独特型抗体的血清抑制研究曲线的曲线图。

图 9: 表示抗独特型单克隆抗体抑制 cCLB8 与人 IL-6 结合的曲线图。

图 10: 表示抗独特型抗体与预先结合于人 IL-6 的 cCLB-8 的结合。

5 发明详述

引用文献

在此引入这里所引用的所有出版物或专利的完整内容作为参考，它们显示了本发明时的技术状态和/或为本发明提供了说明并使本发明成为可能。出版物是指任何科学或专利公开，或可以用任何媒体形式，包括所有录音、电子或印刷形式获得的任何其它信息，在此全文引入以下对比文献作为参考：Ausubel, et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001) ; Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

氨基酸代码

组成本发明的抗 IL-6 抗体的氨基酸通常以缩写表示，可以通过单字母代码、三字母代码、名称或三核苷酸密码子表示氨基酸，这是本领域公知的（见(see Alberts, B., et al., *Molecular Biology of The Cell*, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994).

定义

这里用到的“抗白介素 6 CLB-8 抗体”、“抗 IL-6 CLB-8 抗体”、“抗 IL-6 CLB-8 抗体部分”或“抗 IL-6 CLB-8 抗体片段”和/或“抗 IL-6 CLB-8 抗体变体”等包括任何含有一种分子的肽或多肽，该分子包含免疫球蛋白分子的至少一部分，包括来源于鼠 CLB-8 单克隆抗体的至少一种重链或轻链的互补决定区(CDR)或其配体结合部分，它可以掺入到本发明的抗体中的重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、构架区或其任意部分结合。这种抗体任选进一步影响特异性配体，例如，但不限于，这些抗体调节、减少、增加、拮抗、激动、减轻、

缓解、阻断、抑制、消除和/或干扰至少一种 IL-6 活性或结合，或在体外、原位和/或体外具有 IL-6 受体活性或结合。作为非限制性的例子，本发明的适当抗 IL-6 抗体、特定部分或变体可以高亲和力结合人 IL-6 的抑制和/或中和表位。适当的抗 IL-6 抗体、特定部分或变体也可以任选影响至少一种 IL-6 活性或功能，例如，但不限于，RNA、DNA 或蛋白合成，IL-6 释放，IL-6 受体信号传递、膜 IL-6 裂解、IL-6 活性、IL-6 产生和/或合成。

术语“抗体”进一步包含抗体、其消化片段、特定部分和变体，包括抗体模拟物或包括模拟抗体或其特定片段或部分的结构和/或功能的抗体部分，包括单链抗体及其片段；每一个均包含至少一个来源于 CLB-8 单克隆抗体的 CDR。功能性片段包括与哺乳动物 IL-6 结合的抗原结合片段。例如，本发明也包括能够与 IL-6 或其部分结合的抗体片段，包括但不限于 Fab（例如通过木瓜蛋白酶消化），Fab'（如通过胃蛋白酶消化和部分还原）和 F(ab')₂（如通过胃蛋白酶消化），facb（如通过纤溶酶消化），pFc'（如通过胃蛋白酶或纤溶酶消化），Fd（如通过胃蛋白酶消化、部分还原和再聚集），Fv 或 scFv（如通过分子生物学技术）片段（见例如，Colligan, Immunology, 同上）。

这些片段可以通过如本领域公知的和/或这里描述的酶促裂解、合成或重组技术而产生。也可以用抗体基因产生各种截短形式的抗体，在这些基因中天然终止位点的上游导入了一个或多个终止密码子。例如可以设计一种编码 F(ab')₂ 重链部分的组合基因，使其包含编码重链 CH₁ 结构域和/或铰链区的 DNA 序列。可以通过常规技术将抗体的各部分以化学方式连接在一起，或用基因工程技术制备作为连续蛋白的抗体的各部分。

这里使用的“嵌合”抗体或“人源化”抗体或“CDR 嫁接的”抗体包括上述鼠 CDR 与一种或多种来源于非鼠，优选人抗体的蛋白或肽的组合。根据本发明，提供了嵌合的或人源化的抗体，其中 CDR 来源于能够结合人 IL-6 的鼠 CLB-8 抗体，并且抗体的至少一部分，或其部分来源于一种或多种人抗体。因此，抗体的人部分可以包括构架区，C_L，C_H 结构域（如 C_{H1}，C_{H2}，C_{H3}），铰链区，(VL, VH) 区，它们在人类中基本是非免疫原性的。来源于人抗体的抗体区域不需要与人抗体具有 100% 的同一性。在一种优选的实施方案中，包括尽可能多

的人氨基酸残基，以使免疫原性可忽略，但可以根据需要修饰人残基以支持 CDR 形成的抗原结合位点，同时使抗体的人源化最大。这种改变或变异相对于未修饰抗体任选并优选保留或减少人类在人或其它物种中的免疫原性。已经指出，人抗体可以由能够表达功能性重排的人免疫球蛋白（如重链和/或轻链）基因的非人动物或原核或真核细胞产生。此外，当人抗体是单链抗体时，它可以包含在天然人抗体中不存在的连接肽。例如，Fv 可以包含连接肽，例如大约 2-8 个甘氨酸或其它氨基酸残基，它们连接重链可变区和轻链可变区。这种连接肽被认为是来源于人的。

10 本发明的抗体

根据本发明，嵌合的抗 IL-6 cCLB-8 抗体是一种抗体，其中可变区或 CDRs 来源于能够结合并抑制人 IL-6 的功能的鼠 CLB-8 抗体，并且抗体的构架区和恒定区来源于一种或多种人抗体。来源于鼠 CLB-8 抗体的可变区或 CDRs 优选与鼠 CLB-8 抗体的可变区或 CDRs 具有约 90%-100% 的同一性，但也可以考虑任何和所有的修饰，包括取代、插入和缺失，只要嵌合抗体保持结合和抑制组织因子的能力。嵌合、人源化或 CDR 嫁接的抗体的来源于与人抗体的区域不需要与人抗体具有 100% 的同一性。在一种优选的实施方案中，保留尽可能多的人氨基酸残基，以使免疫原性可忽略，但人残基，特别是构架区的残基根据需要并且根据本发明下文的教导被取代。此处公开的所述修饰是支持 CDR 形成的抗原结合位点，同时使抗体的人源化最大所必须的。

抗人 IL-6 的 CLB-8 鼠单克隆抗体是本领域公知的(Brakenhoff et al, 上文)，但以前没有公开该抗体的 CDR 区。本发明第一次公开了来源于 CLB-8 鼠单克隆抗体的 CDR 区的嵌合、人源化或 CDR 嫁接的抗体以及制备所述抗体的方法。根据本发明，实施例 2 提供了鼠 CLB-8 重链的 cDNA (SEQ ID NO:15) 和氨基酸序列 (SEQ ID NO:7)。实施例 2 也提供了 CLB-8 轻链的 cDNA (SEQ ID NO:16) 和推定的氨基酸序列 (SEQ ID NO:8)。重链和轻链可变区的每一个都含有组合形成抗原结合位点的三个 CDRs。这三个 CDRs 由主要功能是支持 CDRs 的四个 FR 区围绕。可以根据 Kabat et al. (1987), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th ed., United States Department

of Health and Human Services, U. S. Government Printing Office, Washington, D. C.中的描述通过计算机辅助的比对, 或通过例如使用 Levitt (1983) J. Mol. Biol. 168: 595 描述的 ENCAD 程序的可变区分子模拟而鉴定重链和轻链可变区的序列中的 CDRs 的序列。

5 在一种优选实施方案中, CDRs 来源于鼠单克隆抗体 CLB-8。优选的重链 CDRs 具有以下序列:

CDR1 SFAMS (SEQ ID NO : 1)

CDR2 EISSGGSYTYYPDTVTG (SEQ ID NO : 2)

CDR3 GLWGYYALDY (SEQ ID NO : 3)

10 优选的轻链 CDRs 具有以下序列:

CDR1 SASSSVSYMY (SEQ.ID NO : 4)

CDR2 DTSNLAS (SEQ. ID NO : 5)

CDR3 QQWSGYPYT (SEQ. ID NO: 6)

15 可以通过插入、取代和缺失对鼠 CLB-8 抗体的 CDRs 的序列进行修饰, 使得 CDR 嫁接的抗体维持结合并抑制人类组织因子的能力。普通技术人员可以通过进行下文描述的功能测定确定该活性的维持。CDRs 可以与 SEQ ID NOS: 1-6 的 CDRs 具有例如约 50% - 100% 的同源性。在一种优选的实施方案中, CDRs 与 SEQ ID NOS: 1-6 的 CDRs 具有约 80% - 100% 的同源性。在一种更优选的实施方案中, CDRs
20 与 SEQ ID NOS: 1-6 的 CDRs 具有约 90% - 100% 的同源性。在一种最优选的实施方案中, CDRs 与 SEQ ID NOS: 1-6 的 CDRs 具有约 100% 的同源性。

25 或者, 如实施例 2(SEQ. ID NOS. 7 和 8)所示的鼠 CLB-8 抗体的完整重链可变区和轻链可变区可以与人恒定区和构架区组合, 以形成本发明的嵌合 cCLB-8 抗体。

30 编码本发明的嵌合抗体、片段和区域的恒定(C)区的人基因可以通过已知方法来源于人胎肝文库。人 C 区基因可以来源于任何人细胞, 包括表达和产生人免疫球蛋白的那些。人 C_H 区可以来源于人 H 链的任何已知类型或同种型, 包括其 γ , μ , α , δ , ϵ 及其亚型, 如 G1, G2, G3 和 G4。由于 H 链同种型负责抗体的各种效应物功能, 可以通过所需的效应物功能指导 C_H 区的选择, 如补体固定, 或抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 中的活性。优选地, C_H 区来源于 γ 1(IgG1)。

人 CL 区可以来源于人 L 链同种型 κ 或 λ ，优选 κ 。

通过标准克隆技术从人细胞获得编码人免疫球蛋白 C 区的基因 (Sambrook, et al. (Molecular Cloning : A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989) 5 和 Ausubel et al, eds. Current Protocols in Molecular Biology (1987-1993))。人 C 区基因容易从含有代表两类 L 链、五类 H 链及其亚类的基因的已知克隆获得。嵌合抗体片段，如 $F(ab')_2$ 和 Fab 可以通过设计适合被截短的嵌合 H 链基因而制备。例如，编码 $F(ab')_2$ 片段的 H 链部分的嵌合基因将包括编码 CH1 结构域和 H 链的铰链区的 DNA 10 序列，其后是翻译终止密码子，以产生截短分子。

通常，本发明的鼠、人或鼠和嵌合抗体、片段和区域是通过克隆编码 TNF 特异性抗体的 H 和 L 链抗原结合区的 DNA 片段，并且将这些 DNA 片段分别与编码 C_H 和 C_L 区的 DNA 片段连接以产生鼠、人或嵌合免疫球蛋白编码基因而产生的。

15 因此，在一种优选实施方案中，产生一种融合的嵌合基因，它包含至少编码非人来源的抗原结合区的第一 DNA 片段，如与连接 (J) 片段功能性重排的 V 区，它与编码人 C 区的至少一部分的第二 DNA 片段连接。

可以通过插入、取代和缺失对鼠 CLB-8 抗体的可变区的序列进行 20 修饰，使得嵌合抗体维持结合并抑制人 IL-6 的能力。普通技术人员可以通过进行下文描述的功能测定确定该活性的维持。可变区可以与 SEQ ID NOS:7-8 的可变区具有例如约 50% - 100% 的同源性。在一种优选的实施方案中，可变区与 SEQ ID NOS: 7-8 的可变区具有约 80% - 100% 的同源性。在一种更优选的实施方案中，可变区与 SEQ ID 25 NOS:7-8 的可变区具有约 90% - 100% 的同源性。在一种最优选的实施方案中，可变区与 SEQ ID NOS: 1-6 的 CDRs 具有约 100% 的同源性。

为了方便，在此采用 Kabat 等的编号方案。根据需要需要通过小写数字或连字符表示残基，以使本发明的序列符合标准的 Kabat 编号的序列。

30 根据本发明，可以将残基保留在与亲本抗体如 CLB-8 异质的 FR 区中。已经证明在其它抗体的人源化中关键的残基也可以保留。按照前面的标准以支持 CDRs 形成的抗原结合位点同时最大化抗体的人源化。

下文实施例 2 中示出了来源于鼠单克隆抗体 CLB-8 和人抗体的代

表性重链可变区的氨基酸序列。

实施例 2 中也示出了来源于鼠单克隆抗体 CLB-8 和人抗体的代表性嵌合轻链可变区的氨基酸序列。

5 根据本发明，证明含有来源于鼠 CLB-8 抗体的可变区的嵌合抗体在结合 II-6 方面与鼠单克隆抗体 CLB-8 同样有效。

也可以使用本领域公知的工程化或人源化非人或人抗体的方法。一般地，人源化或工程化的抗体具有一个或多个非人来源的氨基酸，例如，但不限于来源于小鼠、大鼠、非人灵长类或其它哺乳动物。这些人类氨基酸残基一般称作“输入”残基。一般来自于已知人序列的“输入”可变区、恒定区或其它结构域。已知的人 IgG 序列公开于，例如

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/;
www.abcam.com/; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;
www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-
heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;
www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;
www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html;
www.antibodyresource.com/;
mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html www.immunologylink.com/;
pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/~hcl/;
www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;
www.m.chime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp;
www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html; www.isac-
net.org/sites_geo.html; aximt1.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html;
baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.brne.nwu.edu/;
www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html;
imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/;
abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;
www.unizh.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/;
www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html;
www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html;
www.jerini.de/fr_products.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html.Kabat et al., Sequences of
Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983),

在此全文引入作为参考。

这些输入序列可以用于减少免疫原性，或用于减少、增强或修饰结合、亲和力、开率 (on-rate)、闭率 (off-rate)、亲和力、特异性、半衰期或任意其它适当的特征，如本领域所公知的。保留非人或人 CDR 序列的大部分或全部，用人氨基酸或其它氨基取代可变区和恒定区。

5 任选对抗体人源化，保留抗体对抗原的高亲和力和其它有利的生物学特性。为了达到这一目的，通过采用母体和人源化序列的三维模型分析母体序列和各种得到的人源化序列的过程任选制备人源化抗体。通常可以得到三维免疫球蛋白模型，并且是本领域技术人员公知的。说明和演示所选的候选免疫球蛋白序列的可能三维构象结构计算机程序

10 是可得到的。检查这些演示结果可以分析候选免疫球蛋白序列功能中残基的可能作用，即，分析影响候选免疫球蛋白与其抗原的结合能力的残基。以这种方式，可以选择 FR 残基，并且与共有序列和输入序列结合，从而得到需要的抗体特征，如对靶抗原的亲和力增加。概言之，CDR 残基直接并最大程度参与抗原结合的影响。本发明抗体的人源化或工程化可以采用任意已知的方法进行，例如，但不限于，以下文献中描述的方法，Winter (Jones et al., Nature 321: 522 (1986); Riechmann et al. Nature 332: 323 (1988) ; Verhoeyen et al., Science 239: 1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89: 4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151: 2623 (1993), 美国专利 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539; 4816567, PCT/ : US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, 25 GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, 在此全文引入每一篇文献作为参考。

本发明的人抗体可以是任意类型(IgG, IgA, IgM, IgE, IgD 等)或同种型，可以包含 κ 或 λ 轻链。在一种实施方案中，人恒定区包含一个 IgG 重链或限定的片段，例如，同种型 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 中的

30 至少一种。在另一种实施方案中，抗人 IL-6 人抗体包含一个 IgG1 重链和一个 IgG1 轻链。本发明的分离抗体包含由任意适当的多核苷酸编码的此处公开的抗体氨基酸序列，或任意分离的或制备的抗体。人

抗体或抗原结合片段优选结合人 IL-6，并因此部分或基本上中和该蛋白的至少一种生物活性。部分或基本上中和至少一种 IL-6 蛋白或其片段的生物活性的抗体或其特定部分或变体可以结合该蛋白或片段，从而抑制由 IL-6 与 IL-6 受体的结合介导的或其它 IL-6 依赖性 IL-6 介导的机制。此处用到的术语“中和抗体”是指根据所采用的测定，可以抑制约 20-120%，优选至少约 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% 的 IL-6 依赖性活性的抗体。抗 IL-6 抗体抑制 IL-6 依赖性活性的能力优选通过至少一种适当的 IL-6 蛋白或受体测定方法进行评估，如此处的描述和/或本领域公知。

本发明的至少一种抗体结合至少一种特异于 IL-6 蛋白、其亚基、片段、部分或其任意组合的至少一种特定表位。所述至少一种表位包含至少一个抗体结合区，该区包含所述蛋白的至少一部分，该表位优选由所述蛋白的至少一个细胞外、可溶性、亲水性、外部或细胞质部分组成。本发明的人抗体或抗原结合片段一般将包含一个抗原结合区，该区包含至少一个重链可变区的至少一个 SEQ ID NOS: 1, 2 和 3 的人互补决定区(CDR1, CDR2 和 CDR3)或变体和至少一个轻链可变区的至少一个人互补决定区(CDR1, CDR2 和 CDR3) (或变体 SEQ ID NOS: 4, 5 和 6)。作为非限制性的实例，抗体或抗原结合部分或变体可以包含至少一种具有 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的重链 CDR3，和/或具有 SEQ ID NO: 6 的氨基酸序列的轻链 CDR3。在一种特定的实施方案中，抗体或抗原结合片段可以具有一种抗原结合区，该区包含具有相应 CDR1, CDR2 和/或 CDR3 的氨基酸序列(如 SEQ ID NOS: 1, 2 和/或 3) 的至少一个重链 CDR (即 CDR1, CDR2 和/或 CDR3) 的至少一部分。在另一种特定实施方案中，抗体或抗原结合部分或变体可以具有一种抗原结合区，该区包含具有相应 CDR4, CDR5 和/或 CDR6 的氨基酸序列 (如 SEQ ID NOS: 4, 5 和/或 6) 的至少一个轻链 CDR (即 CDR4, CDR5 和/或 CDR6) 的至少一部分。在一种优选实施方案中，抗体或抗原结合片段的三种重链 CDR 和三种轻链 CDR 具有此处描述的至少一种 mAb cCLB8，嵌合抗 IL-6 Mab 的相应 CRD 的氨基酸序列。可以使用常规技术通过将抗体的各种部分(如 CDR、构架区)化学连接在一起而制备这些抗体，也可以通过常规重组 DNA

技术或任何其它适当方法并且使用任何可能的导致本发明的多肽表达的冗余密码子（例如 SEQ ID NO:15 或 16）制备和表达一种（即一种或多种）编码抗体的核酸分子而制备这些抗体。

5 结合于人 IL-6 的抗体和包含确定的重链和轻链可变区的抗体可以用适当方法制备，例如噬菌体展示(Katsube, Y., et al., *Int J Mol. Med*, 1 (5) : 863-868 (1998))或使用转基因动物的方法，如本领域所公知和/或此处所描述。例如，可以在适当宿主细胞中用其编码核酸或其部分表达抗体、其特定部分或变体。

本发明也涉及包含与此处描述的氨基酸序列基本相同的序列中的氨基酸的抗体、抗原结合片段、免疫球蛋白链和 CDR。这些抗体或抗原结合片段和包含所述链或 CDR 的抗体可以以高亲和力（如 K_D 小于或等于约 $10^{-9}M$ ）与人 IL-6 结合。与此处描述的序列基本相同的氨基酸序列包括含有保守氨基酸取代和氨基酸去除和/或插入的序列。保守氨基酸取代是指，用具有与第一种氨基酸相似的化学和/或物理特性（如电荷、结构、极性、疏水性/亲水性）的第二种氨基酸代替第一种氨基酸。保守氨基酸取代包括用下列各组中的一种氨基酸代替另一种氨基酸：赖氨酸(K)、精氨酸(R)和组氨酸(H)；天冬氨酸(D)和谷氨酸(E)；天冬酰胺(N)，谷氨酰胺(Q)，丝氨酸(S)，苏氨酸(T)，酪氨酸(Y)，K, R, H, D 和 E；丙氨酸(A)，缬氨酸(V)，亮氨酸(L)，异亮氨酸(I)，脯氨酸(P)，苯丙氨酸(F)，色氨酸(W)，甲硫氨酸(M)，半胱氨酸(C)和甘氨酸(G) F, W 和 Y； C, S 和 T。

当然，技术人员所进行的氨基酸取代的数目将取决于许多因素，包括前面提到的那些。一般说来，任何给定的抗 IL-6 抗体、片段或变体的氨基酸取代、插入或去除的数目不超过 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1，例如 1-30 或其中的任意范围或任意值，如此处所规定。

可以通过本领域公知的方法鉴定对功能起关键作用的本发明的抗 IL-6 抗体中的氨基酸，如定点诱变或丙氨酸扫描诱变（如 Ausubel, 同上，8，15 章；Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081-1085 (1989)）。后一种程序在分子中每个残基处导入单个丙氨酸突变。然后检测得到的突变分子的生物活性，例如，但不限于至少一种 IL-6 中和活性。也可以通过结晶、核磁共振或光亲和力标记等结构分析鉴定

抗体结合的关键位点(Smith, et al., J. Mol. Biol. 224: 899-904 (1992) and de Vos, et al., Science 255: 306-312 (1992)).

5 本发明的抗 IL-6 抗体可以包括,但不限于选自 SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6 中至少一个的 5 个至所有连续氨基酸的至少一种部分、序列或组合。

本发明的抗 IL-6 抗体可以进一步任选包含 SEQ ID NOS: 7, 8 中的至少一个的 70-100%连续氨基酸中的至少一个的多肽。

10 在一种实施方案中,免疫球蛋白链的氨基酸序列或其部分(如可变区、CDR)与 SEQ ID NOS: 7, 8 中的至少一个的相应链的氨基酸序列具有约 70-100%的同一性(如 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 或其中的任意范围或任意值)。例如,轻链可变区的氨基酸序列可以与 SEQ ID NO: 8 的序列相似,或重链 CDR3 的氨基酸序列可以与 SEQ ID NO: 7 相似。优选地,用本领域公知的适当计算机算法确定出具有
15 70-100%的氨基酸同一性(即 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 或其中的任意范围或任意值)。

示例性的重链和轻链可变区序列见 SEQ ID NOS:7, 8。本发明的抗体或其特定变体可以包含来源于本发明的一种抗体的任意数目的连续氨基酸,其中该数目选自抗 IL-6 抗体中连续残基数目的 10-100%。
20 该连续氨基酸的亚序列长度为至少约 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 或更多,或其中的任意范围或任意值。此外,这些亚序列的数目可以是选自 1-20 的任意整数,例如至少为 2, 3, 4 或 5。

25 本领域技术人员可以理解,本发明包括本发明的至少一种生物活性抗体。生物活性抗体具有天然(非合成)、内源性或相关和已知抗体的至少 20%, 30%或 40%的特异活性,优选至少 50%, 60%或 70%, 最优选具有天然、内源性或相关和已知抗体的至少 80%, 90%或 95%-1000%的特异活性。测定和定量测定酶活性和底物特异性的方法是本领域技术人员公知的。

30 另一方面,本发明涉及此处描述的人抗体和抗原结合片段,它们可以通过共价连接有机部分而得到修饰。这种修饰可以产生具有改进的药代动力学特性(如增加的体内血清半衰期)的抗体或抗原结合片

段。有机部分可以是线性或分支的疏水聚合物基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。在特定实施方案中，亲水聚合物基团的分子量可以为约800 - 120000Da，并且可以是聚链烷醇（如聚乙二醇(PEG)、聚丙烯二醇(PPG)）、碳水化合物聚合物、氨基酸聚合物或聚乙烯基吡咯烷酮，
5 脂肪酸或脂肪酸酯基团可以包含约8 - 40个碳原子。

本发明的修饰抗体和抗原结合结合片段可以包含与抗体直接或间接共价结合的一种或多种有机部分。与本发明的抗体或抗原结合片段结合的每一种有机部分可以独立是亲水聚合物基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。这里用到的“脂肪酸”包括单羧酸和二羧酸，这里用到的
10 的“亲水聚合物基团”是指在水中比在辛烷中的溶解度更高的有机聚合物。例如，聚赖氨酸在水中比在辛烷中的溶解度更高。因此，本发明包括通过共价连接聚赖氨酸而被修饰的抗体。适于修饰本发明的抗体的亲水聚合物可以是线性的或分支的，可以包括，例如聚链烷醇（如PEG、单甲氧基-聚乙二醇(mPEG)、PPG等），碳水化合物（如右旋糖苷、纤维素、寡糖、多糖等），亲水氨基酸的聚合物（如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚天冬氨酸等），聚环氧烷（如聚环氧乙烷、聚环氧丙烷等）和聚乙烯基吡咯烷酮。修饰本发明的抗体的亲水聚合物作为独立
15 分子实体的分子量优选为约800 - 150,000Da。例如，PEG₅₀₀₀和PEG_{20,000}，其中下标是以Da为单位表示的可以使用的聚合物的分子量。可以用1至约6个烷基、脂肪酸或脂肪酸酯基团取代亲水聚合物。可以采用适当的方法制备用脂肪酸或脂肪酸酯基团取代的亲水聚合物。例如，包含胺基的聚合物可以与脂肪酸或脂肪酸酯的羧基偶联，脂肪酸或脂肪酸酯的上的活化羧基（如用N,N-羰基二咪唑活化）可以与聚合物上的羟基偶联。
20

适于修饰本发明的抗体的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的或可以包含一个或多个不饱和单元。适于修饰本发明的抗体的脂肪酸包括，例如正十二烷酸(C₁₂，月桂酸)，正十四烷酸(C₁₄，肉豆蔻酸)，正十八烷酸(C₁₈，硬脂酸)，正二十烷酸(C₂₀，花生酸)，正二十二烷酸(C₂₂，山嵛酸)，正三十烷酸(C₃₀)，正四十烷酸(C₄₀)，顺式- Δ 9-十八烷酸(C₁₈，油酸)，全顺式- Δ 5,8,11,14-二十碳四烯酸(C₂₀，花生四烯酸)，辛二酸，
25 十四烷二酸，十八烷二酸，二十二烷二酸等。适当的脂肪酸酯包括含有线性或分支低级烷基的二羧酸单酯。低级烷基可以包含1个至约12
30

个, 优选 1 个至约 6 个碳原子。

可以通过适当的方法, 例如通过与一种或多种修饰剂反应而制备修饰的人抗体和抗原结合片段。此处用到的“修饰剂”是指包括活化基团的适当有机基团(如亲水聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)。“活化基团”是指在适当条件下, 可以与第二种化学基团反应, 从而形成修饰剂与第二种化学基团之间的共价键的化学部分或官能团。例如, 胺反应性活化基团包括亲电子基团, 如甲苯磺酸酯、甲磺酰酯、卤素(氯、溴、氟、碘)、N-羧基琥珀酰亚胺酯(NHS)等。可以与硫醇反应的活化基团包括, 例如, 马来酰亚胺、碘代乙酰基、丙烯酰基、二硫吡啶、5-巯基-2-硝基苯甲酸硫醇(TNB 硫醇)等。可以将醛官能团与含有酰胺或酰肼的分子偶联, 可以使叠氮基与三价磷酸基反应形成氨基磷酸酯或亚氨基磷酸酯键。用于将活化基团导入分子的适当方法是本领域公知的(见例如, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*. Academic Press: San Diego, CA (1996))。活化基团可以直接与有机基团(如亲水聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯)结合, 或通过接头部分与其结合, 所述接头部分例如为二价 C_1-C_{12} 基团, 其中一个或多个碳原子可以被氧、氮或硫等杂原子取代。适当的接头部分包括, 例如, 四甘醇、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-NH-(CH_2)_6-NH-$, $-(CH_2)_2-NH-$ 和 $-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH-NH-$ 。例如, 可以在 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)存在下使单-Boc-烷基二亚胺(如单-Boc-乙二胺、单-Boc-二氨基己烷)与脂肪酸反应, 在游离胺和脂肪酸羧基之间形成酰胺键, 以便产生包含接头部分的修饰剂。用四氟乙酸(TFA)处理产物, 从而使伯胺暴露, 可以从产物去除 Boc 保护基, 该伯胺可以与上述另一羧基偶联, 或可以与马来酸酐反应, 将得到的产物环化可以产生被活化的脂肪酸的马来酰亚胺衍生物。(见, 例如, Thompson, et al., WO 92/16221, 在此引入其完整教导作为参考。)

本发明的修饰抗体可以通过使人抗体或抗原结合片段与修饰剂反应而产生。例如, 通过采用胺反应性修饰剂, 例如, PEG 的 NHS 酯, 有机部分可以与抗体以非位点特异性方式结合。也可以通过还原抗体或抗原结合片段的二硫键(如链内二硫键)而制备修饰的人抗体或抗原结合片段。然后可以使被还原的抗体或抗原结合片段与硫醇反应性修饰剂反应, 以便产生本发明的修饰抗体。可以采用反向蛋白水解等

适当方法制备包含与本发明抗体的特异位点结合的有机部分的修饰人抗体和抗原结合片段 (Fisch et al., *Bioconjugate Chem.*, 3: 147-153 (1992); Werlen et al., *Bioconjugate Chem.*, 5: 411-417 (1994); Kumaran et al., *Protein Sci.* 6 (10): 2233-2241 (1997); Itoh et al., *Bioorg. Chem.*, 24 (1): 59-68 (1996) ; Capellas et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 56 (4): 456-463 (1997)), 也可以采用描述于 Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)中的方法。

本发明的抗体可以以宽范围的亲和力(K_D)结合人 IL-6。在一种优选实施方案中, 本发明的至少一种人单克隆抗体可以任选以高亲和力结合人 IL-6。例如, 人单克隆抗体可以与人 IL-6 结合, 其 K_D 等于或小于约 $10^{-7}M$, 例如, 但不限于 0.1-9.9 (或其中的任意范围或任意值) $\times 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}, 10^{-13}$ 或其中的任意范围或任意值。

抗体与抗原的亲和力或亲和力可以采用适当的方法进行实验室测定。(见, 例如, Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions," *In Fundamental Immunology*, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis Imszlunolo, gy, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992);及此处描述的方法)。如果在不同的条件(如盐浓度, pH)下测定, 所测定的特定抗体-抗原相互作用的亲和力可以不同。因此, 优选标准抗体和抗原溶液、标准缓冲液, 如此处描述的缓冲液测量亲和力和其它抗原-抗体结合参数(例如 K_D, K_a, K_d)。

用于本发明的方法和组合物中的抗 IL-6 CLB-8 抗体的特征可以任选在于与 IL-6 结合的高亲和力, 并且任选并优选具有低毒性。具体地, 本发明中使用其中各个成分, 如可变区、恒定区和构架区的和/或其集合任选和优选具有低免疫原性的本发明的抗体、特定片段或变体。本发明中使用的抗体的特征任选在于它们能够在很长时间中治疗患者, 具有可测量的症状缓解和/或可接受的毒性。低或可接受的免疫原性和/或高亲和力, 以及其它适当的特性可以用于达到治疗结果。此处定义的“低免疫原性”是指在约 75%以下或优选 50%的受治疗患者中引起显著的 HAHA, HACA 或 HAMA 反应, 和/或在受治疗患者中产生低滴度(用双抗原酶免疫测定时小于约 300, 优选小于约 100) (Elliott et al., *Lancet* 344 : 1125-1127 (1994),在此引入其完整内容作为

参考)。

当把 cCLB8 与其它 IL-6 特异性抗体 CLB.IL-6/14 和 CLB.IL-6/16 相比时, 可以发现抗体亲和力和表位特异性的区别特征。结合于 IL-6 并且通常阻断 IL-6 与其受体间相互作用的抗体 cCLB8 可以抑制几乎 100% 的 IL-6 功能, 这是 IL-6 依赖性 7TD1 细胞增殖生物测定和基于 IL-6 结合于 IL-6 受体 Luminex 的测定所显示的。相反, 结合于 IL-6 但通过空间阻断 IL-6/IL-6R 复合物与 gp130 信号传递成分之间的相互作用而进行中和的抗体 CLB.IL-6/16, 可以抑制 62% 结合的生物素-IL-6。最后, 结合于 IL-6 但不像 CLB.IL-6/14 那样干扰其生物活性的抗体, 没有表现出对结合于固相 sIL-6R/gp80 的生物素-IL-6 的抑制。

也可以使用双特异性、异特异性、异偶联或类似的抗体, 它们是对至少两个不同抗原具有结合特异性的抗体。在本申请中, 一种结合特异性是针对至少一种 IL-6 蛋白, 另一种是针对任意其它抗原。制备特异性抗体的方法是本领域中公知的。一般地, 双特异性抗体的重组产生是基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达, 其中两个重链具有不同的特异性(Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配, 这些杂交瘤产生 10 中不同抗体分子的可能混合物, 其中只有一种具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行的正确分子的纯化是繁杂的, 产率很低。相似的程序公开于, 例如 WO 93/08829, US Patent Nos, 6210668, 6193967, 6132992, 6106833, 6060285, 6037453, 6010902, 5989530, 5959084, 5959083, 5932448, 5833985, 5821333, 5807706, 5643759, 5601819, 5582996, 5496549, 4676980, WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Trauneker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991), Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121: 210 (1986), 在此引入其完整内容作为参考。

核酸分子

采用这里提供的信息, 如编码 SEQ ID NOS: 1,2,3,4,5,6,7,8 中的至少一种、其特定片段、变体或共有序列的至少 70 - 100% 的连续氨基酸的核苷酸序列, 或包含这些序列中的至少一种的保藏载体, 可以根据此处描述或本领域公知的方法获得编码至少一种抗 IL-6 抗体的本发明的核酸分子。

本发明的核酸分子可以是 RNA 形式, 例如 mRNA, hnRNA, tRNA

或任意其它形式，或可以是 DNA 形式，包括，但不限于通过克隆或合成产生，或其任意组合而产生的 cDNA 和基因组 DNA。DNA 可以是三链、双链或单链，或其任意组合。DNA 或 RNA 的至少一条链的任意部分可以是编码链，也称作有义链，或可以是非编码链，也称作反义链。

5 本发明的分离核酸分子可以包括含有开放读码框(ORF)，任选具有一种或多种内含子的核酸分子，例如，但不限于至少一种重链(如 SEQ ID NOS: 1-3)或轻链(如 SEQ ID NOS: 4-6)的至少一种 CDR，如 CDR1, CDR2 和/或 CDR3 的至少一个特定部分；包含抗 IL-6 抗体或可变区的编码序列的核酸分子(如 SEQ ID NOS: 15 或 16)；以及包含基本不同于上述那些的核苷酸序列的核酸分子，但由于遗传密码简并性，它们仍然编码此处描述和/或本领域公知的至少一种抗 IL-6 抗体。当然，遗传密码是本领域公知的。因此，本领域技术人员制备这种编码本发明的特异性抗 IL-6 抗体的简并核酸变体是常规的。见，例如，10 Ausubel, et al., 同上，这些核酸变体包括在本发明中。本发明的分离核酸分子的非限制性例子包括 SEQ ID NOS: 9 - 16，它们分别对应于编码 HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, LC CDR3, HC 可变区和 LC 可变区的非限制性的核酸的例子。

如此处指出的，包含编码抗 IL-6 抗体的核酸的本发明的核酸分子可以包括，但不限于自身编码抗体片段的氨基酸序列的核酸；完整抗体或其部分的编码序列；抗体、片段或部分的编码序列，以及其它的序列，例如至少一种信号前导肽或融合肽的编码序列，它具有或不具有前面提到的其它编码序列，如至少一种内含子，同时具有其它的非编码序列，包括，但不限于非编码 5'和 3'序列，如在转录、mRNA 加工，包括剪接和聚腺苷酸化信号中起作用（例如 mRNA 的核糖体结合和稳定性）的转录的、未翻译的序列；编码其它氨基酸，如提供其它功能的氨基酸的其它序列。因此，编码抗体的序列可以与标记序列融合，例如与促进包含抗体片段或部分的融合抗体纯化的肽的编码序列融合。

30 选择性与此处描述的多核苷酸杂交的多核苷酸

本发明提供了在选择性杂交条件下与此处公开的多核苷酸杂交的分离核酸。因此，该实施方案中的多核苷酸可以用于分离、检测和/或

定量包含所述多核苷酸的核酸。例如，本发明的多核苷酸可以用于在保藏的文库中鉴定、分离或扩增部分或全长克隆。在一些实施方案中，多核苷酸是分离的基因组或 cDNA 序列，或者互补于来自于人或哺乳动物核酸文库的 cDNA。

5 优选地，cDNA 文库包含全长序列的至少 80%，优选包含全长序列的至少 85%或 90%，更优选包含全长序列的至少 95%。可以对 cDNA 文库进行标准化，以增加稀有序列的代表性。低或中度严格杂交条件一般、但不是专门用于相对于互补序列的序列同一性较低的序列。中度和高度严格性条件任选用于具有更高同一性的序列。低严格性杂交
10 条件允许具有约 70%的序列同一性的序列的选择性杂交，并且可以用于鉴定直向同源序列或共生同源序列。

本发明的多核苷酸任选编码由此处描述的多核苷酸编码的抗体的至少一部分。本发明的多核苷酸包括可以用于与编码本发明的抗体的多核苷酸选择性杂交的核酸序列。见，例如 Ausubel, 同上; Colligan, 15 同上，在此全文引入作为参考。

核酸的构建

本发明的分离核酸可以利用本领域公知的(a)重组方法，(b)合成技术，(c)纯化技术或其组合进行制备。

核酸可以方便地包含除本发明的多核苷酸以外的序列。例如，可以
20 以将包含一个或多个内切核酸酶限制位点的多克隆位点插入核酸，以帮助多核苷酸的分离。也可以插入可翻译的序列以帮助本发明的被翻译的多核苷酸的分离。例如，一种六组氨酸标记序列提供了纯化本发明的蛋白的方便方法。除编码序列外，本发明的核酸任选为用于克隆和/或表达本发明的多核苷酸的载体、连接物或接头。

25 在这种克隆和/或表达序列中也可以加入其它序列，用于优化它们在克隆和/或表达中的功能，用于帮助多核苷酸的分离，用于改进多核苷酸向细胞中的导入。克隆载体、表达载体、连接物和接头的用途是本领域中公知的。(See,例如, Ausubel, 同上; 或 Sambrook, 同上)。

构建核酸的重组方法

30 本发明的分离核酸组合物，如 RNA, cDNA, 基因组 DNA 或其任意组合可以用本领域技术人员公知的任何克隆方法从生物来源中获得。在一些实施方案中，在严格条件下选择性与本发明的多核苷酸杂

交的寡核苷酸探针被用于鉴定 cDNA 或基因组 DNA 文库中的所需序列。RNA 的分离和 cDNA 以及基因组文库的构建是本领域普通技术人员所公知的。(见, 例如 Ausubel, 同上; 或 Sambrook, 同上)。

核酸筛选和分离方法

5 可以采用基于本发明的多核苷酸序列的探针筛选 cDNA 或基因组文库, 如此处所公开。可以用探针与基因组 DNA 或 cDNA 序列杂交, 以分离相同或不同生物体中的同源基因。本领域技术人员将理解, 在测定中可以使用不同严格性程度的杂交, 杂交或洗涤介质中的任意一个都可以是严格的。当杂交条件更严格时, 探针和靶序列之间的互补性必须更高, 这样才能形成双链体。严格性程度可以由温度、离子强度、pH 和甲酰胺等部分变性溶剂的存在中的一个或多个条件进行控制。例如, 杂交的严格性可以通过改变反应物溶液的极性而方便地改变, 反应物溶液的极性可以通过例如在 0% - 50% 的范围内操作甲酰胺的浓度而改变。可检测的结合所要求的互补性程度(序列同一性) 10 将根据杂交介质和/或洗涤介质的严格性而改变。互补性程度最佳为 100% 或 70-100%, 或其中的任意范围或任意值。然而, 应该理解, 探针和引物中的小量序列变异可以通过减少杂交和/或洗涤介质的严格性而补偿。

20 扩增 RNA 或 DNA 的方法是本领域公知的, 可以根据此处的教导和指导用于本发明, 而不需要过多的实验。

已知的扩增 RNA 或 DNA 的方法包括, 但不限于聚合酶链式反应(PCR)和相关的扩增方法(见, 例如, Mullis 等的美国专利 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, 4,965,188; Tabor 等的 4,795,699 和 4,921,794; Innis 的 5,142,033; Wilson 等的 5,122,464; Innis 的 5,091,310; Gyllensten 25 等的 5,066,584; Gelfand 等的 4,889,818; Silver 等的 4,994,370; Biswas 的 4,766,067; Ringold 的 4,656,134) 和 RNA 介导的扩增, 该扩增中使用靶序列的反义 RNA 作为模板用于双链 DNA 合成(Malek 等的美国专利 5,130,238, 商品名为 NASBA), 在此全文引入所有参考文献作为参考。(见, 例如 Ausubel, 同上; 或 Sambrook, 同上。)

30 例如, 可以用聚合酶链式反应(PCR)技术从基因组 DNA 或 cDNA 文库直接扩增本发明的多核苷酸序列和相关基因。也可以用 PCR 和其它体外扩增方法克隆需要表达的蛋白的编码核酸序列, 制备用于检

测样品中是否存在所需 mRNA 的探针, 对核酸测序, 或其它目的。足够指导技术人员使用体外扩增方法的技术的例子见, Berger, 同上, Sambrook, 同上, 和 Ausubel, 同上, 以及 Mullis 等的美国专利 4,683,202 (1987); 以及 Innis 等, PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990)。用于基因组 PCR 扩增的商品化试剂盒是本领域已知的。见, 例如, Advantage-GC 基因组 PCR 试剂盒(Clontech)。此外, 如 T4 基因 32 蛋白(Boehringer Mannheim)可以用于改进长 PCR 产物的产率。

构建核酸的合成方法

10 本发明的分离核酸也可以根据已知方法通过直接化学合成而制备(见, 例如 Ausubel 等, 同上)。化学合成一般产生单链核苷酸, 该单链核苷酸可以通过与互补序列杂交或通过用单链作为模板, 采用 DNA 聚合酶进行聚合而转化为双链 DNA。本领域技术人员了解, 尽管 DNA 的化学合成可以限制在约 100 或更多碱基的序列, 也可以通过较短序列的连接获得较长的序列。

重组表达盒

本发明进一步提供了包含本发明的核酸的重组表达盒。本发明的核酸序列, 例如, 编码本发明的抗体的 cDNA 或基因组序列可以用于构建重组表达盒, 该表达盒可以被导入至少一种需要的宿主细胞。重组表达盒一般包含本发明的多核苷酸, 该多核苷酸可操作性地连接于指导多核苷酸在目的宿主中转录的转录起始调节序列。异源性和非源性(即内源性)启动子可以用于指导本发明的核酸分子的表达。

25 在一些实施方案中, 作为启动子、增强子或其它元件的分离核酸可以导入本发明的多核苷酸的非同源形式中的适当位置(位于内含子上游、下游或内部), 以便上调或下调本发明的多核苷酸的表达。例如, 可以通过突变、去除和/或取代而体内或体外改变内源性启动子。

载体和宿主细胞

30 本发明也涉及包含本发明的分离核酸分子的载体, 用重组载体基因工程化的宿主细胞, 以及通过本领域公知的重组技术产生至少一种抗 IL-6 抗体。见, 例如, Sambrook 等, 同上; Ausubel 等, 同上, 在此全文引入作为参考。

多核苷酸可以任选与含有可选择标记的载体连接, 用于在宿主中

增殖。一般地，将质粒载体导入一种沉淀物，例如磷酸钙沉淀，或导入具有带电脂质的复合物。如果载体是病毒，可以用适当的包装细胞系将其包装后转导至宿主细胞。

5 DNA 插入物可以操作性与适当启动子连接。表达构建体进一步包含转录起始位点、转录终止位点和转录区中的位点，以及用于翻译的核糖体结合位点。由构建体表达的天然转录物的编码部分将优选包含位于起始处的翻译起始密码子和位于被翻译的 mRNA 末端适当位置的终止密码子（如 UAA, UGA 或 UAG），哺乳动物或真核细胞表达优选采用 UAA 和 UAG。

10 表达载体优选但任选包含至少一种可选择标记。这些标记包括，例如，但不限于真核细胞培养物的氨甲喋呤(MTX)、二氢叶酸还原酶(DHFR, 美国专利 4,399,216; 4,634,665; 4,656,134; 4,956,288; 5,149,636; 5,179,017)、氨苄青霉素、新霉素(G418)、霉酚酸或谷氨酰胺合成酶(GS, 美国专利 5,122,464; 5,770,359; 5,827,739) 抗性基因，
15 以及大肠杆菌和其它细菌或原核生物的四环素或氨苄青霉素抗性基因（上述专利在此全文引入作为参考）。上述宿主细胞的适当培养基和培养条件是本领域公知的。适当的载体是本领域技术人员容易理解的。可以通过磷酸钙转染、DEAE-右旋糖苷介导的转染、阴离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其它已知方法将载体构建体导入
20 宿主细胞。这些方法在本领域有描述，例如 Sambrook, 同上, 1-4 和 16-18 章; Ausubel, 同上, 1, 9, 13, 15, 16 章。

本发明的至少一种抗体可以以修饰的形式，例如以融合蛋白的形式表达，并且可以包括分泌信号和其它异源功能区。例如，其它的氨基酸区域，特别是带电氨基酸区域可以添加至抗体的 N 端以改进纯化
25 或随后的加工和储存过程中在宿主中的稳定性和耐受性。也可以将本发明的肽部分添加至本发明的抗体，以促进纯化。这些区域可以在抗体或其至少一个片段的最终制备之前去除。这些方法描述于许多实验室手册，例如 Sambrook, 同上, 17.29-17.42 和 18.1-18.74 章; Ausubel, 同上, 16,17 和 18 章。

30 本领域普通技术人员了解，许多表达系统都可以用于表达编码本发明的蛋白的核酸。

作为选择，本发明的核酸可以通过在包含编码本发明的抗体的内

源性 DNA 的宿主细胞中打开 (turning on) (通过操作) 而在宿主细胞中表达。这些方法是本领域公知的, 如描述于美国专利 5,580,734, 5,641,670, 5,733,746, 和 5,733,761, 在此引入每一篇专利作为参考。

用于产生抗体、其特定部分或变体的示例性的细胞培养物为哺乳动物细胞。哺乳动物细胞系统一般是单层细胞的形式, 但也可以使用哺乳动物细胞悬浮液或生物反应器。本领域中已经开发了许多能够表达完整糖基化蛋白的适当宿主细胞系, 包括 COS-1 (如 ATCC CRL 1650), COS-7 (如 ATCC CRL1651), HEK293, BHK21 (如 ATCC CRL-10), CHO (如 ATCC CRL 1610) 和 BSC-1 (如 ATCC CRL-26) 细胞系, Cos-7 细胞, CHO 细胞, hep G2 细胞, P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293 细胞, HeLa 细胞等, 它们可以容易从例如美国典型培养物保藏中心 Manassas, Va (www.atcc.org) 获得。特别优选的宿主细胞是 P3X63Ag8.653 细胞 (ATCC 保藏号 CRL-1580) 和 SP2/0-Ag14 细胞 (ATCC 保藏号 CRL-1851)。在一种特别优选的实施方案中, 重组细胞是 P3X63Ab8.653 或 SP2/0-Ag14 细胞。

这些细胞的表达载体可以包含一种或多种以下表达控制序列, 例如, 但不限于复制起点; 启动子 (如晚期或早期 SV40 启动子, CMV 启动子 (美国专利 5,168,062; 5,385, 839)、HSV tk、pgk (磷酸甘油酯激酶) 启动子、EF-1 α 启动子 (美国专利 5,266,491)、至少一种人类免疫球蛋白启动子); 增强子和/或加工信号位点, 例如核糖体结合位点, RNA 剪接位点、聚腺苷酸化位点 (如 SV40 大 T Ag 聚腺苷酸添加位点) 和转录终止子序列。见, 例如 Ausubel 等, 同上; Sambrook, 等, 同上。其它用于产生本发明的核酸或蛋白的细胞是已知的和/或可得到的, 例如从美国典型培养物保藏中心细胞系和杂交瘤目录 (www.atcc.org) 或商业来源得到。

当使用真核宿主细胞时, 一般将聚腺苷酸化或转录终止子序列掺入载体。终止子序列的一个例子是来自于牛生长激素基因的聚腺苷酸化序列。也可以包括用于准确剪接转录物的序列。剪接序列的一个例子是 SV40 的 VP1 内含子 (Sprague, et al., J. Virol. 45: 773-781 (1983))。此外, 用于控制宿主细胞中复制的基因序列可以掺入本领域公知的载体中。

抗体的产生

本发明的至少一种抗 IL-6 抗体可以任选通过本领域公知的细胞系、混合细胞系、永生化细胞或永生化细胞的克隆群产生。见，例如，Ausubel, et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001) ; Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2 Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989) ; Harlow and Lane, *antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989) ; Colligan, et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001) ; Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), 在此全文引入作为参考。

在一种方法中，可以通过融合适当的永生细胞系和抗体产生细胞而产生。所述细胞系如骨髓瘤细胞系，例如，但不限于 Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L. 5, > 243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A 等，或异骨髓瘤，或本领域已知的其它细胞系。见，例如，www.atcc.org, www.lifetech.com等。所述抗体产生细胞例如，但不限于分离的或克隆的脾细胞、外周血细胞、淋巴细胞、扁桃体或其它免疫细胞或 B 细胞，或其它任何表达重链或轻链恒定区或可变区或构架区或 CDR 序列的细胞，这些序列可以是内源性或异源核酸，重组或内源性的、病毒、细菌、藻类、原核生物、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼类、哺乳动物、啮齿类、马、山羊、绵羊、灵长类、真核生物的基因组 DNA, cDNA, rDNA, 线粒体 DNA 或 RNA, 叶绿体 DNA 或 RNA, hnRNA, mRNA, tRNA, 单链、双链或三链、杂交序列等或其组合。见，例如 Ausubel, 同上, 和 Colligan, *Immunology*, 同上, 第二章, 在此引入作为参考。

抗体产生细胞也可以从用感兴趣的抗原免疫的人或其它适当动物的外周血或优选脾或淋巴结获得。也可以用任何其它适当的宿主细胞表达编码本发明的抗体、其特定片段或变体的异源或内源性核酸。可以用选择性培养条件或其它适当的已知方法分离融合细胞（杂交瘤）或重组细胞，并且用有限稀释或细胞分选或其它公知方法进行克隆。产生具有所需特异性的抗体的细胞可以通过适当的测定(如 ELISA)进

行选择。

也可以使用至少一种编码抗 IL-6 抗体的核酸提供转基因动物或哺乳动物，从而制备本发明的抗体，所述动物如山羊、牛、马、绵羊等，它们在其乳汁中产生这些抗体。这些动物可以通过已知的方法提供，
5 见，例如，但不限于美国专利 5,827,690; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616; 5,565,362; 5,304,489 等，在此全文引入作为参考。

还可以使用至少一种编码抗 IL-6 抗体的核酸提供在植物部分或由其培养的细胞中产生所述抗体、特定部分或变体的转基因植物并培养植物细胞（例如，但不限于烟草和玉米），从而制备本发明的抗体。
10 作为非限制性的实例，已经成功使用表达重组蛋白的烟叶提供大量重组蛋白，如，使用诱导型启动子。见，例如，Cramer et al., *Curr. Top. Microbol. Immunol.* 240: 95-118 (1999)及其中引用的文献。同样，已经采用转基因玉米以商业生产水平表达哺乳动物蛋白，其生物活性等于在其它重组系统产生或从天然来源纯化的蛋白。见，例如 Hood et al.,
15 *Adv. Exp. Med. Biol.* 464: 127-147 (1999) 及其中引用的文献。也已经从转基因植物种子，包括烟草种子和马铃薯块根中大量产生了抗体，包括抗体片段，例如单链抗体(scFv's)。见，例如 Conrad et al., *Plant Mol. Biol.* 38 : 101109 (1998) 及其中引用的文献。这样，也可以根据已知方法采用转基因植物产生本发明的抗体。也见 Fischer et al., *Biotechnol.*
20 *Appl. Biochem.* 30: 99-108 (Oct., 1999), Ma et al., *Trends Biotechnol.* 13: 522-7 (1995); Ma et al., *Plant Physiol.* 109: 341-6 (1995); Whitelam et al., *Biochem. Soc. Trans.* 22: 940-944 (1994); 及其中引用的文献。也见一般用于抗体的植物表达的方法，在此全文引用上述每一篇文章作为参考。

25 抗体的纯化

可以通过公知的方法从重组细胞培养物中回收并纯化抗 IL-6 抗体，所述方法包括，但不限于，蛋白 A 纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阴离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水相互作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。也可以采用高效液相
30 层析("HPLC")进行纯化。见，例如，Colligan, *Current Protocols in Immunology*,或 *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001) ， 例如 1, 4, 6, 8, 9, 10 章，在此全文引入作

为参考。

本发明的抗体包括天然纯化产物，化学合成程序产物，以及通过重组技术从酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞等真核宿主产生的产物。根据在重组产生程序中使用的宿主，本发明的抗体可以本发明的抗体可以被糖基化或可以未糖基化，优选被糖基化。这些方法描述于许多实验室手册，例如 Sambrook, 同上, 17.37-17.42 部分; Ausubel, 同上, 10, 12, 13, 16, 18 和 20 章; Colligan, Protein Science, 同上, 12-14 章, 在此全文引入所有这些文献作为参考。

在哺乳动物细胞中克隆和表达 IL-6 抗体

典型的哺乳动物表达载体含有至少一种启动子元件，它介导 mRNA、抗体编码序列以及转录终止和转录物的聚腺苷酸化所需信号的转录起始。其它元件包括增强子、Kozak 序列和间插序列，其侧翼具有 RNA 剪接的供体和受体位点。可以通过 SV40 的早期和晚期启动子、逆转录病毒的长末端重复(LTRS)，如 SV, HTLVI, HIVI 和巨细胞病毒(CMV)的早期启动子完成高度有效的转录。然而，也可以使用细胞元件（如人肌动蛋白启动子）。用于实施本发明的适当表达载体包括，例如，pIRES1neo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN 或 pLNCX (Clonetech Labs, Palo Alto, CA), pcDNA3.1 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-)或 pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVL 和 PMSG (Pharmacia, Uppsala, Sweden), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) 和 pBC12MI (ATCC 67109)等载体。可以使用的哺乳动物宿主细胞包括人 Hela 293, H9 和 Jurkat 细胞，小鼠 NIH3T3 和 C127 细胞, Cos 1, Cos 7 和 CV 1, 鹤鹑 QC1-3 细胞，小鼠 L 细胞和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

作为选择，可以在含有整合到染色体中的基因的稳定细胞系中表达基因。用 dhfr, gpt, 新霉素或潮霉素等选择性标记共转染，可以鉴定和分离被转染的细胞。

也可以扩增经转染的基因，使其表达大量被编码的抗体。用 DHFR（二氢叶酸还原酶）标记开发携带几百或甚至几千拷贝目的基因的细胞系。另一种有用的选择标记是谷氨酰胺合成酶(GS) (Murphy, et al., Biochem. J. 227: 277-279 (1991); Bebbington, et al., Bio/Technology 10: 169-175 (1992))。采用这些标记，在选择性培养基中培养哺乳动物

细胞，选择具有最高抗性的细胞。这些细胞系含有整合到染色体中的被扩增的基因。通常用中国仓鼠卵巢(CHO)和 NSO 细胞产生抗体。

5 表达载体 pCl 和 pC4 含有劳斯肉瘤病毒强启动子(LTR) (Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5: 438-447 (1985))和 CMV 增强子的片段(Boshart, et al., *Cell* 41: 521-530 (1985))。多个克隆位点，如具有限制酶裂解位点 BamHI, XbaI 和 Asp718 的那些，促进了目的基因的克隆。这些载体除 3'内含子外，还含有大鼠前胰岛素原基因的聚腺苷酸化和终止信号。

在 CHO 细胞中克隆和表达

10 用载体 pC4 表达 IL-6 抗体表达。质粒 pC4 是质粒 pSV2-dhfr (ATCC 保藏号 No. 37146)的衍生物。该质粒含有 SV40 早期启动子控制下的小鼠 DHFR 基因。可以通过在选择性培养基(如 α -MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD)中培养细胞而选择用这些质粒转染的中国仓鼠卵巢细胞或其它缺乏二氢叶酸活性的细胞，该培养基中补
15 加了化疗剂氨甲喋呤。抗氨甲喋呤(MTX)的细胞中的 DHFR 基因的扩增已经有记载(见，例如 F. W. Alt, et al., *J. Biol. Chem.* 253: 1357-1370 (1978); J. L. Hamlin and C. Ma, *Biochem. et Biophys. Acta* 1097: 107-143 (1990);和 M. J. Page and M. A. Sydenham, *Biotechnology* 9: 64-68 (1991))。在不断增加的 MTX 浓度下培养的细胞通过靶酶 DHFR 的过
20 量产生发生了对药物的抗性，这是因为 DHFR 基因的扩增。如果将第二种基因连接于 DHFR 基因，它通常被共扩增并且过度表达。本领域公知该方法可以用于开发携带多于 1000 拷贝的被扩增基因的细胞系。因此，当撤去氨甲喋呤时，获得了含有整合到宿主细胞的一个或多个染色体的被扩增基因。

25 质粒 pC4 含有用于表达目的基因的劳斯肉瘤病毒长末端重复(LTR)的强启动子(Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5: 438-447 (1985))和从人巨细胞病毒(CMV)的立即早期基因的增强子分离的片段(Boshart, et al., *Cell* 41: 521-530 (1985))。启动子下游是允许基因整合的 BamHI, XbaI, 和 Asp718 限制酶裂解位点。该质粒在这些克隆位点之后含有 3'内含
30 子和大鼠前胰岛素原基因的聚腺苷酸化位点。其它高效启动子也可以用于表达，例如人 β 肌动蛋白启动子、SV40 早期或晚期启动子或来自于其它逆转录病毒，如 HIV 和 HTLVI 的长末端重复。Clontech 的

Tet-Off 和 Tet-On 基因表达系统和相似的系统可以用于在哺乳动物细胞中以经调节的途径表达 IL-6(M. Gossen, and H. Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 (1992))。对于 mRNA 的聚腺苷酸化, 也可以使用例如人生长激素或球蛋白基因的其它信号。携带整合到染色体中的目的基因的稳定细胞系也可以通过用可选择标记如 gpt, G418 或潮霉素共转染而进行选择。在开始时使用 G418 加氨甲喋呤等一种以上的可选择标记是有利的。

用限制酶消化 pC4 质粒, 然后通过本领域公知的程序用小牛肠磷酸酶去磷酸化。然后从 1%琼脂糖凝胶分离载体。

根据已知的方法步骤, 使用编码完整的 IL-6 抗体的 DNA 序列, 如 SEQ ID NOS:7 和 8 所示, 相当于本发明的 IL-6 抗体的 HC 和 LC 可变区。该构建体中也使用编码合适的人恒定区(即 HC 和 LC 区)的分离的核酸。

然后用 T4 DNA 连接酶连接分离的可变区和恒定区编码 DNA 和去磷酸化的载体。然后转化大肠杆菌 HB 101 或 XL-1 Blue 细胞, 并且例如用限制酶分析鉴定含插入 pC4 质粒的片段的细菌。

用缺乏 DHFR 基因的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞进行转染。用 0.5 μ g pSV2-neo 质粒采用脂质转染共转染 5 μ g 表达质粒 pC4。pSV2-neo 质粒含有显性可选择标记, 即来自于 Tn5 的 neo 基因, 它编码一种酶, 该酶赋予对包括 G418 的一组抗生素的抗性。将这些细胞种植在补加 1 g/ml G418 的 α -MEM 中。两天后, 用胰蛋白酶消化细胞并且种植在杂交瘤克隆板上(Greiner, Germany), 置于补加 10、25 或 50 n g/ml 氨甲喋呤的 α -MEM 中。大约 10-14 天后, 用胰蛋白酶消化单个克隆, 然后种植在 6 孔培养皿或 10ml 烧瓶中, 使用不同浓度的氨甲喋呤(50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM)。然后将在最高浓度氨甲喋呤下生长的细胞转染到新的 6 孔板中, 该板含有更高浓度的氨甲喋呤(1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM)。重复同样的程序, 直到获得在 100-200 mM 的浓度下生长的克隆。例如, 通过 SDS-PAGE 和蛋白印迹或反相 HPLC 分析所需基因产物的表达。

抗 IL-6 抗体组分的抗独特型抗体

除单克隆抗体或嵌合抗 IL-6 抗体外, 本发明还涉及特异于本发明

的这些抗体的抗独特型（抗 Id）抗体。抗 Id 抗体是识别独特决定簇的抗体，所述决定簇一般与另一种抗体的抗原结合区相关。可以用抗体或其含 CDR 的区域免疫与作为 Id 抗体来源的动物相同物种和基因型（如小鼠株）的动物，从而制备抗 Id。被免疫的动物将识别免疫抗体的独特型决定簇并对其产生应答，并且产生抗 Id 抗体。抗 Id 抗体也可以用作“免疫原”以诱导另一动物的免疫应答，产生所谓的抗-抗独特型抗体。

抗 IL-6 抗体组合物

本发明也提供至少一种以天然存在的组合物、混合物或形式提供的抗 IL-6 抗体组合物，其中包含此处描述的和/或本领域公知的至少一种、至少两种、至少四种、至少五种、至少六种或更多抗 IL-6 抗体。这些组合物包括天然存在的组分，包括抗 IL-6 抗体氨基酸序列的至少一种或两种全长的序列、C 和/或 N 端去除的变体、结构域、片段、或特定变体，该抗 IL-6 抗体氨基酸序列选自 SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 的 70-100% 的连续氨基酸或其特定片段、结构域或变体。优选的抗 IL-6 抗体组合物包括抗 IL-6 抗体氨基酸序列的至少一种含 CDR 或 LBR 的部分的至少一种或两种全长的序列、片段结构域或变体，该抗 IL-6 抗体氨基酸序列选自 SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6 的 70-100% 的连续氨基酸或其特定片段、结构域或变体。更优选的组合物包含选自 SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5, 6 的 70-100% 的连续氨基酸或其特定片段、结构域或变体中的至少一种的 40-99%。组分百分比是液体或干溶液、混合物、悬浮液、乳状液或胶体的重量、体积、浓度、体积克分子浓度或重量克分子浓度百分比，如本领域所公知或此处的描述。

本发明的抗 IL-6 抗体组合物可以进一步包含任意适当的有效量的组分或药物组分中的至少一种，所述组合物包含需要这种调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或病人的至少一种抗 IL-6 抗体，该组合物任选进一步包含至少一种选自至少一种以下物质的组分：TNF 拮抗剂（例如，但不限于 TNF 抗体或片段、可溶性 TNF 受体或其片段、其融合蛋白、或小分子 TNF 拮抗剂）、抗风湿药物（如氨甲喋呤、金诺芬、金硫葡萄糖、硫唑嘌呤、etanercept、硫代苹果酸金钠、硫酸羟基氯喹、来氟米特、柳氮磺胺吡啶）、肌肉松弛剂、麻醉

药 (narcotic)、非甾体类抗炎药(NSAID)、镇痛药、麻醉剂(anesthetic)、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂(如氨基糖苷、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、carbapenem、头孢菌素、flurorquinolone、大环内酯、青霉素、磺胺、四环素、其它抗微生物剂)、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、糖尿病相关试剂、矿物质、营养剂、甲状腺制剂、维生素、钙相关激素、抗腹泻药、止咳药、抗呕吐药、抗溃疡药、通便药、抗凝剂、促红细胞生成素(如 epoetin α)、非尔司啉(如 G-CSF, Neupogen)、沙拉斯(GM-CSF, 白细胞素)、疫苗、免疫球蛋白、免疫抑制剂(如 basiliximab、环孢霉素、daclizumab)、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢药、有丝分裂抑制剂、放射性药物、抗抑郁剂、抗精神病药物、抗躁狂药、抗精神病药物、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药物、刺激剂、donepezil、他克林、抗哮喘药、 β 激动剂、吸入性类固醇、白三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、9-氨基四氢吡啶、肾上腺素或类似物、 α 链道酶(Pulmozyme)、细胞因子或细胞因子拮抗剂。细胞因子的非限制性实例包括,但不限于 IL-1 至 IL-23 中的任意一种。适当的剂量是本领域公知的。见,例如, Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), 在此全文引入作为参考。

这些抗癌或抗感染试剂也可以包括与本发明的至少一种抗体缔合、结合、共同制剂化或共同给药的毒素分子。毒素可以任选选择性杀灭病变细胞或组织。病变细胞可以癌或其它细胞。这些毒素可以是,但不限于,纯化或重组毒素或毒素片段,它包含如选自蓖麻毒素、白喉毒素、蛇毒毒素或细菌毒素中的至少一种的毒素的至少一种功能性细胞毒性结构域。毒素也包括由任意天然存在的、突变或重组细菌或病毒的内毒素和外毒素,它们可以导致人类或其它哺乳动物中的任意病理学状况,包括致死的毒素休克。这些毒素可以包括,但不限于,产肠毒素的大肠杆菌的热不稳定性肠毒素(LT)、热稳定性肠毒素(ST)、志贺氏菌细胞毒素、Aeromonas 肠毒素、中毒性休克综合征毒素-1(TSST-1)、葡萄球菌肠毒素 A(SEA), B (SEB)或 C(SEC)、链球菌肠

毒素等。所述细菌包括,但不限于,产肠毒素的大肠杆菌(ETEC)、肠出血性大肠杆菌(如血清型 0157:H7 的菌株)、葡萄球菌物种(如金黄色葡萄球菌、化脓性葡萄球菌)、志贺氏菌物种(如痢疾志贺氏菌、弗氏志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌和索氏志贺氏菌)、沙门氏菌物种(如伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌)、梭菌物种(如产气荚膜梭菌、艰难梭菌、肉毒梭菌)、弯曲杆菌物种(如空肠弯曲杆菌、胚胎弯曲杆菌)、螺杆菌物种(如幽门螺杆菌)、气单胞菌物种(如温和气单胞菌、嗜水气单胞菌、豚鼠气单胞菌)、类志贺邻单胞菌、小肠结肠盐耶尔森氏菌、Vibrios 物种(如霍乱弧菌、副溶血弧菌)、克雷白氏菌物种、铜绿假单胞菌和链球菌。见,例如, Stein, ed., INTERNAL MEDICINE, 3rd ed., pp 1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans et al., eds., Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 2d. Ed., pp 239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell et al, Principles and Practice of Infectious Diseases, 3d. Ed., Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow et al, eds., The Merck Manual, 16th edition, Merck and Co., Rahway, N. J., 1992; Wood et al, FEMS Microbiology Immunology, 76: 121-134 (1991); Marrack et al, Science, 248: 705-711 (1990), 在此全文引入这些参考文献的完整内容作为参考。

本发明的抗 IL-6 抗体化合物、组合物或其组合可以进一步包含任意适当辅助物质,例如,但不限于稀释液、粘合剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂溶剂、防腐剂、佐剂等中的至少一种。优选药学可接受的辅助物质。这些无菌溶液的非限制性的例子和制备方法是本领域公知的,例如,但不限于 Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990。可以常规选择药学可接受的载体,这些载体适于抗 IL-6 抗体、片段或变体组合物的给药方式、溶解度和/或稳定性,如本领域公知或此处的描述。

用于本发明的组合物的药物赋形剂和添加剂包括,但不限于蛋白、肽、氨基酸、脂质和碳水化合物(如糖,包括单糖、双糖、三糖、四糖和寡糖;衍生糖,如醛醇、醛酸、酯化糖等;以及多糖或糖聚合物),可以单个或组合存在,单独或组合占重量或体积 1-99.99%。示例性的

蛋白赋形剂包括血清白蛋白，如人血清白蛋白(HSA)、重组人白蛋白(rHA)、明胶、酪蛋白等。可以起缓冲作用的代表性氨基酸/抗体成分包括丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、天冬酰胺等。一种优选的氨基酸是甘氨酸。

适用于本发明的碳水化合物赋形剂包括，例如单糖，如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等；双糖，如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等；多糖，如棉籽糖、松三糖、麦芽糖糊精、右旋糖苷、淀粉等；以及醛醇，如甘露醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨糖醇（葡萄糖醇）、肌醇等。用于本发明的优选的碳水化合物赋形剂是甘露醇、海藻糖和棉籽糖。

抗 IL-6 抗体组合物也可以包含缓冲剂或 pH 调节剂；一般地，缓冲剂是由有机酸或碱制备的盐。代表性的缓冲剂包括有机酸盐，例如柠檬酸、抗坏血酸、葡萄糖酸、碳酸、酒石酸、琥珀酸、乙酸或邻苯二甲酸的盐；Tris，盐酸 tromethamine、或磷酸缓冲液。用于本发明的组合物中的优选缓冲剂是有机酸盐如柠檬酸盐。

此外，本发明的抗 IL-6 抗体组合物可以包含聚合物赋形剂/添加剂，如聚乙烯基吡咯烷酮、ficolls（一种聚合的糖）、dextrates（如环糊精，例如 2-羟基丙基- β -环糊精）、聚乙二醇、矫味剂、抗微生物剂、增甜剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂（如聚山梨醇酯，例如 "TWEEN 20" 和 "TWEEN 80"）、脂质（如磷脂、脂肪酸）、类固醇（如胆固醇）和螯合剂（如 EDTA）。

适用于抗 IL-6 抗体、部分或变体组合物的这些和其它已知药物赋形剂和/或添加剂是本领域公知的，例如，列于 "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995), 和 "Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), 在此引入其完整公开内容作为参考。优选的载体或赋形剂物质是碳水化合物（如糖和醛醇）和缓冲剂（如柠檬酸盐）或聚合剂。

制剂

如前面所指出的，本发明提供了稳定的制剂，优选为含有盐或选择的盐的磷酸缓冲液，以及含有防腐剂的储存溶液和制剂，适于药用或兽医用途的多用途储存制剂，它包含置于药学可接受制剂中的至少

一种抗 IL-6 抗体。储存制剂包含至少一种已知的防腐剂或任选自至少一种苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、亚硝酸苯汞、苯氧基乙醇、甲醛、氯丁醇、氯化镁（如六水合物）、对羟基苯甲酸烷基酯（甲基、乙基、丙基、丁基等）、苯扎氯铵、苯索氯铵、5 脱氢乙酸钠和乙基汞硫代水杨酸钠，或其在水性稀释液中的混合物。可以使用本领域公知的任何适当浓度或混合物，例如 0.001-5%，或其中的任意范围或任意值，例如，但不限于，0.001, 0.003, 0.005, 0.009, 0.01, 0.02, 0.03, 0.05, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 10 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.3, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 或其中的任意范围或任意值。非限制性实例包括，无防腐剂，0.1-2% 间甲酚（如 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.9, 1.0%），0.1-3% 苯甲醇（如 0.5, 0.9, 1.1, 1.5, 1.9, 2.0, 2.5%），0.001-0.5% 乙基汞硫代水杨酸钠（如 0.005, 0.01），0.001-2.0% 苯酚（如 0.05, 0.25, 0.28, 0.5, 0.9, 1.0%），0.0005-1.0% 对 15 羟基苯甲酸烷基酯（如 0.00075, 0.0009, 0.001, 0.002, 0.005, 0.0075, 0.009, 0.01, 0.02, 0.05, 0.075, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.75, 0.9, 1.0%）等。

如前面所指出的，本发明提供了一种制品，包括包装材料和至少一个管形瓶，其中包含至少一种抗 IL-6 抗体的溶液和规定的缓冲剂 20 和/或防腐剂，任选溶于一种水性稀释液，其中所述包装材料包括一种标签，它指出所述溶剂可以保留 1、2、3、4、5、6、9、12、18、20、24、30、36、40、48、54、60、66、72 小时或更长的时间。本发明进一步包括一种制品，包括包装材料和含有至少一种冻干的抗 IL-6 抗体的第一个管形瓶，和含有规定的缓冲剂或防腐剂的水性稀释液的 25 第二个管形瓶，其中包装材料包括一种标签，它指导患者在水性稀释液中重构至少一种抗 IL-6 抗体，以便形成可以保留 24 小时或更长时间的溶液。

根据本发明而使用的至少一种抗 IL-6 抗体可以通过重组方法产生，包括从哺乳动物细胞或转基因制剂重组产生，或者从其它生物来源纯化，如此处所描述或本领域公知。 30

在本发明的产品中的至少一种抗 IL-6 抗体的范围包括在湿/干体系中重构时，产生约 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 至约 1000 mg/ml 的量，但更低和更高

的浓度也是可行的，并且依赖于准备使用的递送载体，例如，溶液制剂将不同于经皮贴剂、肺、经粘膜或渗透或微泵方法。

5 优选地，水性稀释液任选进一步包含药学可接受的防腐剂，优选的防腐剂包括选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷基酯（甲基、乙基、丙基、丁基等）、苯扎氯铵、苯索氯铵、脱氢乙酸钠和乙基汞硫代水杨酸钠，或其混合物的那些。用于制剂中的防腐剂的浓度为足以产生抗微生物作用的浓度。这些浓度取决于选择的防腐剂，并且本领域技术人员很容易确定。

10 可以任选和优选将其它赋形剂，如等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、防腐增强剂加入稀释液中。甘油等等渗剂通常以公知的浓度使用。优选加入生理耐受的缓冲剂以改进 pH 控制。制剂可以有宽范围的 pH 值，例如 pH 约 4-10，优选 pH 约 5-9，最优选约 6.0-8.0。本发明的制剂的 pH 优选为约 6.8-7.8。优选的缓冲剂包括磷酸缓冲液，最优选为磷酸盐，特别是磷酸缓冲盐水(PBS)。

15 也可以任选向制剂或组合物中加入其它添加剂，如药学可接受的增溶剂，如 Tween 20(聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单月桂酸酯)、Tween 40 (聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单棕榈酸酯)、Tween 80 (聚氧乙烯(20)山梨糖醇酐单油酸酯)、Pluronic F68 (聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物)和 PEG (聚乙二醇)或非离子型表面活性剂，例如 polysorbate20 或 20 80、或 poloxamer 184 或 188、Pluronic®多元醇其它共聚物，以及螯合剂如 EDTA 和 EGTA，以减少聚集。如果用泵或塑料容器给予制剂，则这些添加剂特别有用。药学可接受的表面活性剂的存在减少了蛋白聚集的倾向。

25 可以通过以下方法制备本发明的制剂，包括将至少一种抗 IL-6 抗体和选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、对羟基苯甲酸烷基酯（甲基、乙基、丙基、丁基等）、苯扎氯铵、苯索氯铵、脱氢乙酸钠和乙基汞硫代水杨酸钠，或其混合物在一种水性稀释液中混合。采用常规的溶解和混合步骤在一种水性稀释液中混合所述至少一种抗 IL-6 抗体和防腐剂。为了制备适当的制剂，例如，可以将测 30 得量的溶于缓冲液中的至少一种抗 IL-6 抗体在其量足以提供需要浓度的蛋白和防腐剂的缓冲液中混合。本领域技术人员可以了解该方法的变化。例如，加入各成分的顺序、是否使用其它添加剂、制备该制

剂的温度和 pH 都是可以对使用的浓度和给药方式进行优化的因素。

可以将本发明的制剂以澄清的溶液或作为双管形瓶的形式提供给患者，双管形瓶包含一个装有至少一种冻干的抗 IL-6 抗体的管形瓶，将其用含有水、防腐剂和/或赋形剂，优选磷酸缓冲剂和/或盐水和溶于水性稀释液中的选择的盐的第二个管形瓶重构。单一溶液的管形瓶或要求重构的双管形瓶可以重复使用多次，并且可以满足病人治疗的单个或多个周期，因此比当前存在的方法提供更方便的治疗方案。

本发明的制品可用于在 24 小时左右或更长的时间内给药。因此，本发明的制备为患者提供了显著的优势。本发明的制剂任选可以储存在约 2 - 40℃ 的温度下储存，并且在长时间保持蛋白的生物活性，因此，包装标签指出，该溶液可以在超过 6、12、18、24、36、48、72 或 96 小时的时间内保留和/或使用。如果使用了储存稀释液，该标签指出，该溶液可以在 1-12 个月，半年，一年半和/或两年的时间内用完。

本发明中的至少一种抗 IL-6 抗体溶液可以通过包括在水性稀释液中混合至少一种抗体的方法而制备。采用常规的溶解和混合步骤进行混合。为了制备适当的稀释液，例如，可以将测得量的溶于水或缓冲液中的至少一种抗体以足以提供所需浓度的蛋白和任选的防腐剂或缓冲液的量混合。本领域技术人员可以了解该方法的变化。例如，加入各成分的顺序、是否使用其它添加剂、制备该制剂的温度和 pH 都是可以对使用的浓度和给药方式进行优化的因素。

本发明的产品可以以澄清的溶液或作为双管形瓶的形式提供给患者，双管形瓶包含一个装有至少一种冻干的抗 IL-6 抗体的管形瓶，将其用含有水性稀释液的第二个管形瓶重构。单一溶液的管形瓶或要求重构的双管形瓶可以重复使用多次，并且可以满足病人治疗的单个或多个周期，因此比当前存在的方法提供更方便的治疗方案。

本发明的产品可以以澄清的溶液或作为双管形瓶的形式提供给药店、诊所、或其它机构和设施，从而直接提供给患者，其中双管形瓶包含一个装有至少一种冻干的抗 IL-6 抗体的管形瓶，将其用含有水性稀释液的第二个管形瓶重构。此情况下的澄清溶液最多可达 1 升或甚至更多，提供于大的储存容器，从中可以一次或多次取出至少一种抗体溶液的更小部分，将其转移至更小的管形瓶中，由药店或诊所提

供给客户和/或病人。

公认的包括这些单个管形瓶体系的设备包括用于递送溶液的笔式注射器，例如 BD Pens, BD Autojector[®], Humaject[®], NovoPen[®], B-DPen[®], AutoPen[®], 以及 OptiPen[®], GenotropinPen[®], Genotronorm Pen[®],
5 Humatro Pen[®], Reco-Peno[®], Roferon Pen[®], Biojector[®], iject[®], J-tip Needle-Free Injector[®], Intraject[®], Medi-Ject[®], 如由以下公司生产：
Becton Dickensen (Franklin, Lakes, NJ, www.bectondickenson.com),
Disetronic (Burgdorf, Switzerland, www.disetronic.com; Bioject,
Portland, Oregon (www.bioject.com); National Medical Products,
10 Weston Medical (Peterborough, UK, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, www.mediject.com)。公认的包括双管形瓶的设备包括用于在药筒中递送重构的冻干药物的笔式注射器系统，例如 HumatroPen[®]。

当前要求保护的产品包括包装材料。除了管理部门要求的信息，
15 包装材料提供了可以使用该产品的条件。本发明的包装材料为病人提供了用两个管形瓶中的湿/干产品在水性稀释液中重构至少一种抗 IL-6 抗体，以形成溶液，并且在 2 - 24 小时或更长的时间内使用该溶液的说明。对于单一管形瓶中的溶液产品，该标签说明该溶液可以在 2 - 24 小时或更长的时间内使用。当前要求保护的产品可以用于人类药用产品用途。
20

本发明的制剂可以通过以下方法制备，包括混合至少一种抗 IL-6 抗体和选定的缓冲液，优选含有盐水或选定的盐的磷酸缓冲液。用常规溶解和混合步骤在水性缓冲液中混合至少一种抗体和缓冲剂。为了制备适当的制剂，例如，可以将测得量的溶于水或缓冲液中的至少一种抗体以足以提供所需浓度的蛋白和缓冲剂的量与所需缓冲剂在水中混合。本领域技术人员可以了解该方法的变化。例如，加入各成分的顺序、是否使用其它添加剂、制备该制剂的温度和 pH 都是可以对使用的浓度和给药方式进行优化的因素。
25

要求保护的稳定或储存的制剂可以以澄清的溶液或作为双管形瓶的形式提供给患者，双管形瓶包含一个装有至少一种冻干的抗 IL-6
30 抗体的管形瓶，将其用含有水性稀释液的第二个管形瓶重构。单一溶液的管形瓶或要求重构的双管形瓶可以重复使用多次，并且可以满足

病人治疗的单个或多个周期，因此比当前存在的方法提供更方便的治疗方案。

可以根据本发明通过各种递送方法给予患者此处描述的至少一种抗 IL-6 抗体的稳定或储存制剂或溶液；所述方法包括皮下或肌内注射；经皮、肺部、经粘膜、植入、渗透泵、药筒、微泵，或其它本领域公知的本领域技术人员了解的方法。

治疗用途

由于其多亲嗜性活性，IL-6 参与多种疾病的病理学。因此，IL-6 的高亲和力的中和性嵌合或人抗体将是用于 IL-6 相关疾病，如癌症、恶液质、SLE、类风湿关节炎、骨质疏松、脑创伤、脑水肿、抑郁和 CHF 所需要的。cCLB8 或该 mAb 的任何衍生物，包括嵌合或人源化的衍生物或片段可以用于缓解骨痛、抑制肿瘤生长，所述肿瘤如骨髓瘤、肾癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌和多发性骨髓瘤、淋巴细胞增殖性病症和 IL-6 所涉及的其它疾病。该抗体可以作为单一试剂使用或与其它治疗剂联合。此外，该 Mab 可以用作化学增敏剂，从而可以增加细胞毒性剂的疗效。该抗体可以用作放疗增敏剂，从而可以改善放疗效率。也可以将其与其它肿瘤调节剂，如 IL-2, IL-12 和/或 IFN α 联合使用。

因此，本发明也提供了使用本发明的至少一种 IL-6 抗体调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种本领域公知或此处描述的 IL-6 相关疾病的方法。

已知 IL-6 通过涉及抑制恶性细胞凋亡的自分泌或旁分泌机制增强多发性骨髓瘤 (MM) 中恶性浆细胞的增殖、分化和存活。MM 是一种可治愈的恶性浆细胞疾病，其中推断阻断 IL-6 是有效的治疗 (Anderson et al., Multiple Myeloma: New Insights and Therapeutic Approaches. Hematology; 147-165, 2000)。IL-6 在基底细胞癌中也具有肿瘤发生作用，其中 IL-6 转染的细胞表现出通过抑制凋亡和活跃促进而增加肿瘤生长速度 (Jee et al., Overexpression of interleukin-6 in human basal cell carcinoma cell lines increases anti-apoptotic activity and tumorigenic potency. Oncogene, Vol. 20, No. 2 pp. 198-208, 2001)。IL-6 也可以通过诱导 mdrl 基因表达 (mdrl 和金属硫蛋白途径) 而促进乳腺癌细胞对化疗的抗性 (Conze et al, Autocrine Production

of Interleukin 6 Causes Multidrug Resistance in Breast Cancer Cells. Cancer Res 61: 8851-8858, 2001).

通过抗 IL-6 mAb 在体外和体内对肿瘤细胞生长的抑制作用，证实了 IL-6 介导肿瘤细胞存活和疾病进展的能力。已经报道阻断 IL-6 可以体外抑制人脑肿瘤（成胶质细胞瘤）的生长(Goswami et al., Interleukin-6-mediated autocrine growth promotion in human glioblastoma multiforme cell line U87MG. J Neurochem 71: 1837-1845,1998)。采用相同的方法，证明注射鼠 CLB8 抗-IL-6 抗体延长了携带人肿瘤的小鼠的存活(Mauray et al., Epstein-Barr virus-dependent lymphoproliferative disease: critical role of IL-6. Eur J Immunol ; 30 (7): 2065-73,2000)。也报道了 CLB8 抗-IL-6 抗体逆转人肾癌的生长并且降低了裸鼠中的血清钙浓度(Weisglass et al., The role of interleukin-6 in the induction of hypercalcemia in renal cell carcinoma transplanted into nude mice. Endocrinology 138 (5): 1879-8., 1995)。CLB-8 抗体也逆转小鼠中建立的人激素难治的前列腺肿瘤异种移植体(Smith et al. 2001) Anti-interleukin-6 monoclonal antibody induces regression of human prostate cancer xenografts in nude mice (Smith and Keller, Prostate; 48(1) : 47-53)。

IL-6 也是恶性肿瘤的预测因子和指标。报道了在肾细胞癌 (RCC) 中，高水平的 IL-6 与肿瘤转移相关，并且最终与预后差和存活短相关(Jean-Yves Blay et al. 1992)。此外，在 RCC 中，升高的血清 IL-6 与对 IL-2 治疗的反应差相关(Fumagalli et al. 1999) Pretreatment serum markers and lymphocyte response to interleukin-2 therapy. Br J Cancer 80 (3-4):407-11，并且与 IL-2 相关毒性的程度相关(Capurion et al. 2001) Association between immune activation and early depressive symptoms in cancer patients treated with interleukin-2-based therapy. Psychoneuroendocrinology; 26 (8): 797-808。

IL-6 的水平升高也与预后差和乳腺癌中转移性疾病的存在相关(Kurebayashi 2000 and Benoy 2002) Regulation of interleukin-6 secretion from breast cancer cells and its clinical implications. Breast Cancer; 7 (2): 124-9. Serum interleukin 6, plasma VEGF, serum VEGF, and VEGF platelet load in breast cancer patients. Clin Breast Cancer;

2 (4): 311-5。

假定 IL-6 是癌症相关病，如虚弱/恶液质和骨重吸收的致病因素。发现肿瘤诱导的恶液质(Cahlin et al. 2000)和骨重吸收（随后的高钙血症）(Sandhu et al. 1999)在 IL-6 敲除小鼠中减少。继发于脑肿瘤的癌症相关抑郁和脑水肿也与高水平的 IL-6 相关(Musselman et al. 2001)。本发明的 cCLB8 抗 IL-6 抗体也在裸鼠中抑制人骨髓瘤和人前列腺癌诱导的恶液质。

用抗 IL-6 剂的临床经验

在多种疾病，包括浆细胞白血病、多发性骨髓瘤、B 淋巴细胞增殖性疾病、类风湿关节炎、肾癌和 AIDS 相关淋巴瘤中，采用抗 IL-6 的单克隆抗体进行了一些临床试验。

采用本发明的抗 IL-6 cCLB-8 抗体治疗患有晚期多发性骨髓瘤的难治患者 (N = 12) 进行的 I 期剂量递增研究证明了一些患者具有疾病稳定化。终止治疗后，M 蛋白水平的增加加速，提示治疗停止后的疾病反弹。抗-IL-6 cCLB-8 抗体抑制游离的循环 IL-6。最重要的是没有观察到毒性（除在两名严重的预先进行过治疗的患者中有短暂的血小板减少）或过敏反应。在所有患者中 C 反应蛋白(CRP)减少到检测水平以下。抗-IL-6 cCLB-8 抗体表现出 17.8 天的长的循环半衰期，并且没有观察到人抗嵌合抗体(HACA)免疫应答(van Zaanen et al. 1998)。给予 CNTO 328 没有导致血压、脉搏、体温、血红蛋白、肝功能和肾功能的改变。除了两名严重的预先进行过治疗的患者中有短暂的血小板减少，没有观察到毒性或过敏反应，并且没有观察到人抗嵌合抗体(HACA)免疫应答。3 名患者在治疗中发生了感染相关的并发症，与抗-IL-6 cCLB-8 抗体的可能联系是不太可能的，因为感染并发症是晚期多发性骨髓瘤常见的，并且是死亡的主要原因。此外，所有 3 名患者都能在存在抗-IL-6 cCLB-8 抗体的条件下对他们的感染事件有应答，提示抗 IL-6 治疗在感染中不能阻断 IL-6。没有报道治疗相关的死亡。总之，该研究的结果表明抗-IL-6 cCLB-8 抗体在多发性骨髓瘤患者中是安全的。

因此，本发明提供了一种调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种恶性疾病的方法，所述疾病包括，但不限于，以下疾病中的至少一种：白血病、急性白血病、急性成淋巴细胞白血病

(ALL)、B 细胞、T 细胞或 FAB ALL、急性髓细胞白血病(AML)、慢性髓细胞白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、毛细胞白血病、骨髓发育不良综合征(MDS)、淋巴瘤、何杰金氏病、恶性淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、布加氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、卡波西肉瘤、结直肠癌、肾细胞癌、胰腺癌、前列腺癌、鼻咽癌、恶性组织细胞增多症、副癌综合征/恶性高钙血症、实体瘤、腺癌、肉瘤、恶性黑素瘤、血管瘤、转移性疾病、癌相关骨重吸收、癌相关骨痛等；抑制癌症转移；改善癌症恶液质；治疗如系膜增殖性肾小球肾炎等炎性疾病。所述方法可以任选在给予所述 IL-6 抗体之前、同时或之后，联合给予放疗、抗血管发生剂、化疗剂、法尼基转移酶抑制剂等。

本发明也提供了一种调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种免疫相关疾病的方法，所述疾病包括，但不限于，以下疾病中的至少一种：类风湿性关节炎、幼年类风湿性关节炎、全身发病的幼年类风湿性关节炎、牛皮癣关节炎、强制性脊柱炎、胃溃疡、血清阴性关节病、骨关节炎、炎性肠病、溃疡性结肠炎、系统性红斑狼疮、抗磷脂综合征、虹膜睫状体炎/葡萄膜炎/视神经炎、特发性肺纤维化、系统性血管炎/韦格纳肉芽肿、肉样瘤病、睾丸炎/输精管切除逆转程序、过敏性/特应性疾病、哮喘、过敏性鼻炎、湿疹、过敏性接触性皮炎、过敏性结膜炎、过敏性肺炎、移植、器官移植排斥、移植植物抗宿主疾病、全身炎症反应综合征、脓毒症综合征、革兰氏阳性菌脓毒症、革兰氏阴性菌脓毒症、培养阴性菌脓毒症、真菌脓毒症、中性粒细胞减少性发热、尿脓毒症、脑膜炎球菌血症、创伤/出血、烧伤、离子辐射暴露、急性胰腺炎、成人呼吸窘迫综合征、类风湿性关节炎、酒精诱导的肝炎、慢性炎性病变、肉样瘤病、克隆氏病、镰状细胞贫血、糖尿病、肾病、特应性疾病、过敏反应、过敏性鼻炎、枯草热、终年性肺炎、结膜炎、子宫内膜异位、哮喘、风疹、全身过敏、皮炎、恶性贫血、溶血性疾病、血小板减少症、任何器官或组织的移植排斥、肾移植排斥、心脏移植排斥、肝移植排斥、胰腺移植排斥、肺移植排斥、骨髓移植(BMT)排斥、皮肤同种异体移植排斥、软骨移植排斥、骨移植排斥、小肠移植排斥、胎儿胸腺移植排斥、甲状旁腺移植排斥、任何器官或组织的异种移植排斥、同种异体排斥、抗受体过敏反应、格雷夫斯病、雷诺氏病、B 型胰岛素抵抗糖尿病、哮喘、

重症肌无力、抗体介导的细胞毒性、III型过敏反应、系统性红斑狼疮、POEMS综合征(多发性神经病、器官巨大、内分泌病、单克隆 γ 球蛋白病和皮肤改变综合征)、多发性神经病、器官巨大、内分泌病、单克隆 γ 球蛋白病和皮肤改变综合征、抗磷脂综合征、天疱疮、
5 硬皮病、混合性结缔组织病、特发性阿狄森氏病、糖尿病、慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、白癜风、血管炎、MI心脏切开后综合征、IV型过敏、接触性皮炎、过敏性肺炎、同种异体排斥、细胞内生物引起的肉芽肿、药物过敏、代谢性/特发性威尔逊氏病、血色素沉着病、 α -1-抗胰胰岛素缺陷、糖尿病肾病、桥本氏甲状腺炎、骨质疏松症、下丘脑-垂体-肾上腺轴评估、原发性胆汁性肝硬化、甲状腺炎、
10 脑脊髓炎、恶液质、囊性纤维化、新生儿慢性肺疾病、慢性阻塞性肺疾病(COPD)、家族性血巨噬细胞淋巴细胞组织细胞增多症、皮肤病学状况、牛皮癣、斑秃、肾病综合征、肾炎、肾小球肾炎、急性肾衰竭、血液透析、尿毒症、中毒、惊厥前状态、okt3治疗、抗cd3治疗、
15 细胞因子治疗、化疗、放疗(如包括,但不限于虚弱、贫血、恶液质等)、慢性水杨酸盐中毒等。见,例如 the Merck Manual, 12th-17th Editions, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., eds., Second Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), 在此引
20 入作为参考。

本发明也提供了一种调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中的至少一种感染疾病的方法,所述疾病包括,但不限于,以下疾病中的至少一种:急性和慢性细菌感染、急性和慢性寄生或感染过程,包括细菌、病毒和真菌感染、HIV感染/HIV神经病、脑膜炎、肝炎
25 (甲型、乙型或丙型等)、脓毒性关节炎、腹膜炎、肺炎、会厌炎、大肠杆菌 0157:h7、溶血性尿毒症综合征/血栓溶解性血小板减少性紫癜、疟疾、登革热、利什曼病、麻风病、中毒性休克综合征、链球菌肌炎、气性坏疽、分支杆菌结核、分支杆菌 avium intracellulare、间质性浆细胞肺炎、盆腔炎性疾病、睾丸酮/附睾炎、军团菌病、莱姆病、
30 甲型流感、epstein-barr病毒、生命体征相关的血巨噬细胞综合征、致命性脑炎/无菌性脑膜炎等。

上述任何方法可以任选包括给予需要所述调节、处理或治疗的细

胞、组织、器官、动物或患者有效量的至少一种含有至少一种抗 IL-6 抗体的组合物或药物组合物。用抗 IL-6 进行治疗的适应症公开于以下文献，在此引入本申请作为参考：Van Snick, "interleukin-6: An overview," *Ann. Rev. Immunol.*,8:253-278 (1990);Campbell et al.,
5 "Essential Role for Interferon-gamma And interleukin-6 in Autoimmune Insulin-Dependent Diabetes in NOD/Wehi Mice." *J.Clin. Invest.*,87:739-742(1991); Heinrich et al., "interleukin-6 Monoclonal Antibody Therapy for a Patient with Plasma Cell Leukemia," *Blood*, 78(5): 1198-1204(1991); Starnes et al., "Anti-IL-6 Monoclonal
10 Antibodies Protect Against Lethal Escherichia coli Infection and Lethal Tumor Necrosis Factor-alpha. Challenge in Mice," *J.Immunol.*,145(12):4185-4191 (1990); Strassman et al., "Evidence for the Involvement of Interleukin 6 in Experimental Cancer Cachexia," *J. Clin. Invest.* , 89: 1681-1684 (1992).

15 本发明的任何方法可以包括，给予需要这种调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物、病人有效量的包含至少一种抗 IL-6 抗体的组合物或药物组合物。所述方法可以任选进一步包括用于治疗这些免疫疾病的共同给药或联合治疗，其中给予所述至少一种抗 IL-6 抗体、其特定部分或变体，进一步包括在之前、同时和/或之后，给予至少
20 一种选自下组至少一种的药物：TNF 拮抗剂（例如，但不限于 TNF 抗体或片段、可溶性 TNF 受体或其片段、其融合蛋白、或小分子 TNF 拮抗剂）、抗风湿药物（如氨甲喋呤、金诺芬、金硫葡萄糖、硫唑嘌呤、etanercept、硫代苹果酸金钠、硫酸羟基氯喹、来氟米特、柳氮磺胺吡啶）、肌肉松弛剂、麻醉药、非甾体类抗炎药(NSAID)、镇痛药、
25 麻醉剂、镇静剂、局部麻醉剂、神经肌肉阻滞剂、抗微生物剂（如氨基糖苷、抗真菌剂、抗寄生虫剂、抗病毒剂、carbapenem、头孢菌素、flurorquinolone、大环内酯、青霉素、磺胺、四环素、其它抗微生物剂）、抗牛皮癣药物、皮质类固醇、促蛋白合成类固醇、糖尿病相关试剂、矿物质、营养剂、甲状腺制剂、维生素、钙相关激素、抗腹泻
30 药、止咳药、抗呕吐药、抗溃疡药、通便药、抗凝剂、促红细胞生成素（如 epoetin α ）、非尔司啶（如 G-CSF, Neupogen）、沙拉斯（GM-CSF, 白细胞素）、疫苗、免疫球蛋白、免疫抑制剂（如 basiliximab、

环孢霉素、daclizumab)、生长激素、激素替代药物、雌激素受体调节剂、散瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢药、有丝分裂抑制剂、放射性药物、抗抑郁剂、抗精神病药物、抗躁狂药、抗精神病药物、抗焦虑药、催眠药、拟交感神经药物、刺激剂、donepezil、他克林、
5 抗哮喘药、 β 激动剂、吸入性类固醇、白三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、9-氨基四氢吡啶、肾上腺素或类似物、 α 链道酶 (Pulmozyme)、细胞因子或细胞因子拮抗剂。细胞因子的非限制性实例包括,但不限于 IL-1 至 IL-23 中的任意一种。适当的剂量是本领域公知的。见,例如, Wells et al., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2nd Edition, Appleton and
10 Lange, Stamford, CT (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), 在此全文引入作为参考。

适用于本发明的组合物、联合治疗、共同给药、设备和/或方法的 TNF 拮抗剂(进一步包括本发明的至少一种抗体、其特定片段和变体)
15 包括,但不限于,抗 TNF 抗体、其抗原结合片段、以及与 TNF 特异性结合的受体分子;防止和/或抑制 TNF 合成、TNF 释放或 TNF 作用于靶细胞的化合物,如酰胺吡啶酮、替尼达普、磷酸二酯酶抑制剂(如己酮可可碱、环戊苯吡酮)、A2b 腺苷受体激动剂和 A2b 腺苷受体增强剂;防止和/或抑制 TNF 受体信号传递的化合物,如有丝分裂
20 原激活的蛋白(MAP)激酶抑制剂;阻断和/或抑制膜 TNF 裂解的化合物,如金属蛋白酶抑制剂;阻断和/或抑制 TNF 活性的化合物,如血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂(如卡托普利);和阻断和/或抑制 TNF 活性产生和/或合成的化合物,如 MAP 激酶抑制剂。

治疗处理

25 本发明的任何方法可以包括治疗 IL-6 介导的疾病,包括给予需要这种调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物、病人有效量的包含至少一种 IL-6 抗体的组合物或药物组合物。所述方法可以任选进一步包括用于治疗这些免疫疾病的共同给药或联合治疗,其中给予所述至少一种抗 IL-6 抗体、其特定部分或变体,进一步包括在之前、
30 同时和/或之后,给予至少一种上述试剂。

一般地,病理学状况的治疗是通过给予有效量或剂量的至少一种抗 IL-6 抗体组合物而实现的,该组合物中平均总共含有至少约 0.01

- 500mg 至少一种抗 IL-6 抗体/千克患者体重/剂, 优选每单次或多次给药约 0.1 - 100mg 抗体/千克患者体重, 这取决于组合物中含有的比活性。作为选择, 有效血清浓度可以包括每单次或多次给药 0.1-5000 $\mu\text{g/ml}$ 的血清浓度。适当的剂量是医学从业者已知的, 当然, 取决于特定的疾病状态、给予的组合物的比活性、以及患者正在进行的具体治疗。在一些情况下, 为获得需要的治疗量, 必须提供重复给药, 即重复特定监测或计量剂量的各次给药, 其中重复各次给药, 直到达到需要的每日剂量或效果。

优选的剂量可以任选包括 0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 和/或 100-500 mg/kg/给药, 或其中的任意范围、任意值或任意分数, 或每单次或多次给药达到 0.1、0.5、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.9、2.0、2.5、2.9、3.0、3.5、3.9、4.0、4.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、12、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14.0、14.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、12、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14、14.5、15、15.5、15.9、16、16.5、16.9、17、17.5、17.9、18、18.5、18.9、19、19.5、19.9、20、20.5、20.9、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、96、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、和/或 5000 $\mu\text{g/ml}$ 血清浓度, 或其中的任意范围、任意值或任意分数。

此外, 给药剂量可以根据已知因素而改变, 例如具体试剂的药代动力学特征, 以及其给药模式和途径; 接受者的年龄、健康和体重; 症状的性质和范围; 同时进行的治疗的类型、频率, 以及需要的效果。

活性成分的剂量通常为约 0.1 - 100mg/kg 体重。通常为 0.1 - 50, 优选 0.1 - 10mg/kg/给药, 或以有效获得需要的结果的持续释放形式。

作为非限制性实例, 人或动物的治疗可以通过一次或周期剂量的至少一种本发明的抗体而提供, 其剂量为 0.1 - 100 mg/kg, 例如 0.5、
5 0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90 或 100 mg/kg/日, 在第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、
10 36、37、38、39、或 40 天中的至少一天给药, 或作为选择或额外地在第 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、或 52 周的至少一周给药, 或作为选择或额外地在 1、
15 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 年中的至少一年中给药, 或其任意组合, 采用单次输注或重复给药。

适于内部给药的剂型(组合物)一般包含约 0.1mg - 约 500mg 活性成分/单位或容器。在这些药物组合物中, 活性成分的量一般为组合物
20 总重量的约 0.5-99.999 wt%。

肠胃外制剂和给药

对于肠胃外给药, 可以将抗体配制为与药学可接受的肠胃外载体结合或分别提供的溶液、悬浮液、乳状液或冻干的粉末。这些载体的例子为水、盐水、林格氏液、右旋糖溶液、和 1-10% 的人血清白蛋白。
25 也可以使用脂质体和非水性载体如固定的油。载体或冷冻干燥的粉末可以含有维持等渗性(如氯化钠、甘露醇)和化学稳定性(如缓冲剂和防腐剂)。该制剂可以通过已知或适当技术灭菌。

适当的药物载体描述于本领域的标准参考文献 Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol 的最新版本。

肠胃外给药的制剂可以包含作为常规赋形剂的无菌水或盐水、聚链烷醇如聚乙二醇、植物油、氢化萘等。可以通过适当的乳化剂或润湿剂和悬浮剂根据已知方法制备用于注射的水性或油性悬浮液。用于
30

注射的试剂可以是无毒的、非口服给药的稀释剂，如水溶液或无菌可注射溶液或溶剂中的悬浮液。作为可使用的载体或溶剂，可以使用水、林格氏液、等渗盐水等；作为普通溶剂或悬浮溶剂，可以使用无菌的不挥发油。对于这些目的，可以使用任意类型的不挥发油和脂肪酸，包括天然或合成的或半合成的脂肪油或脂肪酸；天然或合成的或半合成的甘油单酯或二酯或三酯。肠胃外给药是本领域公知的，包括，但不限于，常规注射工具、描述于美国专利 No. 5,851,198 的气加压的无针头注射设备，和描述于美国专利 No. 5,839,446 的激光穿孔器设备，在此全文引入上述专利作为参考。

10 作为选择的递送

本发明进一步涉及通过肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、盆腔内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸内、子宫内、膀胱内、快速注射、阴道、直肠、颊、舌下、鼻内或经皮设备而给予至少一种抗 IL-6 抗体。可以制备至少一种抗 IL-6 抗体的组合物，用于肠胃外（皮下、肌内或静脉内）或任意其它给药，特别是以液体溶液或悬浮液给药；用于阴道或直肠给药，特别是以半固体形式给药，例如，但不限于以霜和栓剂形式给药；用于颊部或舌下给药，例如，但不限于以片剂或胶囊形式给药；或用于鼻内给药，例如，但不限于以粉末、鼻滴液或气溶胶或某些制剂形式给药；或用于经皮给药，例如，但不限于以凝胶、油膏、洗液、悬浮液或贴剂递送系统给药，同时用化学增强剂如二甲基亚砷修饰皮肤结构或增加经皮贴剂的药物浓度 (Junginger, et al. In "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994,) 在此全文引入作为参考)，或使用氧化剂以便将含有蛋白和肽的制剂应用于皮肤上 (WO 98/53847)，或施加电场以便产生电穿孔等瞬时转运途径，或增加带电药物通过皮肤的迁移率，如离子电渗疗法，或应用超声，如超声电渗疗法 (美国专利 Nos. 4,309,989 和 4,767,402) (上述文献和专利在此全文引入作为参考)。

肺部/鼻部给药

对于肺部给药，至少一种抗 IL-6 抗体组合物优选以优选到达肺的

下气道或鼻窦的颗粒大小进行递送。根据本发明，至少一种抗 IL-6 抗体可以通过本领域公知的各种吸入或鼻设备递送，用于通过吸入进行治疗剂的给药。这些设备可以将气溶胶化的制剂沉积在患者的鼻窦腔或肺泡中，所述设备包括计量吸入器、喷洒器、干粉产生器、喷雾器等。其它适于指导抗体的肺或鼻给药的设备是本领域公知的。所有这些设备可以使用适于以气溶胶形式给予分散抗体的制剂。这些气溶胶可以由溶液（水性和非水性）或固体颗粒组成。Ventolin[®]等计量吸入器一般使用推进气体并且在吸入时要求激活（见，例如 WO 94/16970, WO 98/35888）。由 Inhale Therapeutics 出售的 Turbuhaler[™] (Astra)、Rotahaler[®] (Glaxo)、Diskus[®] (Glaxo)、Spiros[™] 吸入器 (Dura) 等干粉吸入器以及 Spinhaler[®] 粉末吸入器使用呼吸激活的混合粉末 (US 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons, 在此全文引入作为参考)。AERx[™] Aradigm、Ultravent[®] 喷洒器 (Mallinckrodt) 和 Acorn II[®] 喷洒器 (Marquest Medical Products) ((US 5404871 Aradigm, WO 97/22376), 上述参考文献在此全文引入作为参考) 从溶液产生气溶胶，而计量吸入器、干粉吸入器等产生小颗粒气溶胶。这些商购吸入设备的具体例子是用于代表适于本发明的实施的具体设备，不准备限制本发明的范围。包含至少一种抗 IL-6 抗体的组合物优选通过干粉吸入器或喷雾器递送。用于本发明的至少一种抗体的给药的吸入设备具有一些需要的特征。例如，通过吸入设备递送是有利的，它可靠、可重复并且准确。吸入设备可以任选递送小的干颗粒，例如小于约 10 μm ，优选约 1 - 5 μm ，以便能够较好地呼吸。

作为喷雾给予 IL-6 抗体组合物

可以迫使至少一种抗 IL-6 抗体的悬浮液和溶液在压力下通过喷嘴，从而产生包括 IL-6 抗体组合物的喷雾。可以选择喷嘴大小和构型、施加的压力和填入液体的速度而达到需要的输出量和颗粒大小。可以通过连接于毛细管或喷嘴的电场产生电喷雾。有利的是，由喷雾递送的至少一种抗 IL-6 抗体组合物蛋白的颗粒大小小于约 10 μm ，优选约 1 - 5 μm ，最优选约 2 - 3 μm 。

适用于喷雾器的至少一种抗 IL-6 抗体组合物蛋白的制剂一般包含溶于水溶液中的抗体组合物蛋白，其浓度为约每毫升溶液约 0.1 - 100

mg 至少一种抗 IL-6 抗体组合物蛋白或 mg/gm, 或其中的任意范围或任意值, 例如, 但不限于 1、.2、.3、.4、.5、.6、.7、.8、.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、5 80、90 或 100 mg/ml 或 mg/gm。该制剂可以包含赋形剂、缓冲剂、等渗试剂、防腐剂、表面活性剂和优选锌等试剂。该制剂也可以包含赋形剂或用于稳定组合物蛋白的试剂, 例如缓冲剂、还原剂、大分子蛋白或碳水化合物。用于配制抗体组合物蛋白的大分子蛋白包括白蛋白、鱼精蛋白等。用于配制抗体组合物蛋白的典型碳水化合物包括蔗糖、10 甘露醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等。抗体组合物蛋白制剂也可以包含表面活性剂, 它可以减少或防止由于溶液形成气溶胶时的雾化导致的表面诱导的抗体组合物蛋白的聚集。可以使用各种常规的表面活性剂, 例如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇, 以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。其含量一般为制剂重量的约 0.001 - 14%。用于本发明的特别优选的表面活性剂为聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯、polysorbate 80、15 polysorbate 20 等。用于 IL-6 抗体或其特定部分或变体的蛋白制剂的其它试剂是本领域公知的, 也可以包含在制剂中。

通过喷洒器给予 IL-6 抗体组合物

可以通过喷洒器给予抗体组合物, 例如喷射喷洒器或超声喷洒器。20 一般地, 在喷射喷洒器中, 用压缩气体源通过一个孔而产生高速气体喷射。当其它膨胀超过喷嘴时, 产生低压区, 该区将抗体组合物蛋白溶液拉拽通过与液体储存器连接的毛细管。通过毛细管的液体流出管时被剪切成不稳定的细丝和微滴, 产生气溶胶。可以使用各种构型、流速和挡板类型一般从给定的喷射喷洒去达到需要的性能特征。在超25 声喷洒器中, 采用高频电能产生振动、机械能, 一般采用压电式换能器。该能量被直接或通过耦合流体转移至抗体组合物制剂, 产生包含抗体组合物蛋白的气溶胶。有利地, 由喷洒器递送的抗体组合物蛋白的颗粒大小小于约 10 μm , 优选约 1 - 5 μm , 最优选约 2 - 3 μm 。

喷射喷洒器或超声喷洒器中适用的至少一种抗 IL-6 抗体制剂的浓30 度一般为每毫升溶液约 0.1 - 100mg 至少一种抗 IL-6 抗体蛋白。该制剂可以包含赋形剂、缓冲剂、等渗试剂、防腐剂、表面活性剂和优选锌等试剂。该制剂也可以包含赋形剂或用于稳定至少一种抗 IL-6 抗

体组合物蛋白的试剂，例如缓冲剂、还原剂、大分子蛋白或碳水化合物。用于配制至少一种抗 IL-6 抗体的大分子蛋白包括白蛋白、鱼精蛋白等。用于配制至少一种抗 IL-6 抗体的典型碳水化合物包括蔗糖、甘露醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等。至少一种抗 IL-6 抗体制剂也可以包含表面活性剂，它可以减少或防止由于溶液形成气溶胶时的雾化导致的表面诱导的至少一种抗 IL-6 抗体的聚集。可以使用各种常规的表面活性剂，例如聚氧乙烯脂肪酸酯和醇，以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯。其含量一般为制剂重量的约 0.001 - 4%。用于本发明的特别优选的表面活性剂为聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯、
5 polysorbate80、polysorbate20 等。用于抗体蛋白等蛋白制剂的其它试剂是本领域公知的，也可以包含在制剂中。

通过计量吸入器给予 IL-6 抗体组合物

在计量吸入器(MDI)中，在一个小罐中装有作为包含液化的压缩气体的混合物的推进剂、至少一种抗 IL-6 抗体和任意赋形剂或其它
15 添加剂。计量阀的激活释放作为气溶胶的混合物，优选含有大小小于约 10 μm ，优选约 1 - 5 μm ，最优选约 2 - 3 μm 的可以。需要的气溶胶颗粒大小可以通过使用由本领域技术人员公知的各种方法，包括喷射研磨、喷雾干燥、临界点浓缩等方法产生的抗体组合物蛋白制剂而获得。优选的计量吸入器包括由 3M 或 Glaxo 制造并且使用氢氟碳
20 推进剂的那些。

计量吸入器设备中使用的至少一种抗 IL-6 抗体一般包含精细分割的粉末，其中含有作为非水介质中的悬浮物的至少一种抗 IL-6 抗体，例如，在表面活性剂的帮助下悬浮于一种推进剂中。用于此目的的推进剂可以是任何常规材料，如氢氟碳、氢氟碳、氢氟碳或烃，包括
25 三氟甲烷、二氟二氯甲烷、二氟四氯乙醇和 1,1,1,2-四氟乙烷、HFA-134a (氢氟链烷-134a)、HFA-227 (氢氟链烷-227) 等。推进剂优选是氢氟碳。可以选择表面活性剂以稳定作为推进剂中的悬浮物的至少一种抗 IL-6 抗体，从而保护活性试剂免受化学降解等。适当的表面活性剂包括山梨糖醇三油酸酯、大豆卵磷脂、油酸等。在一些情
30 况下，溶液气溶胶优选使用乙醇等溶剂。本领域已知的用于蛋白制剂的其它试剂，如蛋白，也可以包含在制剂中。

本领域的普通技术人员将认识到，本发明的方法可以通过此处没

有描述的设备对至少一种抗 IL-6 抗体组合物进行肺部给药而达到。

口服制剂和给药

口服制剂依赖于佐剂（如间苯二酚和非离子型表面活性剂如聚氧乙烯油酯和正十六烷基聚乙烯酯）的共同给药而人工增加肠壁的可透性，并且依赖于酶抑制剂（如胰蛋白酶抑制剂、二异丙基氟代硫酸酯 (DFF) 和抑肽酶）的共同给药而抑制酶促降解。用于口服给药的固体制剂的活性组成化合物可以与至少一种添加剂混合，所述添加剂包括蔗糖、乳糖、纤维素、甘露醇、海藻糖、棉籽糖、麦芽糖醇、右旋糖苷、淀粉、琼脂、arginates、几丁质、脱乙酰壳聚糖、果胶、黄芪树胶、阿拉伯树胶、明胶、胶原、酪蛋白、白蛋白、合成或半合成聚合物和甘油酯。这些剂型也可以包含其它类型的添加剂，如非活性稀释剂、润滑剂如硬脂酸镁、对羟基苯甲酸酯、防腐剂如山梨酸、抗坏血酸、 α 生育酚、抗氧化剂如半胱氨酸、崩解剂、粘合剂、增稠剂、缓冲剂、增甜剂、矫味剂、芳香剂等。

片剂和丸剂可以进一步加工成肠衣制剂。用于口服给药的液体制剂包括允许医学应用的乳状液、糖浆、酏剂、悬浮液和溶液制剂。这些制剂可以含有所述领域常用的非活性稀释剂，如水。也已经描述将脂质体用作胰岛素和肝素的药物递送系统（美国专利 No. 4,239,754）。最近，已经使用混合氨基酸（类蛋白）的人工聚合物微球体来递送药物（美国专利 No. 4,925,673）。此外，美国专利 No. 5,879,681 和美国专利 No. 5,587,753 中描述的载体化合物也已经用于口服递送生物活性试剂，这是本领域公知的。

粘膜制剂和给药

对于通过粘膜表面吸收，给予至少一种抗 IL-6 抗体的组合物和方法包括含有多种亚微米颗粒、粘膜吸附性大分子、生物活性肽和水性连续相的乳状液，它通过达到乳状液颗粒的粘膜吸附而促进通过粘膜表面的吸收（美国专利 Nos. 5,514,670）。适于施加本发明的乳状液的粘膜表面可以包括角膜、结膜、颊、舌下、鼻、阴道、肺、胃、肠和直肠给药途径。用于阴道或直肠给药的制剂，如栓剂，可以包含赋形剂，例如聚链烷醇、凡士林、可可油等。用于鼻内给药的制剂可以是固体，包含赋形剂，例如乳糖，或可以是水性或油性的鼻滴液。对于颊部给药，赋形剂包括糖、硬脂酸钙、硬脂酸镁、预胶化淀粉等（美

国专利 Nos. 5,849,695)。

经皮制剂和给药

5 对于经皮给药，将至少一种抗 IL-6 抗体包被于递送载体，如脂质体或聚合纳米颗粒、微颗粒、微胶囊或微球体中（除非特别指出，统一称作微颗粒）。已知有许多适当的设备，包括由以下成分组成的微颗粒：合成聚合物如多羧基酸，如聚乳酸、聚乙醇酸及其共聚物、聚原酸酯、聚酞和聚磷腈，以及天然聚合物如胶原、聚氨基酸、铝和其它蛋白、藻酸盐和其它多糖、及其组合（美国专利 Nos. 5,814,599）。

延长的给药和制剂

10 有时可能需要在延长的时间内向受试者递送本发明的化合物，例如，单次给药在一周至一年的时间。可以使用各种缓释、储存或植入剂型。例如，该剂型可以包含化合物的药学可接受的无毒盐，该化合物在体液中具有低溶解度，例如，(a)多价酸的酸加成盐，所述酸例如磷酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、鞣酸、pamoic 酸、藻酸、聚谷氨酸、
15 萘单或二磺酸、聚半乳糖醛酸等；多价金属阳离子的盐，所述阳离子如锌、钙、铋、钡、镁、铝、铜、钴、镍、镉等，或与有机阳离子如 N, N'-二苄基-乙二胺或乙二胺形成的盐；或(c), (a)和(b)的组合物，如鞣酸锌。此外，本发明的化合物或优选相对不溶的盐，如前面描述的化合物和盐，可以与芝麻油等适于注射的物质一起配制于单硬脂酸铝
20 凝胶等凝胶中。特别优选的盐是锌盐、鞣酸锌盐、pamoate 盐等。用于注射的缓释储存制剂的另一种类型包含用于包被于胶囊中的分散的化合物或盐，所述化合物或盐位于缓慢降解、无毒、非抗原性的聚合物中，如描述于美国专利 No. 3,773,919 的聚乳酸/聚乙醇酸聚合物。该化合物或优选相对不溶的盐，如前面描述的化合物和盐，也可以配
25 制于胆固醇基质硅橡胶丸，特别是用于动物。其它缓释、储存或植入制剂，如气体或液体脂质体是本领域公知的（美国专利 Nos. 5,770,222 和 "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N. Y., 1978）。

30 缩写

BSA - 牛血清白蛋白

EIA - 酶免疫测定

- FBS - 胎牛血清
 H₂O₂ - 过氧化氢
 HRP - 辣根过氧化物酶\
 Ig - 免疫球蛋白
 5 IL-6 - 白介素 - 6
 IP - 腹腔内
 IV - 静脉内
 Mab - 单克隆抗体
 OD - 光密度
 10 OPD - 邻苯二胺二盐酸盐
 PEG - 聚乙二醇
 PSA - 青霉素, 链霉素, 两性霉素
 RT - 室温
 SQ - 皮下
 15 v/v - 体积/体积
 w/v - 重量/体积

实施例 1

制备鼠 CLB8 MAB

20 免疫

按照报道, 产生鼠 CLB-IL6-8 抗体的杂交瘤来自于荷兰红十字会输血服务机构的中心实验室, Lucein Aarden 博士的实验室中进行的融合 (CLB) (Brackenhoff 等, J. Immunol. (1990) 145:561-568)。

- 25 用 10 μg 乳化于弗氏完全佐剂中的纯化重组白介素-6 (rIL-6) (CLB) 肌内 (IM) 免疫从 CLB 的指定的不含病原体的繁殖原种获得 8 周龄的雌性 Balb/c 小鼠。以 4-8 周的间隔, 用弗氏不完全佐剂中的各 10 μg rIL-6 进行随后三次 IM 注射。

细胞融合

- 30 最后一次 IM 加强注射后 4 天, 处死小鼠; 取出脾, 切碎。在 Earle's 平衡盐溶液中获得单细胞悬浮液。洗涤细胞并计数。在 Iscove's 改进的 Dulbecco's 培养基 (IMDM) 中的 42% (w/v) 聚乙二醇存在下以 1:3

的存活脾细胞与鼠骨髓瘤细胞 (SP2/0-Ag14)的比例进行融合。非 IgG 分泌性融合配偶体 SP2/0 是从在 CLB 维持的细胞库建立的。融合后, 将细胞重悬于 IMDM, 补加 5%胎牛血清, 50 μ M 青霉素/链霉素, 5 $\times 10^{-5}$ M 2-巯基乙醇 (2-ME) 和 HAT(6 $\times 10^{-4}$ M 次黄嘌呤, 6.5 $\times 10^{-7}$ M 氨基喋呤, 6.4 $\times 10^{-5}$ M 胸腺嘧啶)。紧接于融合后的这些杂交瘤的增殖依赖于 IL-6, 因此, 向选择培养基中加入 100U/mL 的纯化鼠 IL-6 (Van Smick, Brussels)。然后将融合细胞以 1×10^5 细胞/100 微升孔的密度分布于 96 孔板中。

10 鼠 IL-6 杂交瘤的初步表征

通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和放射免疫测定 (RIA) 选择抗 IL-6 分泌性杂交瘤 (Brackenhoff 等 (1990) 145: 561-568)。采用固相 ELISA 筛选入 IL-6 的特异性单克隆抗体。室温下, 以 100 μ L/孔将磷酸缓冲的盐溶液 (PBS) 中的纯化 rIL-6 (0.5 μ g/ml) 包被在平底板 (Dynatech) 上。用 PBS、0.02% (v/v) Tween 20 (PBS/Tween) 洗涤平板, 并且在环境温度下用补加了 0.2% 明胶 (PTG) 的 PBS/Tween 中的培养物上清液的 1:2 稀释液温育 2 小时。洗涤后, 用 PTG 中的辣根过氧化物酶偶联的单克隆大鼠抗小鼠 κ 轻链 226 (Einstein University, NY) (2 μ g/mL) 温育平板。洗涤平板, 用 0.1M 乙酸钠, pH5.5 中的 100 μ L/孔的 3,5,3,5 四甲基联苯胺/0.003% 过氧化氢检测结合的过氧化物酶。用 2M H_2SO_4 终止颜色反应, 在 Titertek, Multiscan 读数器上在 450nm 处读数。选择产生阳性 OD 的孔。

也采用固相 RIA 筛选抗 IL-6 杂交瘤。将山羊抗鼠 Ig 抗体偶联于溴化氰活化的琼脂糖 CL-4B (Pharmacia)。洗涤琼脂糖并且以 10mg/mL 重悬于 PBS, 0.1% Tween 20, 0.1% 叠氮化钠。在大约 20000 计数/分钟 125 I-rIL-6 (CLB) 存在下, 在恒定搅拌下将杂交瘤上清液加入琼脂糖珠 6 小时。在 PBS/Tween 存在下充分洗涤珠子, 并且在 γ 计数器中计数。选择产生最高比活性的孔。

确立在两种测定系统中均为阳性的杂交瘤, 并且以有限稀释在补加了 2×10^{-5} M 2-ME 和 5% FBS 的 IMDM (完全 IMDM) 中亚克隆两次。选择 IL-6 非依赖性亚克隆 CLB-IL6-8, 在完全 IMDM 中维持。在 Vero76 靶细胞上培养 4 天后, 用间接 Hoescht 染色检验出支原体

阴性的原种培养物。通过 Innogenetics Line ImmunoAssay (INNO-LIA) 小鼠单克隆抗体同种型试剂盒进行的上清液同种型测定，产生了单一的小鼠同种型 IgG₁ κ。该同种型测定是通过捕获 EIA 证实的。

如此产生了鼠杂交瘤和细胞系。CLBIL-6/8 称作 CLB8。按照下文的描述进行嵌合化和进一步表征。

实施例 2: 嵌合和测序

cCLB8 可变区基因的克隆和表达

从分泌人 IL-6 的特异性鼠单克隆抗体的鼠杂交瘤 C143A 分离基因组 DNA。

10 对于轻链，用限制性内切酶 Hind III 消化 DNA，并且通过 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳。切除含有长度为大约 3.4Kb 的 DNA 片段的凝胶部分，洗脱 DNA。将片段连接至载体 8charon27 中，并且包装至噬菌体颗粒中。对于重链，用限制性内切酶 Eco RI 消化 DNA，并且通过 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳。切除含有长度为大约 3.6Kb 的 DNA 片段的凝胶部分，洗脱 DNA。将片段连接至载体 8gt10 中，并且包装至噬菌体颗粒中。

15 将重链和轻链噬菌体文库铺于大肠杆菌上，生长过夜。将噬斑转移到硝酸纤维素滤膜上，用 ³²P 标记的相当于鼠 J_κ (轻链) 或鼠 J_H 序列的 DNA 片段探测。鉴定阳性噬斑并且进行噬斑纯化。分离噬菌体 DNA，分离 Hind III (轻链) 或 Eco RI (重链) 插入片段并且克隆至免疫球蛋白表达载体中。

20 用重链和轻链表达质粒共转染 SP2/0 细胞，并进行霉酚酸选择。鉴定各个产生嵌合抗体的克隆，并且亚克隆以确保单克隆性并且产生更高产者。

25 在 IL-6 依赖性 B9 细胞增殖测定中检测从各个细胞系统纯化的抗体的中和能力。在整个申请中将该抗体称作嵌合 CLB8 或 cCLB8。

cCLB8 重链可变区

```

E V Q L V E S G G K L L K P G G S L K L
GAG GTG CAA CTG GTG GAA TCT GGA GGA AAA TTA CTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CT

S C A A S G F T F S S F A M S W F R Q S
TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TTT GCC ATG TCT TGG TTT CGC CAG TC

```

CDR 1

P E K R L E W V A E I S S G G S Y T Y Y
CCA GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA GAA ATT AGT AGT GGT GGG AGT TAC ACC TAC TAT

CDR 2

P D T V T G R F T I S R D N A K N T L Y
CCT GAC ACT GTG ACG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC

L E M S S L R S E D T A M Y Y C A R G L
CTG GAA ATG AGC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACG GCC ATG TAT TAT TGT GCA AGG GGT TTA

W G Y Y A L D Y W G Q G T S V T V S S
TGG GGG TAC TAT GCT CTT GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA

CDR 3

cCLB8 轻链可变区

Q I V L I Q S P A I M S A S P G E K V T
CAA ATT GTT CTC ATA CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC

M T C S A S S S V S Y M Y W Y Q Q K P G
ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG TAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA

CDR 1

S S P R L L I Y D T S N L A S G V P V R

TCC TCC CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT
CGC

CDR 2

F S G S G S G T S Y S L T I S R M E A E
TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAG

D A A T Y Y C Q Q W S G Y P Y T F G G G
GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT GGT TAC CCA TAC ACG TTC GGA GGG GGG

CDR 3

T K L E I K
ACC AAG CTG GAA ATA AAA

实施例 3: 通过固相 EIA 测量 cCLB8 与人 IL-6 的结合

用固相 EIA 评估 cCLB8 Mab 与人 IL-6 的结合特征。简言之，用 PBS 中的 1 μ g/mL 重组人 IL-6 (RDI) 包被平板。在含有 0.02% (v/v) Tween 20 的 0.15M 盐水中洗涤后，室温下用 200 μ L/孔 PBS 中的 1% (w/v) BSA 封闭孔 1 小时。37 $^{\circ}$ C 下从 5 μ g/mL 的起始浓度在 2 倍的系列稀释液中温育纯化的抗体 1 小时。洗涤平板，然后用在 1% BSA-PBS 中 1:20000 稀释的 50 μ L/孔 HRP 标记的山羊抗人 IgG (Tago) 探测。再次洗涤平板，在室温下加入 100 μ L/孔的柠檬酸 - 磷酸底物溶液 (0.1M 柠檬酸和 0.2M 磷酸钠，0.01% H₂O₂ 和 1mg/mL OPD) 15 分钟。然后以 25 μ L/孔加入终止溶液 (4N 硫酸)，采用自动化的平板光度计在 490nm 下对吸光度进行定量。图 1 表示测量为 OD 490nm 的 cCLB8 与 IL-6 的结合，证明 cCLB8 以浓度依赖性方式结合于重组人 IL-6。

15 实施例 4: 体外中和测定

通过 cCLB8 阻断 IL-6 抑制了 IgM 和 MCP-1 的分泌

以两种简单的生物测定形式评估嵌合的单克隆抗体 cCLB8，以确定其对 IL6 诱导的人 IgM 和趋化因子 MCP-1 的分泌的中和性生物活性。在这些研究中使用了两种人细胞系。SKW6.4 细胞系最初来源于 EBV 转化的 Burkitt 氏 B 细胞淋巴瘤并且反应于 IL-6 而分泌可溶

性 IgM。U937 细胞系是成单核细胞的，定型于单核细胞分化并且最初是由患有弥散性组织细胞淋巴瘤的患者分离的。U937 细胞反应于 IL6 而分泌 MCP-1。评价了 cCLB8 对这些特殊生物活性的抑制，因为可以很容易采用 EIA 形式对它们进行监测。在测定前，使细胞脱离血清过夜，然后在第二天单独、与 IL-6 一起，或与用各种浓度的抗体或阴性对照抗体预先温育的 IL6 一起培养。在 72 小时的结束时间时，收集温育上清液，并且用于 IgM 特异性和 MCP-1 特异性 EIA。结果如图 2 和 3 所示，证明 cCLB8 显著抑制 IL6 介导的 IgM 和 MCP-1 的体外分泌。

在图 2 表示的实验中，在 4℃ 下用 10mM 碳酸盐缓冲液，pH9.6 中的特异性山羊抗人 IgM Fc5 μ 片段包被 EIA 板。采用含有 0.02% v/v Tween 20 的 0.15M 盐水洗涤平板，并且用 PBS/1% w/v BSA 封闭 1 小时。以系列 2 倍稀释液加入细胞培养上清液。在温育和随后用 0.02% Tween, 0.15 盐水洗涤后，用特异性的 HRP 标记的山羊抗人 IgM μ 链探测平板。然后加入 OPD 底物，随后显色，在 490nm 下读出 OD。数据表明是 cCLB8，而不是同种型匹配的阴性对照 cK931，抑制 IgM μ 分泌。

在图 3 表示的实验中，在 4℃ 下用 10mM 碳酸盐缓冲液，pH9.6 中的山羊抗人 MCP-1 包被 EIA 板。采用含有 0.02% v/v Tween 20 的 0.15M 盐水洗涤平板，并且用 PBS/1% w/v BSA 封闭 1 小时。以系列 2 倍稀释液加入细胞培养上清液。在 2 小时的温育和随后用 0.02% Tween, 0.15 盐水洗涤后，按照制造商的说明，用生物素化的抗人 MCP-1 探测平板。再次洗涤平板，然后加入 HRP 标记的链亲和素 1 小时。用 TMB 底物进行显色。在 450nm 下读出 OD。数据表明是 cCLB8，而不是 cK931，抑制 IL-6 介导的 MCP-1 产生。

IL-6 介导的 STAT3 的磷酸化的中和

IL6 受体由 80kD 的结合亚基、IL6R α 和信号转导亚基 gp130 组成。IL6 结合于 IL6R α 亚基并且起始 IL6R α 和 gp130 的缔合，导致高亲和力受体和信号转导。IL6R α 也以可溶形式存在。IL6 可以结合于可溶的 IL6R (sIL6R)，并且复合物可以作用于表达 gp130 的细胞。也已经表明 IL6 激活 STAT3。用人急性单核细胞白血病细胞系 THP-1 证明了 cCLB8 抑制 STAT3 的磷酸化。用 (IL6+sIL6R) +/-cCLB8 或

作为阴性对照的无关抗体 (K931) 刺激细胞。用抗 STAT3 免疫沉淀细胞裂解物, 在 7.5% SDS-PAGE 上分辨样品, 并且转移到 Hybond-P 膜, 然后采用抗磷酸酪氨酸 - HRP 进行蛋白印迹。用 ECLplus 进行检测。

5 图 4 示出的数据表明, 在以下情况 cCLB8 可以抑制 STAT3 的磷酸化: 当 a) 在加入 sIL6R 前允许其与 rhIL6 结合, b) 在加入 rhIL6 前允许其与 sIL6R 结合, 或 c) 在加入 cCLB8 和细胞前允许 rhIL6 与 sIL6R 结合。在无血清的培养基中温育 THP-1 细胞 16 小时, 从烧瓶上刮下, 并且重悬于 0.5ml 培养基。2-6 道, IL6 温育 +/- 抗体 15
10 分钟, 然后加入 sIL6R 并且温育 15 分钟。加入细胞, 再温育 15 分钟。第 7 道, 用 sIL6R 温育 IL6 15 分钟, 然后加入 CLB-IL6, 温育 15 分钟。加入细胞, 再温育 15 分钟。用抗 STAT3[1 μ g/ml]免疫沉淀样品, 重悬于 Laemmli 样品缓冲液, 在 7.5% SDS-PAGE 上分辨, 并且转移到 Hybond-P。用抗磷酸酪氨酸 - HRP 温育膜。

15 cCLB8 抑制血清淀粉样蛋白 A

IL-1 β 是人 IL-6 存在下由 HepG2 人肝细胞瘤细胞产生血清淀粉样蛋白 A (SAA) 的有效诱导物 (Smith 和 McDonald, Clin Exp. Immunol. 90:293-9 (1992))。因此, 测定了 cCLB8 Mab 抑制 IL-1 β /IL-6 诱导的这些细胞产生 SAA 的能力。简言之, 将 HepG2 细胞以 2.25×10^5 /孔
20 接种 24 小时。预温育 IL-6 (100ng/ml, RDI) 和 IL-6sR (200ng/ml, S&D) 30 分钟, 并且与 IL-1 β (1ng/ml, R&D) 混合。系列稀释 cCLB8 Mab 和阴性同种型对照 Mab (cSF25), 然后用上述混合物再预温育 30 分钟。

对于图 5 所示的实验结果, 用 IL-6sR 和 IL-1 β 预温育 cCLB8 或 cSF25 (同种型匹配的无关 Mab) 的系列稀释液, 然后与 HepG2 细胞
25 一起培养 24 小时。然后通过 ELISA 分析细胞上清液的血清淀粉样蛋白 A 产生水平。(人 SAA ELISA 试剂盒, Biosource, 根据制造商的说明进行)。误差柱表示重复样品的 SEM。图 5 的数据表明 cCLB8 能够以剂量依赖性方式抑制 IL-1 β /IL-6 诱导的 HepG2 细胞的 SAA 产生。

30 由 vCLB Mab 抑制 IL-6 诱导的细胞增殖

诱导鼠 B 骨髓瘤细胞系 7TD1 在 IL-6 存在下增殖。为了证明 cCLB8 Mab 中和 IL-6 活性的能力, 37 $^{\circ}$ C 下将细胞在含有 10% FBS 和

0.5ng/mL 重组人 IL-6 (R&D System)的 IMDM 中温育 72 小时, 其中含有 cCLB8 Mab 或阴性对照 Mab 17-1A 的系列稀释液。通过荧光 ATP 测定 (ATPLite, Packard Bioscience) 测量细胞增殖, 它与细胞数直接相关。

- 5 图 6 所示的数据证明 IL-6 显著刺激 7TD1 细胞的增殖, 并且 cCLB8 以浓度依赖性方式抑制该细胞增殖, EC_{50} 值为 7.2ng/mL。误差柱表示重复样品的 SEM。*表示缺乏 rIL-6 的条件下细胞的增殖。

实施例 5: 表位作图

- 按照(Brakenhoff 等, (1990) J. Immunology 145: 561-568)中的描述, 采用结合于人 IL-6 突变蛋白的抗体表征了包括 CLB8 的一些中和性抗 IL-6 Mabs 的表位。制备了氨基和羧基末端缺失突变体, 通过抗体竞争实验分析 IL-6 的抗体组。在竞争研究的基础上, 将中和性 Mabs 分为 2 组 (I 和 II)。在该方法中, 包括在给定 Mab 的表位中的残基是通过其不能识别抗原性蛋白的相应位点特异性单氨基酸取代变体而描绘的。将 CLB8 作图于人 IL-6 分子上的位点 I, 它是由紧密邻接于分子的羧基末端的氨基酸 Gln29-Leu34 组成的。其它研究 (Kalai, M 等, Eur. J. Biochem. 249, 690-700 (1997)) 表明, CLB8 识别对 IL-6 结合于 IL-6R (gp80)来说是关键的氨基酸残基。这些研究也表明, 其表位包括 IL-6 分子的 AB 环的末端和 D 螺旋区。

20 实施例 6: 体内表征

- 将人骨髓瘤细胞 (A375S2) 接种至雌性裸鼠, 并且在同一天开始 Mab 治疗。以 10mg/kg (2X/周)的剂量腹腔内注射抗体, 将 C57 (抗 CMV) 作为对照 mAb。用 cCLB8 (抗人 IL-6) 和 MP520F3 (小鼠 IL-6 的单克隆抗体, R&D System) 的联合产生了联合的阻断作用, 与对照抗体 C57 处理的动物相比, 显著抑制了携带人骨髓瘤的动物的体重减轻 (图 7)。抗体治疗不影响肿瘤生长或最终的肿瘤重量。这些结果表明, IL6 参与肿瘤诱导的动物体重减轻, 并且 IL-6 的阻断可以延缓该模型中的癌症恶病质。

- 图 7.人和小鼠 IL6 的联合阻断(抗 IL6 mAbs cCLB8 和 MP520F3)导致动物体重减轻的显著抑制。Y 轴上的校正的动物体重减轻是研究末 (动物体重 - 肿瘤重量) 减去研究开始时的动物体重。每个柱是来自每组至少 14 只动物的平均值, 误差柱表示标准差。双尾 t 检验分析

表明, IL-6 组显著抑制体重减轻, $p=0.007$ 。

实施例 7: 亲和力测量

从 BIAcore2000、传感器芯片 CM-5 (芯片上为金表面, 覆盖了羧甲基化的右旋糖苷基质)、HBS (10mM HEPES, 含有 0.15M NaCl, 3.4mM EDTA 和 0.05% 表面活性剂 P20, pH7.4)、胺偶联剂 (N-羧基琥珀酰亚胺 (NHS)、N-乙基-N'-(3-甲基氨基丙基)-碳二亚胺 (EDC) 和 1M 乙醇胺 HCl) 获得自 BIAcore, 并且是根据制造商的说明制备的。抗人 Fc (Jackson AffiniPure 山羊抗人 IgG, Fc, 目录号 109-005-098, 批号 48646) 购自 Jackson ImmunoResearch。

溶于 5ml 0.15M 氯化钠, 0.01M 磷酸钠, pH7.2 的嵌合 CLB8 (批号 PD1F03) IgG 单克隆抗体是由 Centocor 制造的。重组人 IL-6 (批号 A1197111) 购自 R&D Systems。

将抗人 Fc (1.8mg/ml) 在 NaOAc 缓冲液 (10mM, pH4.8) 中稀释至 50 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度, 并且按照 BIAcore 系统手册中描述的制造商的胺偶联化学偶联于 CM-5 传感器芯片的羧甲基化的右旋糖苷基质。采用目标为 1000RU 的表面制备方法, 首先用 NHS/EDC, 然后加入抗人 Fc 活化传感器表面的羧基。通过注射 1M 的乙醇胺封闭剩下的活化的基团。分别偶联每个流动细胞。采用这些条件, 制备 4 个含有 7554-9571 共振单位 (RU) 的抗人 Fc 的流动细胞表面。在初步实验中, 确定了注射三次 (15 μl , 30 $\mu\text{l}/\text{min}$) 100mM H₃PO₄/0.05 CHAPS 将有效去除结合的免疫球蛋白并且保留固定化的抗人 Fc 的结合能力。

在 25 $^{\circ}\text{C}$ 下和 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速下在 BIAcore 上进行两次实验。以 5 $\mu\text{g/ml}$ 将 cCLB 溶解于 HBS。将分析物 IL-6 以 0.25, 0.125, 0.062, 0.031 和 0.015 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度溶解于 HBS 中。使指定量的抗体流过各自的流动细胞, 然后以 30 $\mu\text{L}/\text{min}$ 注射 30 μL 的每一种 IL-6 浓度 (缔合相), 并且不间断地注射 800 秒地缓冲液流 (解离相)。通过三次序贯注射每次 15 μL 100mM 的 H₃PO₄/0.05 CHAPS 而再生芯片表面。注射 HBS 作为参照 (空白传感图), 用于扣除空白折射指数, 以便进行分析。

在 BIA 分析 3.0 中采用 1: 1 模型, 对于计算得到 (k_d/k_a) 的解离 (K_d , [s^{-1}]) 和缔合 (K_a , [$\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$]) 以及缔合常数 (KD , [M]) 进行局部拟合。

采用 BIA 评估版本 3.0 进行分析。通过将实验曲线拟合至来源于

相互作用机制的模型的速率方程，从传感图得到动力学常数。确定采用具有的局部 Rumax 拟合， K_a ， k_d ， K_D 的 1:1 的结合模型进行的总体分析（表 1）。

5 表 1: 通过 BIAcore 进行的 cCLB Mab 的亲合力测量

样品	$k_a(m^{-1}s^{-1})(\times 10^6)$	$k_d(s^{-1})(\times 10^{-5})$	$K_D(M)(\times 10^{-11})$	χ^2
cCLB8	1.1	6.2	5.7	0.111
cCLB8	0.37	5.2	14	0.236

实施例 8: 抗独特型抗体

10 cCLB8 的有效测定系统（免疫组化和血清检测）的开发需要使用抗独特型抗体。因此用 cCLB8 免疫 Balb/c 小鼠以产生 cCLB8 的抗独特型抗体，该抗体可以用作血清检测和免疫组化测定的药代动力学探针。

免疫

15 给予 50 μ g IP 和 25 μ g SC 的 cCLB (Centocor, PD1F03) 在 12 周的时间段中免疫 6-7 周龄的 5 只 Balb/c 小鼠 (Charles River 实验室)。每只小鼠接受 IP 和 SC 注射。在免疫方案中以 2 周的时间间隔进行注射。用等体积的弗氏佐剂 (Sigma) 乳化腹膜内施用的注射物。第一次腹膜内注射使用完全弗氏佐剂，总体积为 200 μ l。随后的腹膜内注射含有不完全弗氏佐剂。在 PBS 中稀释皮下施用的注射物，并且
20 以 100 μ l/部位平分到两个注射部位。在第 0、21、47 和 77 天对小鼠放血。通过眶后穿刺对麻醉的小鼠进行采血，收集血清，以便通过 cCLB8 固相 EIA 进行滴度测定。免疫方案结束后三周，1 号小鼠接受稀释于 125 μ l PBS 中的 100 μ g cCLB8 的最后一次静脉内加强注射。制备小鼠 cCLB-8 抗独特型单克隆抗体

25 采用 cCLB8 免疫的 Balb/c 小鼠脾进行一次融合，通过 EIA 鉴定了 cCLB8 的 7 种特异性抗独特型抗体。发现这 7 种抗独特型抗体不结合其它小鼠/人嵌合抗体，如 C207A, C128A, C168J, C116J, C300A 和 C301A。7 种抗体中的 6 种是同种型 IgG1 κ ，一种抗体是 IgG2b κ 。

表 1 概括了融合的结果。应该注意 47 天后在小鼠中获得了 1:800 的最大血清滴度，并且在免疫过程中保持恒定。

同种型分析

5 通过使用小鼠单克隆抗体同种型分析试剂盒 (Life Technologies) 以蘸棒的形式完成了抗体的同种型测定。在室温下温育稀释缓冲液、杂交瘤上清液和大鼠抗小鼠偶联物的混合物过夜，同时振荡含有预先包被了各种捕获性鼠抗体同种型的棒的试管。从试管中取出棒，在 dH₂O 中轻柔洗涤，确定同种型。

表 1. 小鼠 cCLB8 抗独特型单克隆抗体的特性

10

C 代码	同种型
C433A	IgG1κ
C434A	IgG1κ
C435A	IgG1κ
C436A	IgG2bκ
C437A	IgG1κ
C438A	IgG1κ
C439A	IgG1κ

血清抑制测定

15 确定了合并的正常人血清 (NHS) 对 7 种抗独特型抗体结合 cCLB8 的能力的影响。37℃ 下在 0%, 0.5%, 5%, 和 50% (v/v) NHS 存在下，在从 50 μg/ml 的终浓度开始的 2 倍系列稀释液中温育 7 种纯化的抗独特型抗体。将混合物转移至 cCLB8 包被的板，在 37℃ 下温育 30 分钟。然后洗涤平板并且用山羊抗小鼠 IgG Fc*HRP 探测。0% 和 0.5% 的 NHS 不阻断任何抗独特型单克隆抗体结合 cCLB8。5% 的 NHS 部分抑制了 3 种单克隆抗体 (C433A, C435A 和 C437A) 的结合。除 C434A 和 C436A 20 外，所有的单克隆抗体都受浓度为 50% 的 NHS 的显著影响。(图 8A-G)。

抗独特型单克隆抗体抑制 cCLB8 与 HuIL-6 的结合

测定 7 种抗独特型抗体抑制 cCLB8 与 HuIL-6 的结合的能力。以前的 EIA 研究证明了 cCLB8 非常弱地与 HuIL-6 包被的平板结合。6-25 倍浓度过量的两种 Mabs (C435A 和 C437A) 表现出对 cCLB8 与 HuIL-6 的结合的基本完全的抑制。C434A 仅仅在 25 倍过量时表现对 cCLB8 的抑制作用。在抑制 cCLB8 与 HuIL-6 的结合方面最佳的两种抗体是 C436A 和 C439A。这两种抗体能够在 3-25 倍的过量浓度范围完全抑制 cCLB8 结合。C433A 和 C438A 没有表现出抑制作用 (图 9)。该测定证实初步研究中获得的结果。

抗独特型单克隆抗体与预结合于 HuIL-6 的 cCLB8 的结合

检测了 7 种抗独特型抗体结合已经与 HuIL-6 结合的 cCLB8 的能力。37°C 下在 HuIL-6 板上温育 PBS 中的 10 μg/ml 的 cCLB8。洗涤平板, 加入从 10 μg/ml 开始的抗独特型单克隆抗体的 3 倍系列稀释液, 37°C 下温育 30 分钟。洗涤平板, 然后用山羊抗小鼠 IgG Fc*HRP 探测。如初步研究, C436A 和 C438A 是仅有的能够与预结合于 HuIL-6 的 cCLB8 结合的抗体。图 10 说明了 7 种抗独特型抗体与预结合于 HuIL-6 的 cCLB8 的结合能力。

总之, 由鼠骨髓瘤细胞和来自于用嵌合抗人 IL-6 抗体 (cCLB8) 免疫的 Balb/c 小鼠的脾细胞的融合物产生了 7 种单克隆抗独特型抗体。这些抗独特型抗体中的 5 种 (C434A, C435A, C436A, C437A, 和 C439A) 能够阻断 cCLB8 与 HuIL-6 的结合。两种抗体 (C436A 和 C438A) 具有与预结合于 HuIL-6 的 cCLB8 结合的能力, 两种抗体 (C434A 和 C436A) 与 cCLB8 的结合基本不受任何检验的 NHS 浓度的影响。这些 cCLB8 抗独特型抗体的宽范围的结合曲线使它们中的一些成为用于血清检测和免疫组化测定中的药代动力学探针的潜在候选物。

应该明确, 本发明可以以前面的说明书和实施例中具体描述以外的方式实施。

根据前面的教导, 本发明的许多修饰和改变是可能的, 因此, 在所附权利要求的范围内。

5 <110> Centocor Inc.
 Giles-Komar, Jill
 Trikha, Mohit
 Peritt, David
 Knight, David M

10 <120> 抗IL-6抗体、组合物、方法和用途
 <130> CEN0270
 <140> 60/332743
 15 <141> 2001-11-14
 <150> 60/332743
 <151> 2001-11-14

20 <160> 16
 <170> PatentIn version 3.1

25 <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 小鼠

30 <400> 1
 Ser Phe Ala Met Ser
 1 5

35 <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 小鼠

40 <400> 2
 Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15

45 Gly

50 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 小鼠

55 <400> 3
 Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr

```

1           5           10

5  <210> 4
   <211> 10
   <212> PRT
   <213> 小鼠

   <400> 4

10 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
    1           5           10

15 <210> 5
   <211> 7
   <212> PRT
   <213> 小鼠

   <400> 5

    Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
    1           5

25 <210> 6
   <211> 9
   <212> PRT
   <213> 小鼠

30 <400> 6

    Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
    1           5

35 <210> 7
   <211> 119
   <212> PRT
   <213> 小鼠

   <400> 7

45 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Lys Leu Leu Lys Pro Gly Gly
    1           5           10           15

    Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
    20           25           30

50 Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
    35           40           45

55 Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
    50           55           60

60 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

```

	65		70		75		80
5	Leu Glu Met Ser	Ser Leu Arg Ser	Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys	85	90	95	
10	Ala Arg Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	100	105	110			
15	Thr Ser Val Thr Val Ser Ser	115					
20	<210> 8 <211> 106 <212> PRT <213> 小鼠						
25	Gln Ile Val Leu Ile Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly	1	5	10	15		
30	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met	20	25	30			
35	Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr	35	40	45			
40	Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser	50	55	60			
45	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu	65	70	75	80		
50	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr	85	90	95			
55	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	100	105				
60	<210> 9 <211> 15 <212> DNA <213> 小鼠						
	<400> 9 agctttgccca tgtct						15
	<210> 10						

	<211> 51		
	<212> DNA		
	<213> 小鼠		
5	<400> 10	gaaattagta gtggtgggag ttacacctac taccctgaca ctgtgacggg c	51
	<210> 11		
10	<211> 30		
	<212> DNA		
	<213> 小鼠		
	<400> 11	ggtttatggg ggtactatgc tcttgactac	30
	<210> 12		
	<211> 30		
20	<212> DNA		
	<213> 小鼠		
	<400> 12	agtgccagct caagtgtaag ttacatgtac	30
25			
	<210> 13		
	<211> 21		
	<212> DNA		
30	<213> 小鼠		
	<400> 13	gacacatcca acctggcttc t	21
35			
	<210> 14		
	<211> 27		
	<212> DNA		
	<213> 小鼠		
40	<400> 14	cagcagtgga gtggttaccc atacacg	27
45			
	<210> 15		
	<211> 357		
	<212> DNA		
	<213> 小鼠		
50	<400> 15	gagtgcaac tggtggaatc tggaggaaaa ttactgaagc ctggagggtc cctgaaactc	60
		tctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctttgcc tgtcttggtt tcgccagtct	120
55		ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcagaa attagtagtg gtgggagtta cacctactat	180
		cctgacactg tgacgggccg atccaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac	240
60		ctggaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt attattgtgc aaggggttta	300

```

      tgggggtact atgctcttga ctactgggggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctca      357

5  <210> 16
   <211> 318
   <212> DNA
   <213> 小鼠

10 <400> 16
   caaattgttc tcatacagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc      60
   atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgtact ggtaccagca gaagccagga      120
   tcctccccc gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc      180
15 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagccgaat ggaggctgag      240
   gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtggttacc catacacgtt cggagggggg      300
20 accaagctgg aaataaaa                                     318

```

cCLB8与人IL-6的结合

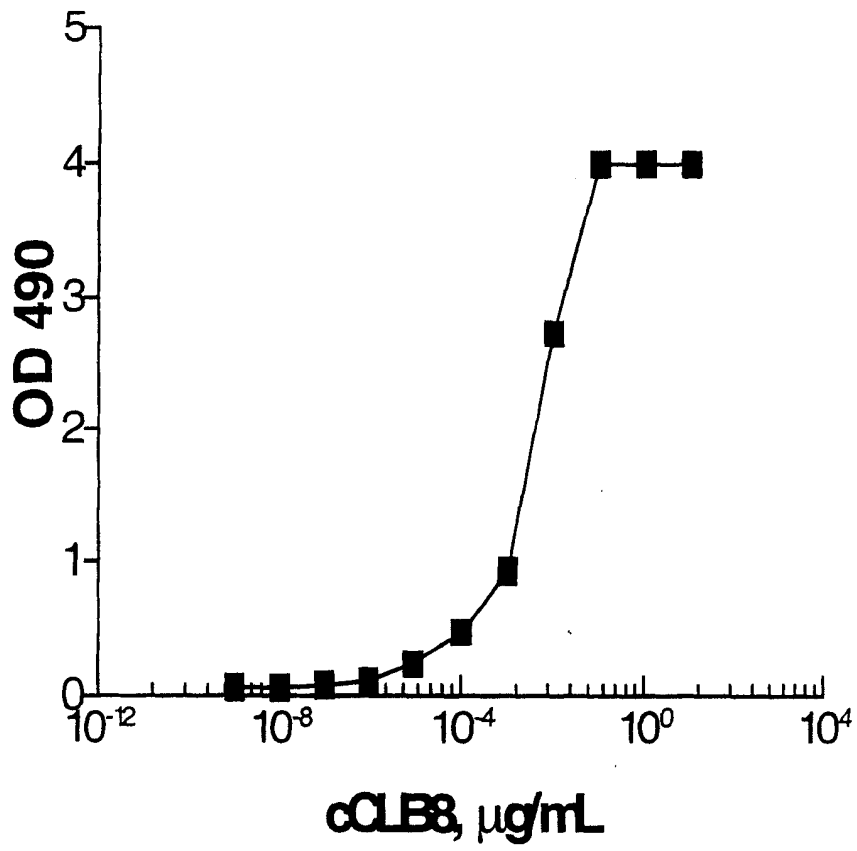


图 1

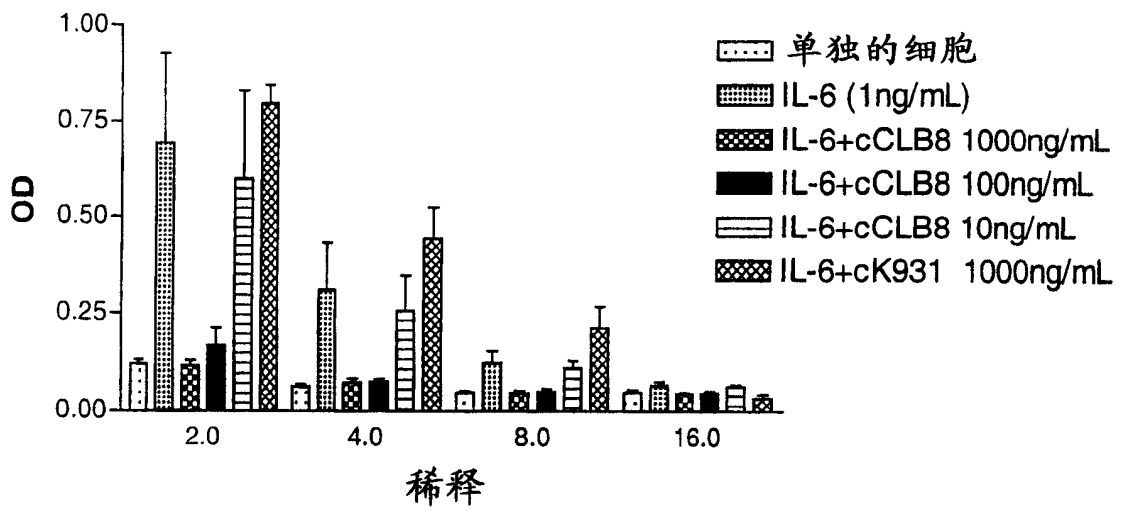


图 2

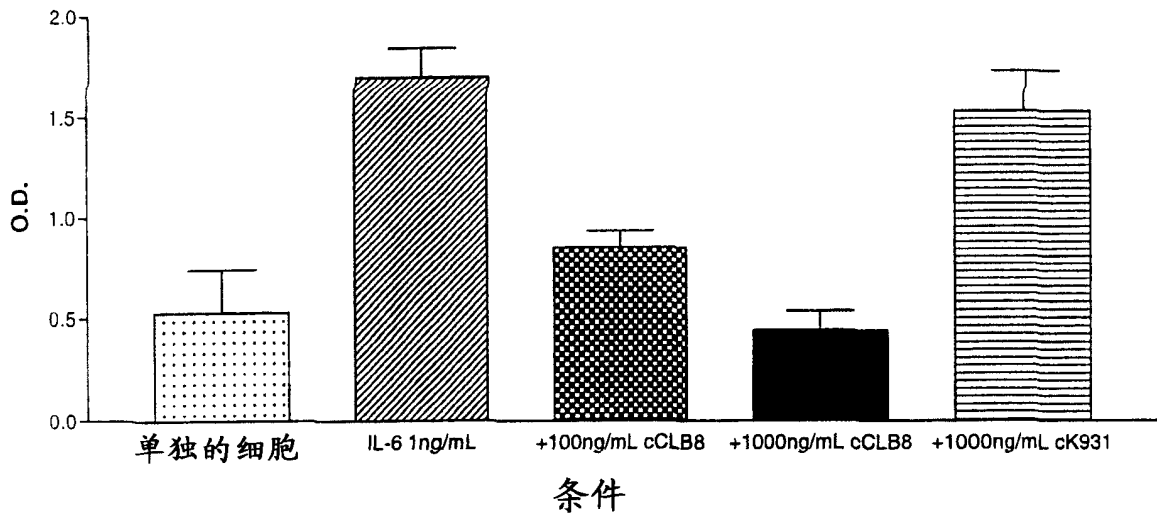


图 3

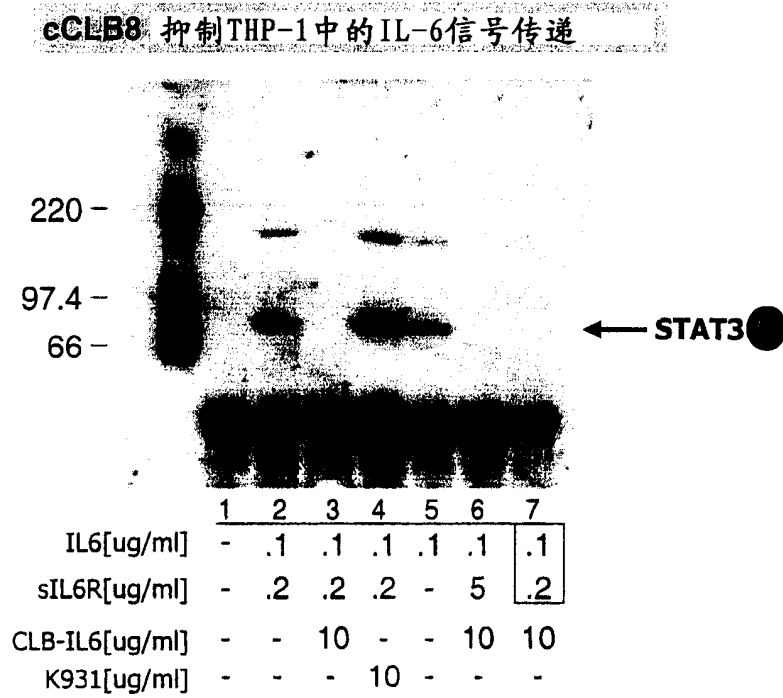


图 4

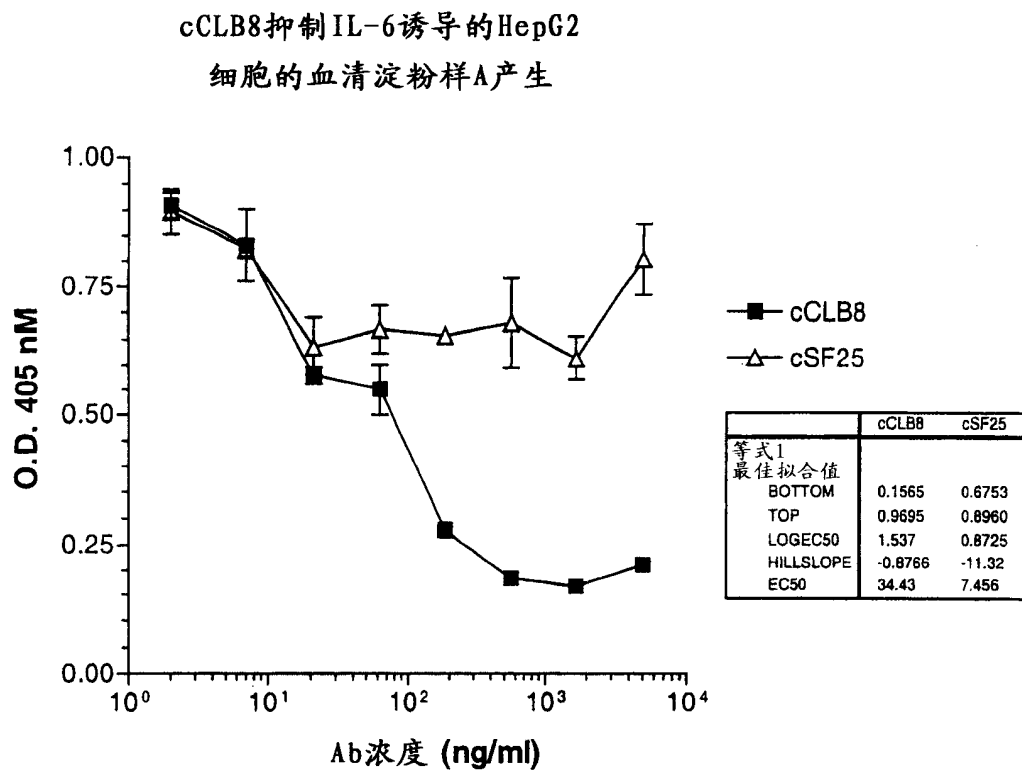


图 5

cCLB8中和rhIL-6诱导的细胞增殖

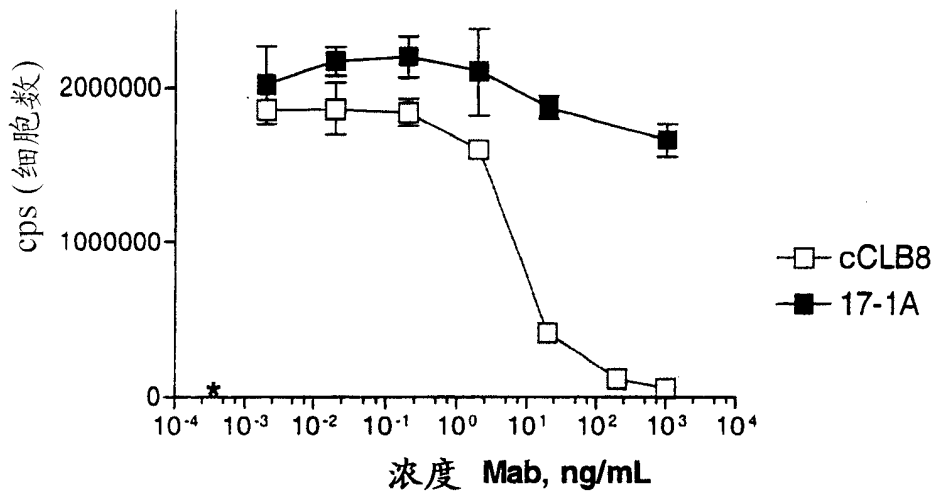


图 6

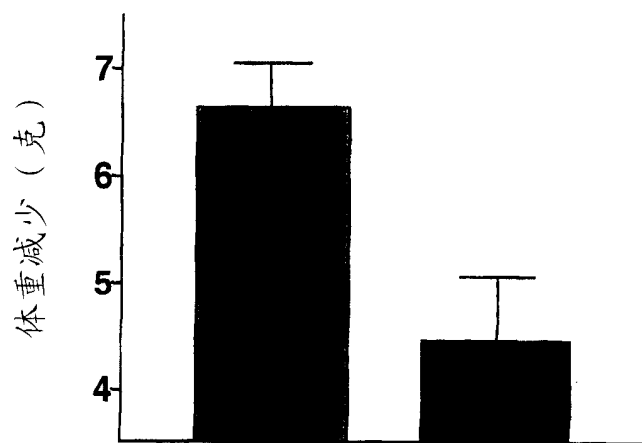


图 7

A. C433A

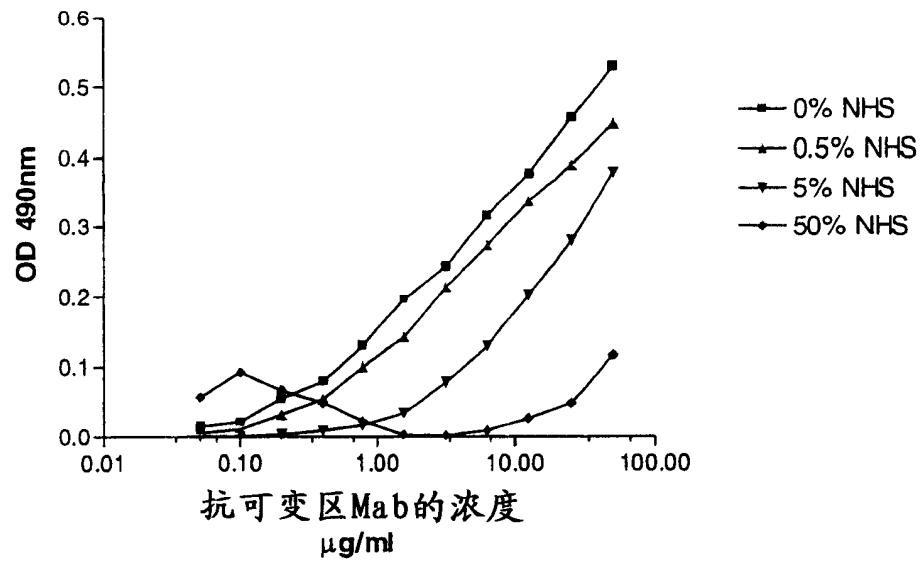


图 8

B. C434A

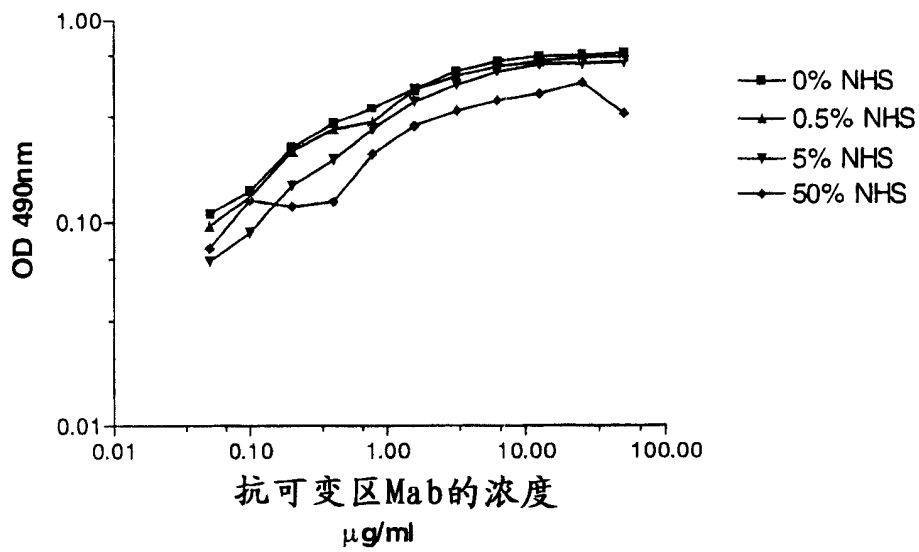


图 8

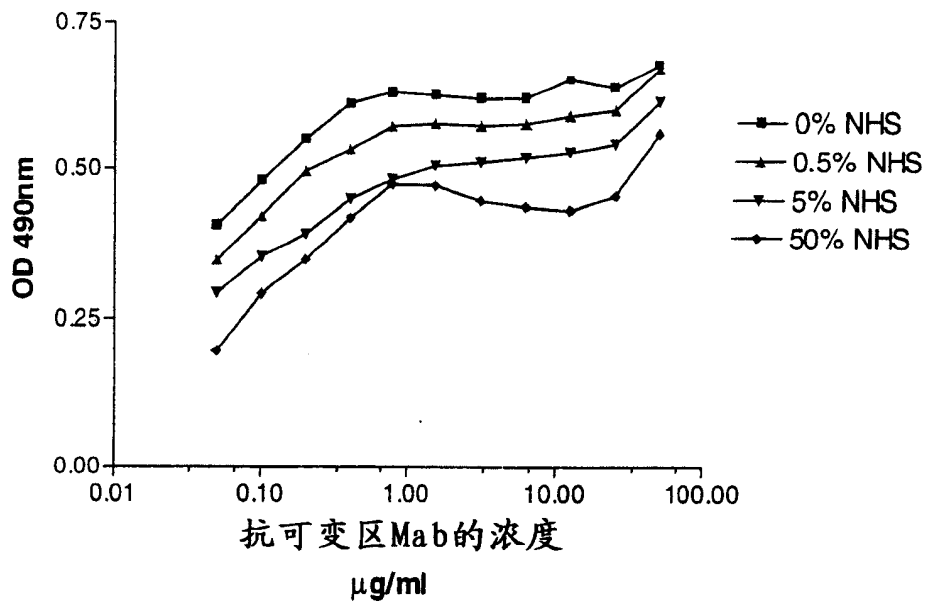


图 8

D. C436A

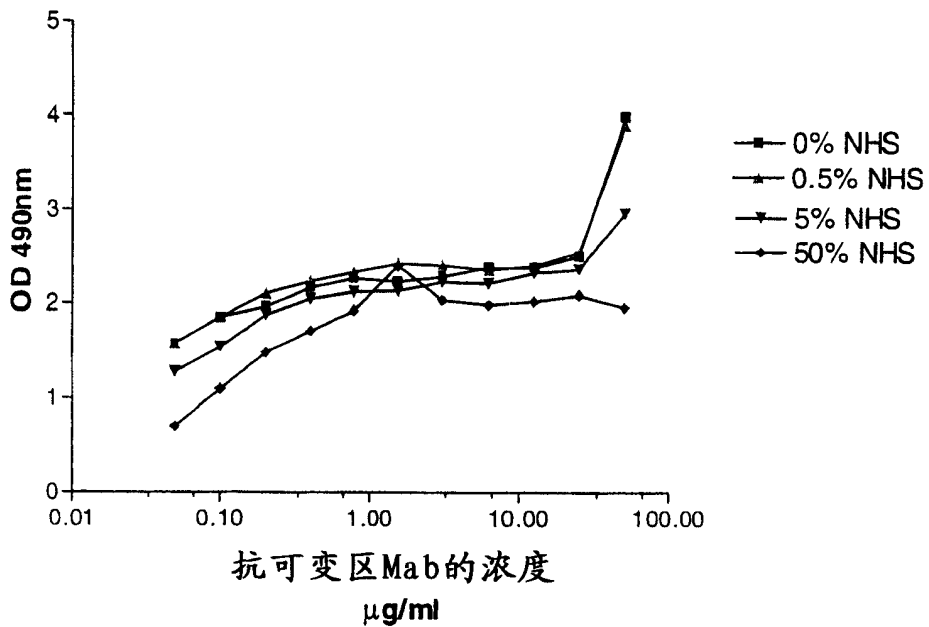


图 8

E. C437A

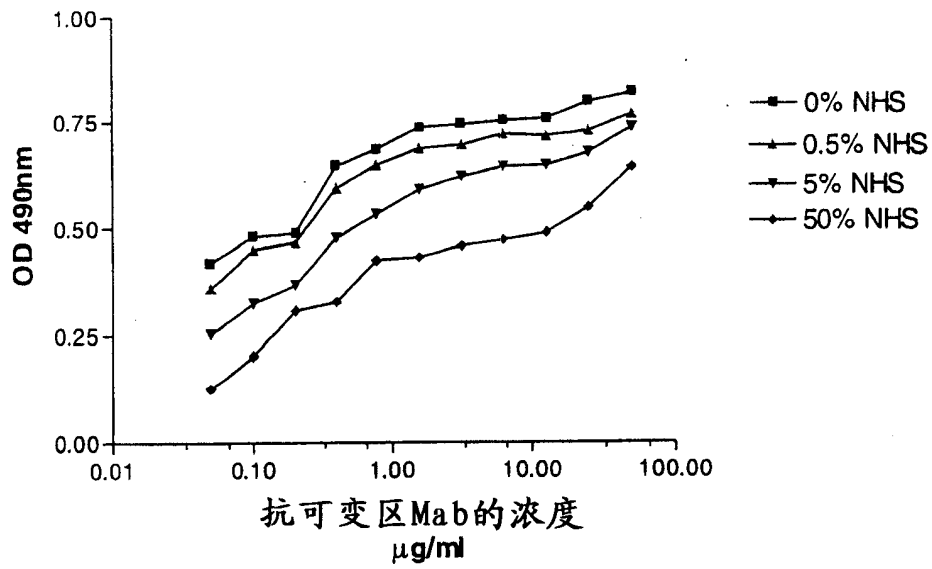


图 8

F. C438A

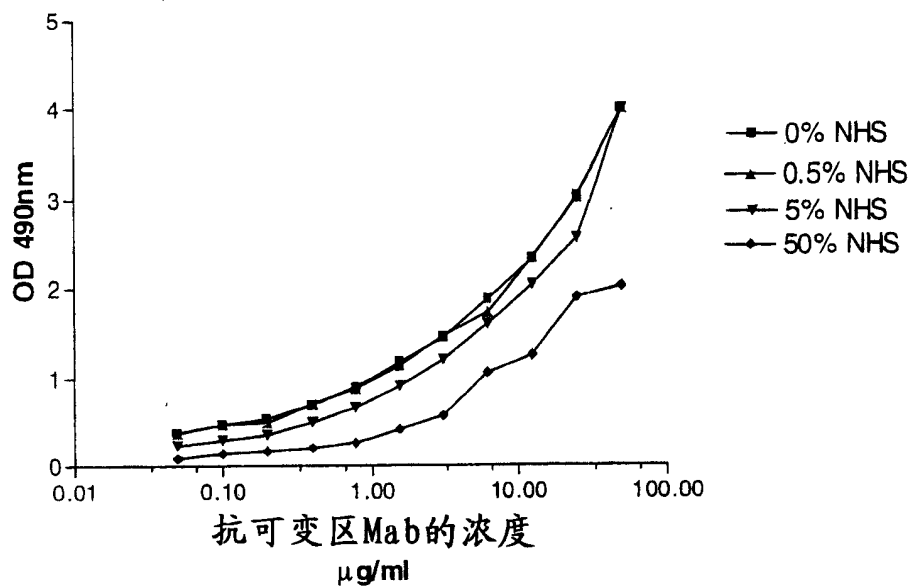


图 8

G. C439A

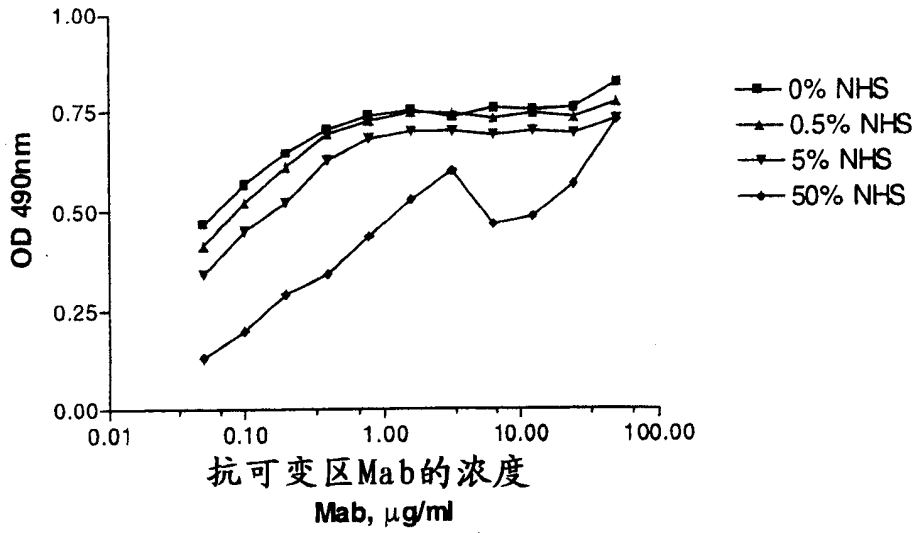


图 8

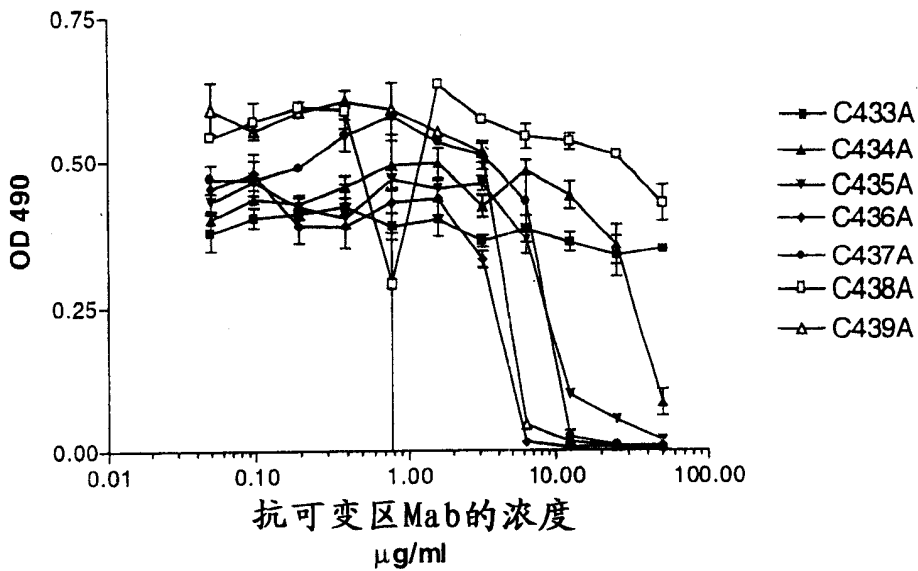


图 9

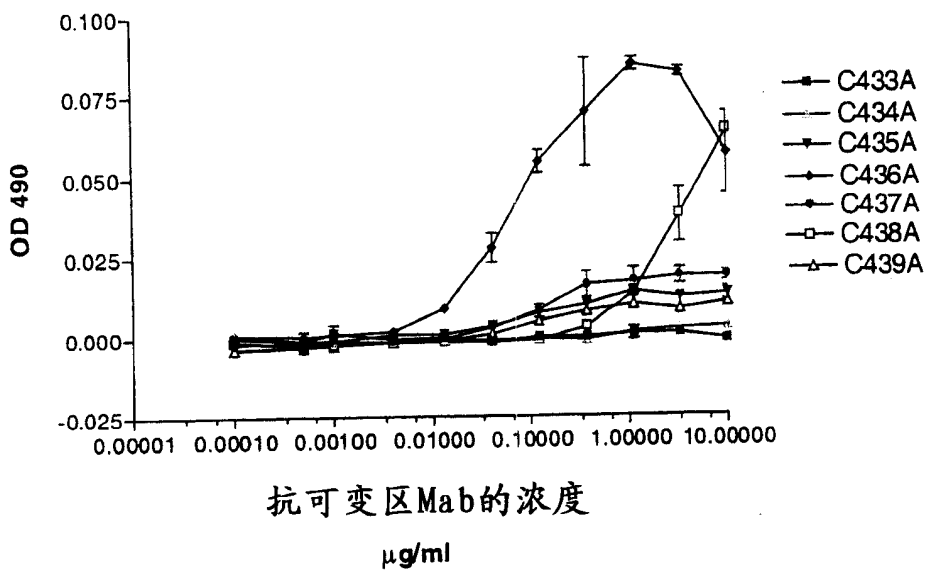


图 10