



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101330930 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 23

(21) 申请号 200680047532. 4

A61P 9/10(2006. 01)

(22) 申请日 2006. 10. 20

(56) 对比文件

(30) 优先权数据

307349/2005 2005. 10. 21 JP

WO 2004073741A1 A1, 2004. 09. 02, 说明书第
6 页第 5 段, 第 28 页最后一段 - 第 29 页最后一段.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2008. 06. 17

审查员 曹维

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/JP2006/320905 2006. 10. 20

(87) PCT 申请的公布数据

W02007/046489 JA 2007. 04. 26

(73) 专利权人 中外制药株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 小原幸

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 曹雯 李连涛

(51) Int. Cl.

A61K 45/00(2006. 01)

A61K 39/395(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 18 页

(54) 发明名称

心脏病治疗剂

(57) 摘要

本发明人对于抗 IL-6 受体抗体改善心肌梗塞中梗塞区状态的效果,以及抑制心肌梗塞后左心室重塑的效果进行了研究。其结果为,通过给予抗 IL-6 受体抗体,从而在心肌梗塞区 MPO 活性的增加被显著抑制。另外,心肌 MCP-1 的表达在心肌梗塞区和非梗塞区被抑制。而且通过心脏超声波检查、组织学检查而明确心脏肥大被抑制。

1. 与 IL-6 受体结合而抑制 IL-6 与 IL-6 受体结合的抗体在制造心肌梗塞治疗剂中的用途。
2. 与 IL-6 受体结合而抑制 IL-6 与 IL-6 受体结合的抗体在制造心肌梗塞后左心室重塑的抑制剂中的用途。
3. 根据权利要求 1 或 2 所述的用途,其特征在于,抗体是单克隆抗体。
4. 根据权利要求 1 或 2 所述的用途,其特征在于,抗体是抗人 IL-6 受体的抗体。
5. 根据权利要求 1 或 2 所述的用途,其特征在于,抗体是重组抗体。
6. 根据权利要求 5 所述的用途,其特征在于,抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

心脏病治疗剂

技术领域

[0001] 本发明涉及含有 IL-6 抑制剂作为有效成分的心肌梗塞治疗剂及其应用。另外,本发明还涉及含有 IL-6 抑制剂作为有效成分的心肌梗塞后左心室重塑的抑制剂及其应用。

背景技术

[0002] 心肌梗塞是缺血性心脏病的一种,是由于动脉硬化等引起心脏冠状动脉收缩,冠状动脉血流量急剧减少或停止而引起心肌坏死的一种疾病。如果梗塞区域扩大、恶化,则会并发心力衰竭、缺血等引起的重度心律不齐,而增加对生命的威胁。

[0003] 若心肌梗塞进行,则梗塞区的心肌细胞坏死、脱落,被胶原纤维等纤维组织替换。这种梗塞区缺乏收缩力,不能耐受伴随心收缩而上升的心内压,纤维壁薄且伸展。其结果,为了弥补这种功能降低,在非梗塞区导致心内腔肥大,左心室整体扩张。这种现象被称为左心室重塑,使心脏功能进一步降低,之后的患病率和死亡率增加。因此为了预后改善心肌梗塞症,尽早抑制进行中的左心室重塑是很重要的,期望构筑一种有效的治疗方法。

[0004] IL-6 是一种细胞因子,也被称为 B 细胞刺激因子 2 (BSF2) 或干扰素 β 2。IL-6 是作为与 B 淋巴细胞的活化有关的分化因子被发现的(非专利文献 1),之后发现是一种影响各种细胞功能的多功能细胞因子(非专利文献 2)。据报道 IL-6 可以诱导 T 淋巴细胞的成熟(非专利文献 3)。

[0005] IL-6 在细胞上通过两种蛋白质传导其生物学活性。一种是 IL-6 结合的分子量约 80kD 的配体结合性蛋白质的 IL-6 受体(非专利文献 4、5)。IL-6 受体,除了贯通细胞膜在细胞膜上表达的膜结合型之外,主要是作为由其细胞外区域构成的可溶性 IL-6 受体而存在。

[0006] 另一种是与非配体结合性的信号转导相关的分子量约 130kD 的膜蛋白质 gp130。IL-6 与 IL-6 受体形成 IL-6/IL-6 受体复合体,然后通过 gp130 结合,IL-6 的生物学活性被传导到细胞内(非专利文献 6)。

[0007] IL-6 抑制剂是抑制 IL-6 的生物学活性传导的物质。迄今为止,已知有对抗 IL-6 的抗体(抗 IL-6 抗体)、对抗 IL-6 受体的抗体(抗 IL-6 受体抗体)、对抗 gp130 的抗体(抗 gp130 抗体)、IL-6 变体、IL-6 或 IL-6 受体部分肽等。

[0008] 关于抗 IL-6 受体抗体,也有一些报道(非专利文献 7、8,专利文献 1~3)。其中之一已知有人源化 PM-1 抗体(专利文献 4),其是通过将小鼠抗体 PM-1(非专利文献 9)的互补决定区(CDR; complementarity determining region)移植入人抗体而得到的。

[0009] 迄今为止,从 IL-6 对肌收缩性功能产生负面影响(非专利文献 10),或者 IL-6 和 IL-6 受体的过剩表达而使 gp130 活性恒定的小鼠发生心脏肥大(非专利文献 11)等,可知其会影响心脏的功能和构造。IL-6 在心肌梗塞后,在左心室、特别是再灌流的心肌梗塞的边界部分表达(非专利文献 12),其表达水平与心肌梗塞后的左心室(LV)的大小有关(非专利文献 13)。另外,据报道在低氧压下心肌细胞产生 IL-6(非专利文献 14),梗塞后重塑时,非肌肉细胞中的细胞因子表达在胞外基质变化中有控制作用(非专利文献 15)。此外,

关于心肌梗塞与 IL-6 的关系,有报道称通过 IL-6 介导而被活化的 JAK/STAT 系对心肌梗塞有保护作用(非专利文献 16)。

[0010] 另一方面,有报道称,在使用 IL-6 敲除小鼠的实验中,IL-6 缺失对心肌梗塞的梗塞区域的大小或左心室重塑等没有影响(非专利文献 17)。由此,心肌梗塞以及心肌梗塞后左心室重塑中的 IL-6 的作用并不清楚。

[0011] 此外,本申请的发明相关的背景技术文献信息如下所示。

[0012] 非专利文献 1:Hirano, T. et al., Nature(1986) 324, 73-76

[0013] 非专利文献 2: Akira, S. et al., Adv. in Immunology(1993) 54, 1-78

[0014] 非专利文献 3: Lotz, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258

[0015] 非专利文献 4: Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981

[0016] 非专利文献 5: Yamasaki, K. et al., Science(1988) 241, 825-828

[0017] 非专利文献 6: Taga, T. et al., Cell(1989) 58, 573-581

[0018] 非专利文献 7: Novick, D. et al., Hybridoma(1991) 10, 137-146

[0019] 非专利文献 8: Huang, Y. W. et al., Hybridoma(1993) 12, 621-630

[0020] 非专利文献 9: Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906

[0021] 非专利文献 10: Finkel, M. S. et al., Science(1992) 257, 387-389

[0022] 非专利文献 11: Hirota, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1995) 92, 4862-4866

[0023] 非专利文献 12: Gwechenberger, M. et al., Circulation(1999) 99, 546-551

[0024] 非专利文献 13: Ono, K. et al., Circulation(1998) 98, 149-156

[0025] 非专利文献 14: Yamauchi-Takahara, K. et al., Circulation(1995) 91, 1520-1524

[0026] 非专利文献 15: Yue, P. et al., Am. J. Physiol. (1998) 275, H250-H258

[0027] 非专利文献 16: Negoro, S. et al., Cardiovasc. Res. (2000) 47, 797-805

[0028] 非专利文献 17: Fuchs M. et al., FASEB J. (2003) 17, 2118-2120

[0029] 专利文献 1: 国际专利申请公开号 WO 95-09873

[0030] 专利文献 2: 法国专利申请公开号 FR 2694767

[0031] 专利文献 3: 美国专利号 US 5216128

[0032] 专利文献 4: 国际专利申请公开号 WO 92-19759

发明内容

[0033] 迄今为止,虽然表明 IL-6 与心肌梗塞以及心肌梗塞后的左心室重塑有关,但其详细的作用并不明确。另外,IL-6 抑制剂的给药,在心肌梗塞以及心肌梗塞后的左心室重塑中有怎样的效果也不明确。

[0034] 本发明即是鉴于这种情况完成的,其目的在于提供含有 IL-6 抑制剂作为有效成分的心肌梗塞治疗剂。另外,本发明还提供含有 IL-6 抑制剂作为有效成分的心肌梗塞后的左心室重塑的抑制剂。而且本发明还提供治疗心肌梗塞的方法以及抑制心肌梗塞后左心室重塑的方法,所述方法包括将 IL-6 抑制剂给予有心肌梗塞症状的对象的工序。

[0035] 本发明人为了解决上述技术问题,对于抗 IL-6 受体抗体改善心肌梗塞中梗塞区域的状态的效果,以及抑制心肌梗塞后左心室重塑的效果进行了研究。

[0036] 首先,本发明人将雄性 Balb/c 小鼠的左前降支结扎,制成心肌梗塞模型小鼠。然

后,对该心肌梗塞模型小鼠腹腔内给予抗 IL-6 受体抗体 (MR16-1) 500 μ g。

[0037] 其结果表明,在心肌梗塞区域,髓过氧化物酶 (MPO) 活性的增加被显著抑制。另外,还表明在抗 IL-6 受体抗体给药小鼠中,心肌 MCP-1 (单核细胞趋化蛋白-1, monocyte chemoattractant protein-1) 的表达在心肌梗塞区域以及非梗塞区域被抑制。而且,在心脏超声波检查、组织学检查中,抗 IL-6 受体抗体给药小鼠的心脏肥大被抑制。

[0038] 即,本发明人通过给予抗 IL-6 受体抗体,初步发现可以改善心肌梗塞中梗塞区域的状态,抑制心肌梗塞后的左心室重塑,由此完成了本发明。

[0039] 更具体地,本发明提供以下的 [1] ~ [31]。

[0040] 含有 IL-6 抑制剂作为有效成分的心肌梗塞治疗剂。

[0041] 根据 [1] 所述的心肌梗塞治疗剂,其特征在于,IL-6 抑制剂是识别 IL-6 的抗体。

[0042] 根据 [1] 所述的心肌梗塞治疗剂,其特征在于,IL-6 抑制剂是识别 IL-6 受体的抗体。

[0043] 根据 [2] 或 [3] 所述的心肌梗塞治疗剂,其特征在于,抗体是单克隆抗体。

[0044] 根据 [2] 或 [3] 所述的心肌梗塞治疗剂,其特征在于,抗体是抗人 IL-6 的抗体或者抗人 IL-6 受体的抗体。

[0045] 根据 [2] 或 [3] 所述的心肌梗塞治疗剂,其特征在于,抗体是重组抗体。

[0046] 根据 [6] 所述的心肌梗塞治疗剂,其特征在于,抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0047] 含有 IL-6 抑制剂作为有效成分的心肌梗塞后左心室重塑的抑制剂。

[0048] 根据 [8] 所述的抑制剂,其特征在于,IL-6 抑制剂是识别 IL-6 的抗体。

[0049] 根据 [8] 所述的抑制剂,其特征在于,IL-6 抑制剂是识别 IL-6 受体的抗体。

[0050] 根据 [9] 或 [10] 所述的抑制剂,其特征在于,抗体是单克隆抗体。

[0051] 根据 [9] 或 [10] 所述的抑制剂,其特征在于,抗体是抗人 IL-6 的抗体或者抗人 IL-6 受体的抗体。

[0052] 根据 [9] 或 [10] 所述的抑制剂,其特征在于,抗体是重组抗体。

[0053] 根据 [13] 所述的抑制剂,其特征在于,抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0054] 根据 [8] ~ [14] 任一项所述的抑制剂,其用于心肌梗塞的治疗。

[0055] 对对象治疗心肌梗塞的方法,其包含将 IL-6 抑制剂给予有心肌梗塞症状的对象的工序。

[0056] 对对象抑制心肌梗塞后左心室重塑的方法,其包含将 IL-6 抑制剂给予有心肌梗塞症状的对象的工序。

[0057] 根据 [16] 或 [17] 所述的方法,其特征在于,IL-6 抑制剂是识别 IL-6 的抗体。

[0058] 根据 [16] 或 [17] 所述的方法,其特征在于,IL-6 抑制剂是识别 IL-6 受体的抗体。

[0059] 根据 [18] 或 [19] 所述的方法,其特征在于,抗体是单克隆抗体。

[0060] 根据 [18] 或 [19] 所述的方法,其特征在于,抗体是抗人 IL-6 的抗体或者抗人 IL-6 受体的抗体。

[0061] 根据 [18] 或 [19] 所述的方法,其特征在于,抗体是重组抗体。

[0062] 根据 [22] 所述的方法,其特征在于,抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

[0063] IL-6 抑制剂在制造心肌梗塞治疗剂中的用途。

- [0064] IL-6 抑制剂在制造心肌梗塞后左心室重塑的抑制剂中的用途。
- [0065] 根据 [24] 或 [25] 所述的用途,其特征在于,IL-6 抑制剂是识别 IL-6 的抗体。
- [0066] 根据 [24] 或 [25] 所述的用途,其特征在于,IL-6 抑制剂是识别 IL-6 受体的抗体。
- [0067] 根据 [26] 或 [27] 所述的用途,其特征在于,抗体是单克隆抗体。
- [0068] 根据 [26] 或 [27] 所述的用途,其特征在于,抗体是抗人 IL-6 的抗体或者抗人 IL-6 受体的抗体。
- [0069] 根据 [26] 或 [27] 所述的用途,其特征在于,抗体是重组抗体。
- [0070] 根据 [30] 所述的用途,其特征在于,抗体是嵌合抗体、人源化抗体或人抗体。

具体实施方式

[0071] 本发明人发现:通过给予抗 IL-6 受体抗体,可以改善心肌梗塞中梗塞区域的状态,抑制心肌梗塞后的左心室重塑。本发明即是基于上述发现的发明。

[0072] 本发明涉及心肌梗塞治疗剂以及心肌梗塞后左心室重塑的抑制剂,它们含有 IL-6 抑制剂作为有效成分。

[0073] 本发明中,“IL-6 抑制剂”是指阻断 IL-6 介导的信号转导、抑制 IL-6 的生物学活性的物质。IL-6 抑制剂优选为对 IL-6、IL-6 受体和 gp130 的任一结合具有抑制作用的物质。

[0074] 作为本发明的 IL-6 抑制剂,例如可列举:抗 IL-6 抗体、抗 IL-6 受体抗体、抗 gp130 抗体、IL-6 变体、可溶性 IL-6 受体变体或者 IL-6 或 IL-6 受体的部分肽,以及与它们显示同样活性的低分子物质,但并无特别地限定。作为本发明的 IL-6 抑制剂,可优选列举识别 IL-6 受体的抗体。

[0075] 本发明中抗体的来源没有特别限定,可优选列举来源于哺乳动物的抗体,更优选列举来源于人的抗体。

[0076] 本发明中使用的抗 IL-6 抗体,可以使用公知的方法作为多克隆或单克隆抗体而得到。作为本发明中使用的抗 IL-6 抗体,特别优选来源于哺乳动物的单克隆抗体。作为来源于哺乳动物的单克隆抗体有,杂交瘤中产生的抗体,以及通过基因工程方法,在以含有抗体基因的表达载体转化的宿主中产生的抗体。该抗体通过与 IL-6 结合,从而抑制 IL-6 与 IL-6 受体的结合,进而阻断 IL-6 的生物学活性向细胞内传达。

[0077] 作为这种抗体,可以列举出 MH166 (Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956) 或 SK2 抗体 (Sato, K. et al., 第 21 次日本免疫学会总会,学术纪录 (1991) 21, 166) 等。

[0078] 产生抗 IL-6 抗体的杂交瘤,基本上可以使用公知技术,按如下所述进行制作。即,使用 IL-6 作为致敏性抗原(感作抗原),将其按照通常的免疫方法进行免疫,根据通常的细胞融合法使所得免疫细胞与公知的亲细胞(parent cells)融合,使用通常的筛选法,筛选产生单克隆抗体的细胞,而进行制作。

[0079] 具体地,可以按照如下所述制作抗 IL-6 抗体,例如,作为获得抗体的致敏性抗原使用的人 IL-6,可以通过使用 Eur. J. Biochem. (1987) 168, 543-550 ; J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541 或 Agr. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688 中公开的 IL-6 基因/氨基酸序列而得到。

[0080] 将 IL-6 的基因序列插入公知的表达载体系统,使适当的宿主细胞进行转化后,用公知的方法从其宿主细胞中或培养上清液中纯化(精制)目标 IL-6 蛋白质,可以使用该纯化 IL-6 蛋白质作为致敏性抗原。另外,也可以使用 IL-6 蛋白质与其它的蛋白质的融合蛋白质作为致敏性抗原。

[0081] 本发明中使用的抗 IL-6 受体抗体,可以使用公知的方法作为多克隆或单克隆抗体得到。作为本发明中使用的抗 IL-6 受体抗体,特别优选来源于哺乳动物的单克隆抗体。作为来源于哺乳动物的单克隆抗体有,杂交瘤中产生的抗体,以及通过基因工程方法,在以含有抗体基因的表达载体转化的宿主中产生的抗体。该抗体通过与 IL-6 受体结合,而抑制 IL-6 与 IL-6 受体结合,进而阻断 IL-6 的生物学活性向细胞内的传达。

[0082] 作为这种抗体,可列举:MR16-1 抗体(Tamura, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1993)90,11924-11928)、PM-1 抗体(Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989)143, 2900-2906)、AUK12-20 抗体、AUK64-7 抗体或 AUK146-15 抗体(国际专利申请公开号 WO 92-19759)等。其中,作为抗人 IL-6 受体优选的单克隆抗体,可示例 PM-1 抗体;另外作为抗小鼠 IL-6 受体优选的单克隆抗体,可列举 MR16-1 抗体。

[0083] 产生抗 IL-6 受体单克隆抗体的杂交瘤,基本上可以使用公知技术,按如下所述进行制作。即,使用 IL-6 受体作为致敏性抗原,将其按照通常的免疫方法进行免疫,根据通常的细胞融合法使所得免疫细胞与公知的亲细胞融合,使用通常的筛选法,筛选产生单克隆抗体的细胞,而进行制作。

[0084] 具体而言,可以按照如下所述制作抗 IL-6 受体抗体。例如,作为获得抗体的致敏性抗原使用的人 IL-6 受体、小鼠 IL-6 受体可以如下述那样得到:人 IL-6 受体可以使用欧洲专利申请公开号 EP325474 中公开的 IL-6 受体基因/氨基酸序列而得到;小鼠 IL-6 受体可以使用日本专利申请公开号特开平 3-155795 中公开的 IL-6 受体基因/氨基酸序列而得到。

[0085] IL-6 受体蛋白质有在细胞膜上表达的和脱离细胞膜的(可溶性 IL-6 受体)(Yasukawa, K. et al., J. Biochem. (1990)108,673-676)两种。可溶性 IL-6 受体实质上由结合在细胞膜上的 IL-6 受体的细胞外区域构成,在缺失跨细胞膜区域或缺失跨细胞膜区域和细胞内区域方面,与膜结合型 IL-6 受体不同。IL-6 受体蛋白质,只要能用作本发明中所用的制作抗 IL-6 受体抗体的致敏性抗原,则可以使用任一种 IL-6 受体。

[0086] 将 IL-6 受体的基因序列插入公知的表达载体系统,使适当的宿主细胞转化后,用公知的方法从其宿主细胞中或培养上清液中精制目的物 IL-6 受体蛋白质,可以使用该纯化 IL-6 受体蛋白质作为致敏性抗原。另外,也可以使用表达 IL-6 受体的细胞或者 IL-6 受体蛋白质与其它蛋白质的融合蛋白质作为致敏性抗原。

[0087] 本发明中使用的抗 gp130 抗体,可以使用公知的方法作为多克隆或单克隆抗体得到。作为本发明中使用的抗 gp130 抗体,特别优选来源于哺乳动物的单克隆抗体。作为来源于哺乳动物的单克隆抗体有,杂交瘤中产生的抗体,以及通过基因工程方法,在以含有抗体基因的表达载体转化的宿主中产生的抗体。该抗体通过与 gp130 结合,而抑制 IL-6/IL-6 受体复合体与 gp130 的结合,进而阻断 IL-6 的生物学活性向细胞内的传达。

[0088] 作为这种抗体,可列举:AM64 抗体(日本特开平 3-219894)、4B11 抗体以及 2H4 抗体(US 5571513)B-S12 抗体和 B-P8 抗体(日本特开平 8-291199)等。

[0089] 产生抗 gp130 单克隆抗体的杂交瘤,基本上可以使用公知技术,按如下所述进行制作。即,使用 gp130 作为致敏性抗原,将其按照通常的免疫方法进行免疫,根据通常的细胞融合法使所得免疫细胞与公知的亲细胞融合,使用通常的筛选法,筛选产生单克隆抗体的细胞,而进行制作。

[0090] 具体而言,可以按照如下所述制作单克隆抗体,例如,作为获得抗体的致敏性抗原所使用的 gp130,可以通过使用欧洲专利申请公开号 EP411946 公开的 gp130 基因 / 氨基酸序列而得到。

[0091] 将 gp130 的基因序列插入公知的表达载体,使适当的宿主细胞转化后,用公知的方法从其宿主细胞中或培养上清液中精制目的物 gp130 蛋白质,可以使用该纯化 gp130 蛋白质作为致敏性抗原。另外,也可以使用表达 gp130 的细胞或者 gp130 蛋白质与其它蛋白质的融合蛋白质作为致敏性抗原。

[0092] 作为用致敏性抗原来免疫的哺乳动物,没有特别地限定,但优选考虑与细胞融合中所使用的亲细胞的适合性后进行选择,一般使用啮齿类动物,例如小鼠、大鼠、仓鼠等。

[0093] 用致敏性抗原对动物免疫,根据公知的方法进行。例如,作为一般的方法,通过在哺乳动物的腹腔内或皮下注射致敏性抗原而进行。具体而言,优选将致敏性抗原用 PBS(磷酸缓冲盐)或生理盐水等稀释至适当量,根据需要,将悬浊的液体与通常的佐剂,例如弗氏完全佐剂适量混和,乳化后,每 4-21 天对哺乳动物多次给药。另外,致敏性抗原免疫时可以使用适当的载体。

[0094] 如此进行免疫,确认血清中所需的抗体水平上升后,从哺乳动物中取出免疫细胞,进行细胞融合。作为用于细胞融合的优选的免疫细胞,特别列举脾细胞。

[0095] 作为与前述免疫细胞融合的其他亲细胞即哺乳动物的骨髓瘤细胞,可适当使用已经公知的细胞株,例如:P3X63Ag8.653(Kearney, J. F. et al., J. Immunol(1979)123, 1548-1550)、P3X63Ag8U.1(Current Topics in Microbiology and Immunology(1978)81, 1-7)、NS-1(Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976)6, 511-519)、MPC-11(Margulies, D. H. et al., Cell(1976)8, 405-415)、SP2/0(Shulman, M. et al., Nature(1978)276, 269-270)、F0(de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods(1980)35, 1-21)、S194(Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. (1978)148, 313-323)、R210(Galfre, G. et al., Nature(1979)277, 131-133) 等。

[0096] 前述免疫细胞和骨髓瘤细胞的细胞融合基本上可以基于公知的方法,例如 Milstein 等的方法(Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981)73, 3-46) 等而进行。

[0097] 更具体地,前述细胞融合例如可以在细胞融合促进剂的存在下在通常的营养培养液中实施。作为融合促进剂,例如可以使用聚乙二醇(PEG)、仙台病毒(HVJ)等,进而根据需要为了提高融合效率,也可以添加使用二甲基亚砜等辅助剂。

[0098] 免疫细胞和骨髓瘤细胞的使用比例,例如相对于骨髓瘤细胞,优选免疫细胞为 1 ~ 10 倍。作为前述细胞融合中使用的培养液,例如可以使用适于前述骨髓瘤细胞株增殖的 RPMI 1640 培养液、MEM 培养液、其他在该种细胞培养中使用的通常的培养液,而且也可以并用胎牛血清(FCS)等血清补充液。

[0099] 细胞融合是,在所述培养液中将规定量的前述免疫细胞和骨髓瘤细胞充分混合,

通常以 30 ~ 60% (w/v) 的浓度添加预先加热至 37℃ 左右的 PEG 溶液, 例如平均分子量 1000 ~ 6000 左右的 PEG 溶液, 进行混合, 从而形成目的物融合细胞 (杂交瘤)。然后逐次添加适当的培养液, 通过重复离心除去上清液的操作, 从而可以除去不利于杂交瘤生长的细胞融合剂等。

[0100] 该杂交瘤通过在通常的选择培养液, 例如 HAT 培养液 (含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸腺嘧啶核苷的培养液) 中培养而进行选择。为了使目的物杂交瘤以外的细胞 (非融合细胞) 死亡, 在该 HAT 培养液中的培养, 需要持续充分的时间, 通常持续数天~数周。然后, 实施通常的极限稀释法, 进行产生目的物抗体的杂交瘤的筛选以及克隆。

[0101] 另外, 除了对人以外的动物免疫抗原, 得到上述杂交瘤以外, 也可以在体外 (in vitro) 将人淋巴细胞用所需的抗原蛋白质或抗原表达细胞致敏, 使致敏 B 淋巴细胞与人骨髓瘤细胞 (例如 U266) 融合, 可以得到与所需的抗原或抗原表达细胞具有结合活性的所需的人抗体 (参照日本特公平 1-59878)。另外, 对具有人抗体基因的所有组成成分 (レパートリ) 的转基因动物给予抗原或抗原表达细胞, 根据前述的方法也可以获得所需的人抗体 (参照国际专利申请公开号 W093/12227, W0 92/03918, W0 94/02602, W0 94/25585, W0 96/34096, W0 96/33735)。

[0102] 这样制作的产生单克隆抗体的杂交瘤可以在通常的培养液中进行继代培养, 另外可以在液氮中长期保存。

[0103] 从该杂交瘤获得单克隆抗体时, 可以采用以下方法: 将该杂交瘤按照通常的方法进行培养, 作为其培养上清液而获得的方法; 或者将杂交瘤给予与它具有适合性的哺乳动物并使增殖, 作为其腹水而得到的方法等。前者的方法适于得到高纯度的抗体, 另一方面, 后者的方法适于抗体的大量生产。

[0104] 例如, 产生抗 IL-6 受体抗体的杂交瘤的制作, 可以根据日本特开平 3-139293 中公开的方法进行。可以用以下方法进行: 将产生 PM-1 抗体的杂交瘤注入到 BALB/c 小鼠的腹腔内得到腹水, 从该腹水中精制 PM-1 抗体的方法; 或者将本杂交瘤在适当的培养基, 例如含有 10% 胎牛血清、5% BM-Condimed H1 (Boehringer Mannheim 制) 的 RPMI1640 培养基、杂交瘤 SFM 培养基 (GIBCO-BRL 制)、PFHM-II 培养基 (GIBCO-BRL 制) 等中培养, 从其培养上清液中精制 PM-1 抗体的方法。

[0105] 本发明中, 作为单克隆抗体, 可以使用以下重组抗体: 从杂交瘤中克隆抗体基因, 插入适当的载体, 将其导入宿主, 使用基因重组技术而产生的重组抗体 (例如参照 Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD., 1990)。

[0106] 具体而言, 从产生目标抗体的细胞 (例如杂交瘤) 中分离编码抗体的可变 (V) 区的 mRNA。mRNA 的分离, 通过公知的方法, 例如胍超速离心法 (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC 法 (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) 等制备总 RNA, 使用 mRNA Purification Kit (Pharmacia 制) 等制备 mRNA。另外通过使用 QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia 制) 可以直接制备 mRNA。

[0107] 使用逆转录酶由得到的 mRNA 合成抗体 V 区的 cDNA。cDNA 的合成可以使用 AMV 逆转录酶第一链 cDNA 合成试剂盒 (AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis

Kit) 等进行。另外,进行 cDNA 的合成和扩增时,可以使用 5' -RACE 法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932), 所述 5' -RACE 法使用 5' -Ampli FINDER RACE Kit (Clontech 制) 和 PCR。从得到的 PCR 产物中纯化目标 DNA 片段,与载体 DNA 连接。进而由此制成重组载体,导入大肠杆菌等并选择菌落,来制备所需的重组载体。通过公知的方法(例如脱氧法)来确认目标 DNA 的碱基序列。

[0108] 如果得到作为目的物的编码抗体 V 区的 DNA,则将其与编码所需的抗体恒定区(C 区)的 DNA 连接,将其插入表达载体。或者也可以将编码抗体 V 区的 DNA 插入含有抗体 C 区的 DNA 的表达载体。

[0109] 制造本发明中使用的抗体时,如后所述将抗体基因插入表达载体,以使其在表达控制区,例如增强子、启动子的控制下表达。然后,通过该表达载体可以转化宿主细胞、使抗体表达。

[0110] 在本发明中,以降低对人的异种抗原性等作为目标,可以使用人为修饰(改变)的基因重组抗体,例如嵌合(Chimeric)抗体、人源化(Humanized)抗体、人(Human)抗体。这些修饰的抗体可以使用已知的方法进行制造。

[0111] 嵌合抗体可通过下述方式得到:将编码如前述那样得到的抗体 V 区的 DNA 与编码人抗体 C 区的 DNA 连接,将其插入表达载体后,导入宿主使产生(参照欧洲专利申请公开号 EP125023、国际专利申请公开号 W092-19759)。使用该公知的方法,可以得到对本发明有用的嵌合抗体。

[0112] 人源化抗体也被称为重构(reshaped)人抗体或人型化抗体,其是将人以外的哺乳动物(例如小鼠)抗体的互补决定区(CDR)移植到人抗体的互补决定区的抗体,其通常的基因重组方法也是众所周知的(参照欧洲专利申请公开号 EP125023、国际专利申请公开号 W092-19759)。

[0113] 具体而言,通过 PCR 法由多个寡核苷酸合成 DNA 序列,所述 DNA 序列是以连接小鼠抗体的 CDR 与人抗体的构架区(FR; framework region)的形式设计的,所述寡核苷酸是在末端部具有重叠部分的形式制作的。将所得的 DNA 与编码人抗体 C 区的 DNA 连接,然后插入表达载体,将其导入宿主,以使产生而得到人源化抗体(参照欧洲专利申请公开号 EP 239400、国际专利申请公开号 W092-19759)。

[0114] 通过 CDR 连接的人抗体的 FR 是可以选择的,以便互补决定区形成良好的抗原结合部位。根据需要,可以取代抗体的可变区的构架区的氨基酸,以使重构人抗体的互补决定区形成适当的抗原结合部位,(Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

[0115] 对于嵌合抗体、人源化抗体,使用人抗体 C 区。作为人抗体 C 区,可列举 C_γ, 例如可以使用 C_γ 1, C_γ 2, C_γ 3 或 C_γ 4。另外,为了改善抗体或其生产的稳定性,还可以对人抗体 C 区进行修饰。

[0116] 嵌合抗体由来源于人以外的哺乳动物的抗体的可变区和来源于人抗体的 C 区构成,另外人源化抗体由来源于人以外的哺乳动物的抗体的互补决定区和来源于人抗体的构架区以及 C 区构成,它们在人体内的抗原性低下,因此作为本发明中所用的抗体是有用的。

[0117] 作为本发明中使用的人源化抗体的优选具体例,可列举人源化 PM-1 抗体(参照国际专利申请公开号 W092-19759)。

[0118] 另外,作为获得人抗体的方法,除了如前所述的方法外,还已知使用人抗体文库,通过筛选而获得抗体的技术。例如还可以将人抗体的可变区作为单链抗体(scFv),利用噬菌体展示法使其在噬菌体的表面表达,进而选择结合于抗原的噬菌体。如果解析所选择的噬菌体的基因,则可以决定结合于抗原的编码人抗体可变区的DNA序列。如果知道了结合于抗原的scFv的DNA序列,则可以制作含有该序列的适当的表达载体,并获得人抗体。这些方法已为人所知,可以参考W092/01047、WO 92/20791、W093/06213、WO 93/11236、WO 93/19172、WO 95/01438、WO 95/15388。

[0119] 如前所述构筑的抗体基因可以通过公知的方法来表达。使用哺乳类细胞时,可以通过DNA或者含有DNA的载体来表达,所述DNA功能性地结合于常用的有用的启动子、所表达的抗体基因、其3'侧下游的聚腺苷酸信号(ポリAシグナル)。例如作为启动子/增强子,可列举人类巨细胞病毒即时早期启动子/增强子(human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer)。

[0120] 另外,作为其他可以用于本发明中使用的抗体表达的启动子/增强子,可以使用逆转录病毒、多瘤病毒、腺病毒、猿猴病毒40(SV40)等病毒启动子/增强子或者人延伸因子1 α (HEF1 α)等来源于哺乳类细胞的启动子/增强子。

[0121] 例如使用SV40启动子/增强子时,根据Mulligan等人的方法(Mulligan, R. C. et al., Nature(1979)277,108-114)可以容易地实施;或者,使用HEF1 α 启动子/增强子时,根据Mizushima等人的方法(Mizushima, S. and Nagata S., Nucleic Acids Res. (1990)18, 5322)可以容易地实施。

[0122] 大肠杆菌的情况,可以使常用的有用的启动子、用于抗体分泌的信号序列、表达的抗体基因功能性结合而表达。例如作为启动子,可以列举出lacZ启动子、araB启动子。使用lacZ启动子时,可以按照Ward等人的方法(Ward, E. S. et al., Nature(1989)341,544-546; Ward, E. S. et al., FASEB J. (1992)6,2422-2427);使用araB启动子时,可以按照Better等人的方法(Better, M. et al., Science(1988)240,1041-1043)。

[0123] 作为用于抗体分泌的信号序列,在大肠杆菌的周质中产生时,可以使用pe1B信号序列(Lei, S. P. et al., J. Bacteriol. (1987)169,4379-4383)。将周质中产生的抗体分离后,将抗体的构造适当重折叠(refold)后使用(例如参照W096/30394)。

[0124] 作为复制起点,可以使用来源于SV40、多瘤病毒、腺病毒、牛乳头瘤病毒(BPV)等的复制起点,而且为了扩增宿主细胞系中的基因拷贝数,表达载体可以含有氨基糖苷磷酸转移酶(APH)基因、胸苷激酶(TK)基因、大肠杆菌黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(Ecogpt)基因、二氢叶酸还原酶(dhfr)基因等作为选择性标记。

[0125] 为了制造本发明中使用的抗体,可以使用任意的产生系统(产生系)。用于抗体制造的产生系统有体外(in vitro)和体内(in vivo)的产生系统。作为体外的产生系统,可列举:使用真核细胞的产生系统或使用原核细胞的产生系统。

[0126] 使用真核细胞时,有使用动物细胞、植物细胞或真菌细胞的产生系统。作为动物细胞,已知(1)哺乳类细胞,例如CHO、COS、骨髓瘤、BHK(幼仓鼠肾, baby hamster kidney)、HeLa、Vero等;(2)两栖类细胞,例如爪蟾卵母细胞(Xenopus oocyte);或者(3)昆虫细胞,例如sf9、sf21、Tn5等。作为植物细胞,已知有来源于烟草(Nicotiana tabacum)的细胞,可以对其进行愈伤组织培养。作为真菌细胞,已知有酵母,例如酵母菌(Saccharomyces)属,

例如酿酒酵母菌 (*Saccharomyces cerevisiae*) ;线状菌,例如曲霉属 (*Aspergillus*),例如黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 等。

[0127] 使用原核细胞时,有使用细菌细胞的产生系统。作为细菌细胞,已知大肠杆菌 (*E. coli*)、枯草杆菌。

[0128] 通过下述方法得到抗体:利用转化将目标抗体基因导入这些细胞中,并在体外培养所转化的细胞。可以根据公知的方法进行培养。例如,作为培养液,可以使用 DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM,也可以并用胎牛血清 (FCS) 等血清补充液。另外,通过将导入有抗体基因的细胞移至动物的腹腔等,从而也可以在体内产生抗体。

[0129] 另一方面,作为体内的产生系统,可以列举出使用动物的产生系统或使用植物的产生系统。使用动物时,有使用哺乳类动物、昆虫的产生系统等。

[0130] 作为哺乳类动物,可以使用山羊、猪、绵羊、小鼠、牛等 (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications,1993)。另外,作为昆虫,可以使用蚕。使用植物时,例如可以使用烟草。

[0131] 将抗体基因导入这些动物或植物中,在动物或植物体内产生抗体,并回收。例如,可以在编码蛋白质的基因中间插入抗体基因而作为融合基因制备,所述蛋白质是在山羊 β 酪蛋白之类的乳汁中固有产生的。将含有融合基因的 DNA 片段注入山羊的胚胎(所述融合基因中插入有抗体基因),将该胚胎导入雌性的山羊。由接受胚胎的山羊生产的转基因山羊或其子孙所产生的乳汁得到所需的抗体。为了使含有所需抗体的乳汁量增加,也可以对转基因山羊使用适当的激素,其中所需抗体是由转基因山羊产生的。(Ebert, K. M. et al., *Bio/Technology* (1994) 12, 699-702)。

[0132] 另外,使用蚕时,使蚕感染插入有目标抗体基因的杆状病毒,由该蚕的体液得到所需的抗体 (Maeda, S. et al., *Nature* (1985) 315, 592-594)。而且,使用烟草时,将目标抗体基因插入植物表达用载体(例如 pMON530),将该载体导入根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 之类的细菌。使该细菌感染烟草(例如 *Nicotiana tabacum*),从该烟草的叶子中得到所需的抗体 (Julian, K.-C. Ma et al., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24, 131-138)。

[0133] 如上所述利用体外或体内的产生系统产生抗体时,可以将编码抗体重链(H链)或轻链(L链)的 DNA 分别插入表达载体,使宿主同时转化;或者也可以将编码 H 链和 L 链的 DNA 插入单一的表达载体,使宿主转化(参照国际专利申请公开号 WO 94-11523)。

[0134] 本发明中使用的抗体,只要可以适用于本发明即可,可以是抗体的片段或其修饰物。例如,作为抗体的片段,可列举:Fab、F(ab')₂、Fv 或用适当的连接体使 H 链和 L 链连接的单链 Fv(scFv)。

[0135] 具体而言,将抗体用酶(例如木瓜蛋白酶、胃蛋白酶)进行处理,生成抗体片段,或者构筑编码这些抗体片段的基因,将其导入表达载体后,在适当的宿主细胞中表达(例如,参照 Co, M. S. et al., *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H., *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496; Plueckthun, A. & Skerra, A., *Methods in Enzymology* (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 663-666; Bird, R. E. et al., *TIBTECH* (1991) 9, 132-137)。

[0136] scFv 通过连接抗体的 H 链 V 区和 L 链 V 区而得到。该 scFv 中, H 链 V 区和 L 链 V 区通过连接体 (优选通过肽连接体) 进行连接 (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (1988) 85, 5879-5883)。scFv 中的 H 链 V 区和 L 链 V 区也可以来源于作为上述抗体记载的任一种抗体。作为连接 V 区的肽连接体, 例如可以使用由氨基酸 12-19 残基构成的任意单链肽。

[0137] 编码 scFv 的 DNA, 可以通过以下方法获得: 以编码前述抗体的 H 链或 H 链 V 区的 DNA, 以及编码 L 链或 L 链 V 区的 DNA 作为模板, 将编码这些序列中所需的氨基酸序列的 DNA 部分, 使用规定其两端的引物对, 利用 PCR 法进行扩增, 然后, 进一步组合编码肽连接体部分的 DNA 以及为使其两端分别与 H 链、L 链连接而规定的引物对, 并进行扩增。

[0138] 另外, 一旦编码 scFv 的 DNA 被制成, 就可以根据常法得到含有它们的表达载体以及由该表达载体而转化的宿主, 另外, 使用该宿主根据常法可以得到 scFv。

[0139] 这些抗体的片段, 可以与前述同样来获得其基因并使其表达, 再通过宿主而产生。本发明中所说的“抗体”中也包括这些抗体的片段。

[0140] 作为抗体的修饰物, 还可以使用与聚乙二醇 (PEG) 等各种分子结合的抗体。本发明中所说的“抗体”中也包括这些抗体修饰物。为了得到这样的抗体修饰物, 可以通过对所得抗体实施化学修饰而得到。这些方法在该领域中是已经确立的。

[0141] 如上述那样产生、表达的抗体, 可以自细胞内外、宿主分离, 并纯化至均一。本发明中所用的抗体的分离、纯化可以利用亲和色谱法进行。作为亲和色谱法中使用的柱, 例如可列举: 蛋白质 A 柱、蛋白质 G 柱。作为蛋白质 A 柱中所用的载体, 例如可列举: HyperD、POROS、Sepharose F. F. 等。另外可以使用通常的蛋白质所用的分离、纯化方法, 并没有任何限定。

[0142] 例如, 可以适当选择、组合除上述亲和色谱法以外的色谱法、过滤、超滤、盐析、透析等, 来分离、纯化本发明中使用的抗体。作为色谱法, 例如可列举: 离子交换色谱法、疏水色谱法、凝胶过滤等。这些色谱法适用于 HPLC (高效液相色谱法, high performance liquid chromatography)。另外还可以使用反相 HPLC (reverse phase HPLC)。

[0143] 上述得到的抗体的浓度测定可以通过吸光度测定或 ELISA 等而进行。即, 通过吸光度测定的情况下, 用 PBS (-) 适当稀释后, 测定 280nm 的吸光度, 以 1mg/ml 作为 1.350D 来计算。另外, 使用 ELISA 的情况下, 可以如下述那样进行测定。即, 在 96 孔板 (Nunc 制) 中加入用 0.1M 重碳酸缓冲液 (pH 9.6) 稀释至 1 μ g/ml 的山羊抗人 IgG (TAG 制) 100 μ l, 在 4°C 下孵化一晚, 使抗体固相化。阻断后, 添加适当稀释的本发明中所用抗体或含有抗体的样品, 或者作为标准品的人 IgG (CAPPEL 制) 100 μ l, 在室温下孵化 1 小时。

[0144] 洗净后, 加入稀释 5000 倍的碱性磷酸酶标记抗人 IgG (BIOSOURCE 制) 100 μ l, 室温下孵化 1 小时。洗净后加入基质溶液, 孵化后, 使用微量培养板读数模型 3550 (MICROPLATE READER Model 3550) (Bio-Rad 制) 测定 405nm 下的吸光度, 算出目标抗体的浓度。

[0145] 本发明中使用的 IL-6 变体是具有与 IL-6 受体的结合活性, 且不传导 IL-6 的生物学活性的物质。即, IL-6 变体与 IL-6 对 IL-6 受体竞争性结合, 但不传导 IL-6 的生物学活性, 因此可以阻断 IL-6 引起的信号传导。

[0146] IL-6 变体通过取代 IL-6 的氨基酸序列的氨基酸残基而引入突变进而制得。构成 IL-6 变体的基础的 IL-6, 不管其来源, 若考虑抗原性等, 则优选为人 IL-6。

[0147] 具体而言, 通过以下方法进行制备: 将 IL-6 氨基酸序列使用公知的分子建模程

序,例如WHATIF(Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56) 来预测其二级结构,进而评价对取代的氨基酸残基整体的影响。决定适当的取代氨基酸残基后,以含有碱基序列的载体作为模板(所述碱基序列是编码人 IL-6 基因的碱基序列),通过通常进行的 PCR 法引入突变,以使氨基酸被取代,从而得到编码 IL-6 变体的基因。根据需要将其插入适当的表达载体,基于前述重组抗体的表达、产生以及纯化方法可以得到 IL-6 变体。

[0148] 作为 IL-6 变体的具体例,公开有 Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93, 以及 Savino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367、WO 96-18648, WO 96-17869。

[0149] 本发明中使用的 IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽是分别具有与 IL-6 受体或 IL-6 的结合活性,且不传导 IL-6 的生物学活性的物质。即,IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽结合于 IL-6 受体或 IL-6,通过捕捉它们,从而特异性地阻断 IL-6 与 IL-6 受体的结合。其结果为,由于不传导 IL-6 的生物学活性,因而阻断 IL-6 引起的信号传导。

[0150] IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽,是由 IL-6 或 IL-6 受体的氨基酸序列中与 IL-6 和 IL-6 受体的结合相关的区域的一部分或全部的氨基酸序列构成的肽。这种肽通常由 10 ~ 80, 优选 20 ~ 50, 更优选 20 ~ 40 个氨基酸残基构成。

[0151] IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽,可以通过通常公知的方法,例如基因工程方法或肽合成法进行制作,即在 IL-6 或 IL-6 受体的氨基酸序列中,确定与 IL-6 和 IL-6 受体结合相关的区域,以该确定区域的一部分或全部的氨基酸序列为基础的方法。

[0152] 使用基因工程方法制作 IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽时,将编码所需的肽的 DNA 序列插入表达载体,根据前述重组抗体的表达、产生以及纯化方法可以制得。

[0153] 使用肽合成法制作 IL-6 部分肽或 IL-6 受体部分肽时,可以使用在肽合成中常用的方法,例如固相合成法或液相合成法。

[0154] 具体而言,可以根据“续医药品的开发第 14 卷肽合成监修矢岛治明广川书店 1991 年”中记载的方法进行。作为固相合成法,例如可以使用以下方法:(1) 在不溶于有机溶剂的支撑体上结合对应于要合成的肽的 C 末端的氨基酸,通过交替重复以下的反应来拉伸肽链,所述反应为:将氨基酸按照从 C 末端到 N 末端方向的顺序使每个氨基酸进行缩合的反应,所述氨基酸是用适当的保护基保护 α -氨基酸和侧链官能团的氨基酸;以及 (2) 使结合在树脂上的氨基酸或肽的 α -氨基酸的该保护基脱离的反应。固相肽合成法根据所用的保护基的种类,大致分为 Boc 法和 Fmoc 法。

[0155] 这样合成目标肽之后,进行脱保护反应以及从肽链的支撑体的切断反应。在与肽链的切断反应中,Boc 法通常可以使用氟化氢或三氟甲磺酸;Fmoc 法通常可以使用 TFA。Boc 法中,例如在氟化氢中在苯甲醚存在下,处理上述保护肽树脂。然后,进行保护基的脱离和从支撑体的切断,来回收肽。通过将其冷冻干燥而得到粗肽。另一方面,Fmoc 法中,例如在 TFA 中按照与上述同样的操作进行脱保护反应和从肽链支撑体的切断反应。

[0156] 得到的粗肽可以采用 HPLC 来分离、纯化。其溶出可以使用蛋白质纯化中常用的水-乙腈系溶剂,在最适条件下进行。分取对应于所得图谱的特性峰的组分,将其进行冷冻干燥。对于这样纯化的肽组分,通过质谱分析来进行分子量解析、氨基酸组成分析或氨基酸序列解析等,从而进行鉴定。

[0157] IL-6 部分肽以及 IL-6 受体部分肽的具体例,已在日本特开平 2-188600、日本特开平 7-324097、日本特开平 8-311098 以及美国专利公报 US5210075 中公开。

[0158] 本发明中使用的抗体,也可以是聚乙二醇(PEG)、放射性物质、毒素等各种分子结合的共轭抗体(コンジュゲート抗体)。这样的共轭抗体可以通过对所得到的抗体实施化学修饰而得到。另外,抗体的修饰方法在该领域中已经确立。本发明中的“抗体”中也包含这些共轭抗体。

[0159] 本发明的心肌梗塞治疗剂以及心肌梗塞后左心室重塑的抑制剂可以用于心肌梗塞的治疗。

[0160] 在本发明中,“心肌梗塞治疗”是指抑制或预防心肌梗塞的症状以及心肌梗塞中并发的心力衰竭、缺血引起的重度心律不齐。

[0161] 作为心肌梗塞中并发的症状,可列举:心律不齐(期外收缩、心室纤维性颤动、房室传导阻滞)、心力衰竭、乳头肌断裂、心破裂、心室瘤(作为左冠动脉前降支梗塞的结果在心尖部生成)、心肌梗塞后症候群等,本发明的“心肌梗塞治疗剂”也可以抑制、预防这些症状。

[0162] 另外,在本发明中,“心肌梗塞后左心室重塑的抑制”是指抑制或预防心肌梗塞后用于弥补梗塞区的功能降低的心肌肥大(左心室全体扩张)。

[0163] 该心肌肥大,是由于梗塞区的心肌细胞坏死、脱落,被置换成胶原纤维等纤维组织,纤维组织薄且伸展而引起的。因此抑制、预防“置成换梗塞区的胶原纤维”以及“纤维组织的伸展”,即改善梗塞区的状态,也包含在上述的“心肌梗塞后左心室重塑的抑制”中。

[0164] 确认心肌梗塞的症状以及心肌梗塞后的左心室重塑是否被抑制,可以以心肌梗塞区以及非梗塞区的髓过氧化物酶(MPO)活性作为指标进行判断。已知髓过氧化物酶(MPO)是噬中性粒细胞的细胞内颗粒中存在的酶,如果有冠动脉疾病,则活性会显著地上升。随着梗塞区的扩大以及恶化(坏死等),使MPO活性增加。即通过给予本发明的药物,从而在MPO活性被抑制的情况下,可以认为心肌梗塞的症状以及心肌梗塞后的左心室重塑被抑制。MPO活性可以根据公知的方法进行测定,例如可以列举出实施例中记载的测定方法。

[0165] 另外,确认心肌梗塞的症状以及心肌梗塞后的左心室重塑是否被抑制,也可以以心肌梗塞区以及非梗塞区的MCP-1(单核细胞趋化蛋白-1, monocyte chemoattractant protein-1)的表达作为指标进行判断。已知MCP-1是在心肌内诱导巨噬细胞,通过炎症性细胞因子的表达亢进而成为心力衰竭发病原因的趋化因子,使炎症活化、引起血管周围或心肌的纤维化。随着梗塞区的扩大以及恶化(坏死等),MCP-1的表达增大。即,MCP-1的表达被抑制时,可以认为心肌梗塞的症状以及心肌梗塞后的左心室重塑被抑制。MCP-1的表达可以使用公知的蛋白质表达测定方法进行测定,例如可以列举出蛋白质印迹法或ELISA法等。

[0166] 抑制MPO活性以及抑制MCP-1的表达,均意味着上述的“改善梗塞区的状态”。

[0167] 进而,通过心脏超声波检查来测定左心室扩张末期径(径)以及射血分数,或者通过心脏组织的组织学检查来对心肌纤维化的程度或心肌细胞肥大进行定量评价,从而也可以判断心肌梗塞的症状以及心肌梗塞后的左心室重塑是否被抑制。这些可以通过公知的方法来实现。例如可以列举出实施例中记载的方法。

[0168] 本发明中使用的IL-6抑制剂的IL-6信号转导抑制活性,可以通过通常使用的方法进行评价。具体而言,通过培养IL-6依存性人骨髓瘤株(S6B45, KPMM2)、人Lennert T淋巴瘤细胞株KT3、或IL-6依存性细胞MH60.BSF2,在其中添加IL-6,同时共存有IL-6抑制

剂,从而可以测定 IL-6 依存性细胞的 ^3H -胸腺嘧啶核苷摄取。另外,通过培养 IL-6 受体表达细胞 U266,添加 ^{125}I 标记 IL-6,同时加入 IL-6 抑制剂,从而测定结合于 IL-6 受体表达细胞的 ^{125}I 标记 IL-6。上述检测系统中,除了存在 IL-6 抑制剂的组,还有不含 IL-6 抑制剂的阴性对照组,比较两者中得到的结果,则可以评价 IL-6 抑制剂的 IL-6 抑制活性。

[0169] 如后述的实施例中所述,通过给予抗 IL-6 受体抗体,从而可以确认抑制心肌梗塞的症状和心肌梗塞后的左心室重塑,因此可知抗 IL-6 受体抗体等的 IL-6 抑制剂作为心肌梗塞治疗剂以及心肌梗塞后左心室重塑的抑制剂是有用的。

[0170] 本发明的心肌梗塞治疗剂以及心肌梗塞后左心室重塑抑制剂的给药对象是哺乳动物。哺乳动物优选为人。

[0171] 本发明的心肌梗塞治疗剂以及心肌梗塞后左心室重塑的抑制剂,可以以药品的形态给药,可以口服或非口服的全身或局部给药。例如可以选择点滴等静脉内注射、肌肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、栓剂、灌肠剂、口服肠溶制剂等,可以根据患者的年龄、症状等来选择适当的给药方法。有效给药量每次每 1kg 体重在 0.01mg ~ 100mg 的范围内选择。或者每个患者选择 1 ~ 1000mg,优选 5 ~ 50mg 的给药量。优选的给药量、给药方法,例如在抗 IL-6 受体抗体的情况下,血中游离抗体存在的程度的量为有效给药量,作为具体的例子,每 1kg 体重 1 个月(4 周)0.5mg ~ 40mg,优选 1mg ~ 20mg,分 1 次~数次给药,例如 2 次/周、1 次/周、1 次/2 周、1 次/4 周等按照给药时间表用点滴等静脉注射、皮下注射等方法进行给药的方法。给药时间表,可以一边观察移植后的状态以及观察血液检查值的动向,一边进行延长给药间隔等调整,如从 2 次/周或 1 次/周调整为 1 次/2 周、1 次/3 周、1 次/4 周。

[0172] 在本发明中心肌梗塞治疗剂以及心肌梗塞后左心室重塑的抑制剂中,也可以添加保存剂、稳定剂等制剂上容许的载体。制剂上容许的载体是指其自身可以是对上述心肌梗塞症状以及心肌梗塞后的左心室重塑具有抑制效果的材料,也可以是不具有该抑制效果的材料,可与上述药物同时给药的材料。另外,也可以是对心肌梗塞症状以及心肌梗塞后左心室重塑具有抑制效果的材料,通过与 IL-6 抑制剂并用,从而具有协同或相加的稳定效果的材料。

[0173] 作为制剂上容许的材料,例如可列举:灭菌水、生理盐水、稳定剂、赋性剂、缓冲剂、防腐剂、表面活性剂、络合剂(EDTA 等)、粘合剂等。

[0174] 本发明中,作为表面活性剂可以列举出非离子表面活性剂,例如可以列举出以下物质作为典型的例子:失水山梨醇单辛酸酯、失水山梨醇单月桂酸酯、失水山梨醇单棕榈酸酯等失水山梨醇脂肪酸酯;单辛酸甘油酯、单肉豆蔻酸甘油酯、单硬脂酸甘油酯等甘油脂肪酸酯;单硬脂酸十聚甘油酯、双硬脂酸十聚甘油酯、单亚油酸十聚甘油酯等聚甘油脂肪酸酯;聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯、聚氧乙烯失水山梨醇单油酸酯、聚氧乙烯失水山梨醇单硬脂酸酯、聚氧乙烯失水山梨醇单棕榈酸酯、聚氧乙烯失水山梨醇三油酸酯、聚氧乙烯失水山梨醇三硬脂酸酯等聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯;聚氧乙烯失水山梨醇四硬脂酸酯、聚氧乙烯失水山梨醇四油酸酯等聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯;聚氧乙烯甘油单硬脂酸酯等聚氧乙烯甘油脂肪酸酯;聚乙二醇二硬脂酸酯等聚乙二醇脂肪酸酯;聚氧乙烯月桂醚等聚氧乙烯烷基醚;聚氧乙烯聚氧丙烯二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯丙基醚、聚氧乙烯聚氧丙烯十六烷基醚等聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚;聚氧乙烯壬基酚醚等聚氧乙烯烷基酚醚;聚氧乙烯蓖麻油、聚氧乙烯硬化蓖麻油(聚氧乙烯氢化蓖麻油)等聚氧乙烯硬化蓖麻油;聚氧乙烯

失水山梨醇蜂蜡等聚氧乙烯蜂蜡衍生物；聚氧乙烯羊毛脂等聚氧乙烯羊毛脂衍生物；聚氧乙烯硬脂酸酰胺等聚氧乙烯脂肪酸酰胺等具有 HLB6 ~ 18 的物质等。

[0175] 另外,作为表面活性剂也可以列举出阴离子表面活性剂,例如可以列举出以下物质作为典型的例子:十六烷基硫酸钠、月桂基硫酸钠、油烯基硫酸钠等具有碳原子数 10 ~ 18 的烷基的烷基硫酸盐;聚氧乙烯月桂基硫酸钠等氧化乙烯的平均加成摩尔数为 2 ~ 4、烷基碳原子数 10 ~ 18 的聚氧乙烯烷基醚硫酸盐;月桂基磺基琥珀酸酯钠等烷基碳原子数为 8 ~ 18 的烷基磺基琥珀酸酯盐;天然的表面活性剂,例如卵磷脂、甘油磷脂;神经鞘磷脂等鞘磷脂;碳原子数 12 ~ 18 的脂肪酸的蔗糖脂肪酸酯等。

[0176] 本发明的药剂中可以组合添加这些表面活性剂的一种或两种以上。本发明的制剂中使用的优选的表面活性剂为聚山梨醇酯 20, 40, 60 或 80 等聚氧乙烯失水山梨醇脂肪酸酯,特别优选的是聚山梨醇酯 20 和 80。另外,也优选以泊洛沙姆 (Pluronic F-68 (注册商标) 等) 为代表的聚氧乙烯聚氧丙烯二醇。

[0177] 表面活性的添加量根据使用的表面活性剂的种类而不同,当为聚山梨醇酯 20 或聚山梨醇酯 80 时,一般为 0.001 ~ 100mg/ml,优选为 0.003 ~ 50mg/ml,进一步优选为 0.005 ~ 2mg/ml。

[0178] 作为本发明中的缓冲剂,可以列举出磷酸、柠檬酸缓冲液、醋酸、苹果酸、酒石酸、琥珀酸、乳酸、磷酸钾、葡萄糖酸、癸酸、去氧胆酸、水杨酸、三乙醇胺、富马酸等其他的有机酸等,或者碳酸缓冲液、三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (Tris 缓冲液)、组氨酸缓冲液、咪唑缓冲液等。

[0179] 另外也可以通过溶解在溶液制剂领域中公知的水性缓冲液中来制备溶液制剂。缓冲液的浓度一般为 1 ~ 500mM,优选为 5 ~ 100mM,进一步优选为 10 ~ 20mM。

[0180] 另外,本发明的药剂也可以含有其他低分子量的多肽、血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白等蛋白质、氨基酸、多糖以及单糖等糖类或碳水化合物、糖醇。

[0181] 作为本发明中的氨基酸,可以列举出碱性氨基酸,例如精氨酸、赖氨酸、组氨酸、鸟氨酸等或者这些氨基酸的无机盐(优选盐酸盐、磷酸盐的形式,即磷酸氨基酸)。使用游离氨基酸时,优选 pH 值通过添加适当的生理上容许的缓冲物质(例如无机酸,特别是盐酸、磷酸、硫酸、醋酸、蚁酸或者它们的盐)来进行调节。这种情况下使用磷酸盐时,特别是在获得稳定的冷冻干燥物方面是特别有利的。当制备物实质上不含有机酸(例如苹果酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸、富马酸等)时或者不存在相应的阴离子(苹果酸离子、酒石酸离子、柠檬酸离子、琥珀酸离子、富马酸离子等)时,是特别有利。优选的氨基酸为精氨酸、赖氨酸、组氨酸或鸟氨酸。而且也可以使用酸性氨基酸,例如谷氨酸和天冬氨酸及其盐的形式(优选钠盐);或者中性氨基酸,例如异亮氨酸、亮氨酸、甘氨酸、丝氨酸,苏氨酸,缬氨酸,蛋氨酸,半胱氨酸或丙氨酸;或者芳香族氨基酸,例如苯基丙氨酸、酪氨酸、色氨酸或衍生物 N-乙酰基色氨酸。

[0182] 在本发明中,作为多糖以及单糖等糖类或碳水化合物,例如可列举:右旋糖苷、葡萄糖、果糖、乳糖、木糖、甘露糖、麦芽糖、蔗糖、海藻糖、棉子糖等。

[0183] 在本发明中,作为糖醇,例如可列举:甘露醇、失水山梨醇、纤维醇等。

[0184] 将本发明的药物制成注射用水溶液时,例如可以与含有生理盐水、葡萄糖或其他辅助药(例如 D-失水山梨醇、D-甘露糖、D-甘露醇、氯化钠)的等渗液混合,另外该水溶液

也可以与适当的溶解辅助剂（例如醇（乙醇等）、多元醇（丙二醇、PEG 等）、非离子表面活性剂（聚山梨醇酯 80、HCO-50）等）并用。

[0185] 根据需要还可进一步含有稀释剂、溶解辅助剂、pH 调节剂、无痛剂、含硫还原剂、抗氧化剂等。

[0186] 本发明中，作为含硫还原剂，例如可列举：N-乙酰半胱氨酸、N-乙酰高半胱氨酸、硫辛酸、硫代二甘醇、硫代乙醇胺、硫代甘油、硫代失水山梨醇、巯基乙酸及其盐、硫代硫酸钠，谷胱甘肽以及碳原子数 1～7 的硫代直链烷酸等具有巯基的物质等。

[0187] 另外，作为本发明中的抗氧化剂，例如可列举：异抗坏血酸、二丁基羟基甲苯、丁基羟基茴香醚、 α -生育酚、生育酚乙酸酯、L-抗坏血酸及其盐、L-抗坏血酸棕榈酸酯、L-抗坏血酸硬脂酸酯、亚硫酸氢钠、亚硫酸钠、三戊基没食子酸酯、丙基没食子酸酯或乙二胺四乙酸二钠 (EDTA)、焦磷酸钠、偏磷酸钠等络合剂。

[0188] 另外，根据需要，也可以通过封入微胶囊（羟甲基纤维素、明胶、聚[甲基丙烯酸甲酯]等微胶囊），制成胶体药物传递系统（脂质体、白蛋白微球、微乳、纳米粒和纳米胶囊等）（参照“Remington's Pharmaceutical Science 16th edition”，Oslo Ed., 1980 等）。而且将药物制成缓释制剂的方法也是公知的，也可适用于本发明（Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. 1981, 15:167-277; Langer, Chem. Tech. 1982, 12:98-105; 美国专利第 3,773,919 号; 欧洲专利申请公开 (EP) 第 58,481 号; Sidman et al., Biopolymers 1983, 22:547-556; EP 第 133,988 号）。

[0189] 所用的制剂上容许的载体，可根据剂型从上述中适宜选择或进行组合，但并不局限于这些。

[0190] 本发明涉及对对象治疗心肌梗塞的方法以及抑制心肌梗塞后左心室重塑的方法，其中治疗方法包括将 IL-6 抑制剂给予有心肌梗塞症状的对象的工序。

[0191] 在本发明中，“对象”是指给予本发明的心肌梗塞治疗剂以及心肌梗塞后左心室重塑抑制剂的生物体、该生物体体内的一部分。生物体没有特别地限定，包含动物（例如人、家畜动物种、野生动物）。

[0192] 另外，“生物体体内的一部分”没有特别限定，可优选列举：心脏、心肌、心肌梗塞的梗塞区或非梗塞区等。

[0193] 在本发明中，“给药”包括口服或者非口服给药。作为口服给药，可以列举出以口服制剂的形式给药，作为口服制剂，可以选择颗粒剂、散剂、片剂、胶囊剂、溶液剂、乳剂或悬浊剂等剂型。

[0194] 作为非口服给药，可以列举出以注射剂形式给药，作为注射剂，可以列举出皮下注射剂、肌肉注射剂或腹腔内注射剂等。另外，通过使用基因治疗方法将包含应给予的寡核苷酸的基因导入机体，可以达到本发明方法的效果。另外，本发明的药剂也可以对需实施处置的区域进行局部给药。例如也可以通过手术中的局部注入、使用导液管或本发明的编码肽的 DNA 的定向基因送递而进行给药。心肌梗塞发病时的处方，例如也可以与导液管手术法 (PTCA、PCI)、血栓溶解疗法 (PTCR)、冠状动脉旁路移植术 (CABG) 等同时平行地给予本发明的药剂。

[0195] 实践本发明的方法时，本发明的药剂也可以与至少一种已知的化学疗法剂一起作为药学组合物的一部分进行给药。或者本发明的药剂与至少一种已知的免疫抑制剂同时给

药。在一种方式中,本发明的药剂和已知的化学疗法剂可以实质上同时给药。

[0196] 另外,本说明书中引用的全部背景技术文献作为参考包括在本说明书中。

[0197] 实施例

[0198] 下面,通过实施例进一步具体地说明本发明,但本发明并不局限于这些实施例。

[0199] [实施例 1] 制作心肌梗塞小鼠模型

[0200] 对雄性 Balb/c 小鼠 (25 ~ 30g) 进行气管插管,安装人工呼吸器,在异氟烷 0.5 ~ 1.0% 的条件下进行吸入麻醉。从左侧开胸,结扎左前降支后闭胸。将小鼠分为 MR16-1 给药组 (MR16-1 组) 和非给药组 (对照组),对 MR16-1 给药组腹腔注射 500 μ g/只 (body) 的 MR16-1。

[0201] [实施例 2] MPO 活性测定

[0202] 心肌梗塞制成 (冠状动脉结扎) 2 天后摘出小鼠心脏,分成梗塞区和非梗塞区并切碎。然后在切碎的心肌中加入 10 倍量的含 0.5% 十六烷基三甲基溴化铵的 50mM KPO_4 缓冲液 (pH 6.0),均质化后 (POLYTRON, KINEMATICAAG, Luzern, Switzerland) 进行超声波粉碎。将提取液在 13,000rpm、4 $^{\circ}$ C 下离心分离 10 分钟。将得到的上清液 50 μ l 与基质溶液 1.45ml (50mM KPO_4 (pH 6.0)、0.167mg/ml 邻联茴香胺二氢氯化物 (o-dianisidine dihydrochloride)、0.005% H_2O_2) 混合后,在 460nm 的吸光度下测定基质溶液颜色的变化 (衰减系数 (Extinction Coefficient) = 2.655)。

[0203] 其结果为,心肌 MPO 活性在 sham 组心肌和心肌非梗塞区存在差异,但在心肌梗塞区显著增加至约 4 倍 (非控制风险 (control-non risk) 0.037 ± 0.006 ; 控制风险 (control-risk) 0.122 ± 0.035 ; $p < 0.01$)。而且在 MR16-1 给药组中,该心肌梗塞区的 MPO 活性增加被显著抑制 (MR16-1- 风险 0.034 ± 0.008 ; 与控制风险 (control-risk) 相比 $p < 0.05$)。

[0204] [实施例 3] MCP-1 表达测定

[0205] 心肌梗塞制成 2 日后摘出小鼠的心脏,分成梗塞区和非梗塞区并切碎。在切碎的心室肌中加入裂解缓冲液 (lysis buffer) (2 \times PBS, 1% NP-40, 0.5% 去氧胆酸钠 (sodium deoxycholate), 0.1% 十二烷基硫酸钠 (sodium dodecylsulphate), 1mM PMSF, 1% 蛋白酶抑制剂鸡尾酒 (protease inhibitor cocktail) (/ ナカライテスク)) 进行均质化。将这些提取液在 13,000rpm、4 $^{\circ}$ C 下离心分离 10 分钟,将所得上清液制成总细胞裂解液 (total cell lysate),用 Lowry 法进行蛋白质定量。用 12% 聚丙烯酰胺凝胶分离等量的蛋白质溶液,转录到 Immun-BlotTM PVDF 膜上。之后使用抗 MCP-1 抗体 (1 : 30; IBL Co.) 作为一次抗体,在 4 $^{\circ}$ C 下过夜,进而使用山羊抗家兔 (goat anti-rabbit) IgG (1 : 400; 细胞信号传导) 作为二次抗体在室温下反应 2 小时,使用 ECL (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, U. K.) 的化学发光法检测 MCP-1 表达。使用计算机软件 (Scion Image Frame Grabber Status) 对照片进行图像解析。

[0206] 其结果为,心肌 MCP-1 表达在对照组中心肌梗塞区、非梗塞区均增加,但在梗塞区更显著。而且, MCP-1 给药组中在两区域该 MCP-1 增加均被抑制。

[0207] [实施例 4] 心脏超声波检查

[0208] 心肌梗塞制成 4 周后,在麻醉下对心脏进行心脏超声波检查,测定左心室舒张末期径和左心室径缩短率 (FS)。

[0209] 其结果为,心肌梗塞制成 4 周后的心脏超声波检查中,左心室舒张末期径在对照组中比 sham 组显著增加。该左心室径的增加通过给予 MR16-1 而被显著抑制。而且 FS 通过制成心肌梗塞而减少,但通过给予 MR16-1 而显著改善(对照组 $18.5 \pm 2.9\%$ 对比 MR16-1 组 $28.5 \pm 1.8\%$; $p < 0.05$)。

[0210] [实施例 5] 组织学评价

[0211] 心肌梗塞制成 4 周后摘出心脏,用 4% 多聚甲醛磷酸缓冲液固定,进行石蜡包埋。切薄后,进行 Masson's 三色染色,对非梗塞区的心肌纤维化程度以及心肌短轴断面中的心肌细胞肥大进行定量评价。

[0212] 其结果为,在心肌非梗塞区,对照组中发现心肌细胞的肥大、间质的纤维化,相对而言 MR16-1 给药组中这些症状被抑制。

[0213] 工业适用性

[0214] 心肌梗塞如果梗塞区扩大、恶化,则有时并发心力衰竭,或由缺血引起重度的心律不齐,对生命有很高的危险性。本发明的心肌梗塞治疗剂、心肌梗塞后左心室重塑的抑制剂以及通过治疗或预防心肌梗塞的方法,从而可以对心肌梗塞中并发的症状进行抑制,进行有效地治疗。

[0215] 认为心肌梗塞后左心室重塑的发病率也与梗塞区的大小有关,从心肌梗塞发病初期,改善梗塞区的状态,防止其扩大是很重要的。认为通过以本发明的 IL-6 抑制剂作为有效成分的药物从心肌梗塞初期开始对患者给药,从而可抑制心肌梗塞中并发的症状和左心室重塑。