

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4763043号  
(P4763043)

(45) 発行日 平成23年8月31日(2011.8.31)

(24) 登録日 平成23年6月17日(2011.6.17)

(51) Int. Cl.		F I	
<b>C07K 16/24</b>	<b>(2006.01)</b>	C07K 16/24	ZNA
<b>A61K 39/395</b>	<b>(2006.01)</b>	A61K 39/395	N
<b>A61P 25/28</b>	<b>(2006.01)</b>	A61P 25/28	
<b>A61P 37/02</b>	<b>(2006.01)</b>	A61P 37/02	
<b>A61P 29/00</b>	<b>(2006.01)</b>	A61P 29/00	101

請求項の数 9 (全 117 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-509211 (P2008-509211)	(73) 特許権者	503054122
(86) (22) 出願日	平成18年4月28日(2006.4.28)		セントカー・インコーポレーテッド
(65) 公表番号	特表2008-538931 (P2008-538931A)		アメリカ合衆国ペンシルベニア州1935
(43) 公表日	平成20年11月13日(2008.11.13)		5マルバーン・グレートバレイパークウエ
(86) 国際出願番号	PCT/US2006/016457		イ200
(87) 国際公開番号	W02006/119115	(73) 特許権者	507357106
(87) 国際公開日	平成18年11月9日(2006.11.9)		アプライド・モレキュラー・エポリューシ
審査請求日	平成20年2月29日(2008.2.29)		ョン・インコーポレーテッド
(31) 優先権主張番号	60/676,498		アメリカ合衆国カリフォルニア州9212
(32) 優先日	平成17年4月29日(2005.4.29)		1サンデイエゴ・スイート200・キャン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		パスポイントドライブ10300・リライ
(31) 優先権主張番号	60/677,319		バイオテクノロジーセンター・サンデイエ
(32) 優先日	平成17年5月3日(2005.5.3)		ゴ
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	110000741
			特許業務法人小田島特許事務所
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗-IL-6抗体、組成物、方法および使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列識別番号：97の軽鎖可変領域アミノ酸配列および配列識別番号：99の重鎖可変領域アミノ酸配列を含んで成る単離IL-6抗体。

【請求項2】

配列識別番号：3の相補性決定領域軽鎖1(CDR L1)アミノ酸配列、配列識別番号：21のCDRL2アミノ酸配列、配列識別番号：29のCDRL3アミノ酸配列、配列識別番号：39の相補性決定領域重鎖1(CDR H1)アミノ酸配列、配列識別番号：59のCDRH2アミノ酸配列および配列識別番号：89のCDRH3アミノ酸配列を含み、かつ、配列識別番号：105のヒト軽鎖フレームワーク領域1(FRL1)、配列識別番号：106のFRL2、配列識別番号：107のFRL3、配列識別番号：108のFRL4、配列識別番号：109のヒト重鎖フレームワーク領域1(FRH1)、配列識別番号：110のFRH2、配列識別番号：111のFRH3および配列識別番号：112のFRH4も含んでおり、これらのフレームワーク領域が前記相補性決定領域の間に散在している、単離IL-6抗体。

【請求項3】

請求項2に記載のIL-6抗体であって、配列識別番号：115に示されるアミノ酸配列を有するIL-6ポリペプチドの活性を下方調節し、かつ、該活性がIL-6の可溶性gp80(sIL-6R)への結合、IL-6誘導性単球化学誘引物質プロテイン-1(MCP-1)産生、IL-6およびIL-1誘導性血清アミロイドA(SAA)産生、IL

- 6 依存性 S T A T 3 リン酸化、並びにサブコンフルエント H e p G 2 細胞上のプロテインキナーゼ B およびインスリン受容体 ( I R ) I R - 1 リン酸化の低下からなる群より選ばれる、 I L - 6 抗体。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 いずれかに記載の I L - 6 抗体および少なくとも 1 種の製薬学的に受け入れられる担体もしくは希釈剤を含んで成る 医薬組成物。

【請求項 5】

更に、T N F アンタゴニスト、抗感染薬、心臓血管 ( C V ) 系作用薬、中枢神経系 ( C N S ) 作用薬、自律神経系 ( A N S ) 作用薬、呼吸器作用薬、胃腸 ( G I ) 管作用薬、ホルモン薬、体液もしくは電解質平衡用薬剤、血液製剤、抗癌薬、免疫修飾薬、眼、耳もしくは鼻用薬剤、局所用薬剤、栄養薬、サイトカインおよびサイトカインアンタゴニストから選択される少なくとも 1 種の化合物もしくはポリペプチドも含んで成る請求項 4 に記載の組成物。

10

【請求項 6】

請求項 1 または 2 に記載の I L - 6 抗体をコードするヌクレオチドを含み、前記抗体を回収可能量で発現し得る宿主細胞または非ヒトトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物もしくは植物細胞を準備する工程、および前記抗体を回収する工程を含んでなる方法により生産される I L - 6 抗体。

【請求項 7】

配列識別番号：98 のヌクレオチド配列によりコードされる軽鎖可変領域アミノ酸配列および配列識別番号：100 のヌクレオチド配列によりコードされる重鎖可変領域アミノ酸配列を含んで成る単離 I L - 6 抗体。

20

【請求項 8】

配列識別番号：4 のヌクレオチド配列によりコードされる相補性決定領域軽鎖 1 ( C D R L 1 ) アミノ酸配列、配列識別番号：22 のヌクレオチド配列によりコードされる C D R L 2 アミノ酸配列、配列識別番号：30 のヌクレオチド配列によりコードされる C D R L 3 アミノ酸配列、配列識別番号：40 のヌクレオチド配列によりコードされる相補性決定領域重鎖 1 ( C D R H 1 ) アミノ酸配列、配列識別番号：60 のヌクレオチド配列によりコードされる C D R H 2 アミノ酸配列および配列識別番号：90 のヌクレオチド配列によりコードされる C D R H 3 アミノ酸配列を含み、かつ、配列識別番号：105 のヒト軽鎖 フレームワーク領域 1 ( F R L 1 )、配列識別番号：106 の F R L 2、配列識別番号：107 の F R L 3、配列識別番号：108 の F R L 4、配列識別番号：109 のヒト重鎖 フレームワーク領域 1 ( F R H 1 )、配列識別番号：110 の F R H 2、配列識別番号：111 の F R H 3 および配列識別番号：112 の F R H 4 も含んでおり、これらのフレームワーク領域が前記相補性決定領域の間に散在している、単離 I L - 6 抗体。

30

【請求項 9】

請求項 1 ~ 3 および 7 ~ 8 のいずれかに記載の I L - 6 抗体であって、ヒト定常領域を有する抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

40

【0001】

本発明は、少なくとも 1 種の I L - 6 蛋白質またはこれのフラグメントに特異的な抗体 ( 特定の部分および変異体を包含 ) ばかりでなく抗イディオタイプ抗体および前記抗 - I L - 6 抗体をコードする核酸、相補的核酸、ベクター、宿主細胞、そしてそれらの製造および使用方法 ( 治療用製剤、投与および機器を包含 ) に関する。

【背景技術】

【0002】

I L - 6 は、多種多様な細胞型、最も注目すべきは抗原提示細胞、T および B 細胞が産生および分泌する多面発現的炎症性サイトカインである。I L - 6 は B 細胞の増殖および分化、T 細胞の活性化、造血、破骨細胞の活性化、ケラチン生成細胞増殖、神経細胞成長

50

および肝細胞の活性化の如き多様な活性に關与している。IL-6は膜貫通もしくは可溶IL-6Rと結合しそしてgp130(他の数種のサイトカインと共有する)を通してシグナルを伝達する。

#### 【0003】

IL-6は、全身性エリテマトーデス、多発性骨髄腫およびリンパ増殖性疾患で示される如きB細胞異常で重要な役割を果たす。同様に、IL-6は、また、自己免疫および炎症性疾患、例えば関節リウマチおよび変形性関節症などの病因にも關係していると思われる。最近の間接的な証拠によって、IL-6と慢性閉塞性肺疾患および2型糖尿病におけるインスリン耐性の間に關連があることが示唆されている。IL-6は免疫系に炎症誘発および抗炎症効果の両方をもたらす、このことは、そのようなサイトカインは疾患に

10

#### 【0004】

数多くの病気でIL-6の産生が増加することが觀察され、そのような病気には、アルツハイマー病、自己免疫病、例えば関節リウマチなど、炎症、心筋梗塞、パジエット病、骨粗しょう症、固形腫瘍(腎細胞癌)、前立腺および膀胱癌、神経学的癌およびB細胞悪性腫瘍(例えば、Castlemann病、特定のリンパ腫、慢性リンパ球性白血病および多発性骨髄腫)が含まれる。研究により、IL-6とそのような病気の多く、特に癌の病因に關連があることが示されており、従って、IL-6を阻害すると臨床的利益が得ら

20

#### 【0005】

マウス、キメラおよびヒト以外の他の抗-IL-6抗体が開発されたが、しかしながら、それらは効力、効果の点で限界がある可能性があり、しばしば受け入れられない免疫反応の引き金になる可能性があり(即ち、免疫原性)そして/または高い投薬量を必要とし得る[非特許文献1(引用することによって本明細書に組み入れられる)を参照]。例えば、ヒト以外の部分を含む抗体はしばしばヒトに免疫反応をもたらす。従って、抗体の投与を繰り返すことは治療として適切でなく、免疫が複雑に介在して抗体が循環から除去されることで抗体の効力/有効性が低下し得る。血清病とアナフィラキシーがヒト以外の部分を含む抗体を繰り返し投与することによって引き起こされる可能性のある2

30

#### 【0006】

【非特許文献1】Trikha他、Clin. Can. Res. 9、4653-4665、2003年10月

#### 【発明の開示】

#### 【0007】

発明の要約

本発明は、単離ヒト改変抗-IL-6抗体(またIL-6抗体とも呼ぶ)、これの免疫グロブリン、フラグメント、開裂生成物および他の特定部分および変異体ばかりでなく抗-IL-6抗体組成物、IL-6-抗-イディオタイプ抗体、コード化もしくは相補的核酸、ベクター、宿主細胞、組成物、製剤、機器、遺伝子導入動物、遺伝子導入植物およびそれらの製造および使用方法を提供するものである。

40

#### 【0008】

本発明は、1つの面において、特定の抗-IL-6抗体または抗-イディオタイプ抗体をコードするポリヌクレオチドを含んで成るか、それに相補的であるか或はそれとハイブリダイズする単離核酸分子を提供し、これは少なくとも1種の特定配列、これのドメイン、部分または変異体を含んで成る。本発明は、更に、前記抗-IL-6抗体核酸分子を含んで成る組換え型ベクター、前記核酸および/または組換え型ベクターを含む宿主細

50

胞ばかりでなく前記抗体の核酸、ベクターおよび/または宿主細胞を生産および/または使用する方法も提供する。

【0009】

本発明は、また、少なくとも1種の抗-IL-6抗体またはIL-6抗-イディオタイプ抗体を宿主細胞内に発現させる少なくとも1種の方法も提供し、この方法は、本明細書に記述する如き宿主細胞を少なくとも1種の抗-IL-6抗体が検出可能および/または回収可能な量で発現する条件下で培養することを含んで成る。

【0010】

本発明は、また、(a)本明細書に記述する如き単離抗-IL-6抗体をコードする核酸および/または抗体および(b)適切および/または製薬学的に受け入れられる担体もしくは希釈剤を含有して成る少なくとも1種の組成物も提供する。

10

【0011】

本発明は、更に、細胞、組織、器官、動物または患者および/または関連状態になる前、後または間のそれらにおける少なくとも1種のIL-6が関与する症状を調節または処置するに治療的に有効な量を本技術分野で公知および/または本明細書に記述するようにして投与するに適した少なくとも1種の抗-IL-6抗体方法もしくは組成物も提供する。

【0012】

本発明は、また、本発明に従う少なくとも1種の抗-IL-6抗体を治療的または予防的に有効な量で送達する少なくとも1種の組成物、機器および/または方法も提供する。

20

【0013】

本発明は、更に、細胞、組織、器官、動物または患者および/または関連状態になる前、後または間のそれらにおける少なくとも1種のIL-6関連状態を本技術分野で公知および/または本明細書に記述するようにして診断するに適した少なくとも1種の抗-IL-6抗体方法もしくは組成物も提供する。

【0014】

本発明は、また、本発明に従う少なくとも1種の抗-IL-6抗体を診断の目的で送達する少なくとも1種の組成物、機器および/または方法も提供する。

【0015】

また、本発明の少なくとも1種の単離哺乳動物抗-IL-6抗体を含有して成る医学機器も提供し、ここで、前記機器は、少なくとも1種の抗-IL-6抗体、IL-6抗-イディオタイプ抗体、核酸分子、化合物、蛋白質および/または組成物を接触させるか或は投与するに適する。

30

【0016】

また、本発明の少なくとも1種の単離抗-IL-6抗体の溶液または凍結乾燥形態物が入っている容器および包装用材料を含んで成るヒト製薬学的または診断用途用製品も提供する。この製品に場合により基底容器を送達機器またはシステムの構成要素として持たせることも可能である。

【0017】

本発明は更に本明細書に記述する全ての発明も提供する。

40

【0018】

発明の説明

本発明は、単離、組換え型および/または合成抗-IL-6ヒト改変抗体およびこれのIL-6抗-イディオタイプ抗体ばかりでなく少なくとも1種の抗-IL-6抗体もしくは抗-イディオタイプ抗体をコードする少なくとも1種のポリヌクレオチドを含んで成る組成物およびコード化核酸分子も提供する。本発明は、更に、これらに限定するものではないが、前記核酸および抗体および抗-イディオタイプ抗体の製造および使用方法も包含し、それには診断用および治療用組成物、方法および機器が含まれる。

【0019】

本明細書で用いる如き「抗-IL-6抗体」、「IL-6抗体」、「抗-IL-6抗体

50

部分」または「抗 - I L - 6 抗体フラグメント」および/または「抗 - I L - 6 抗体変異体」などには、免疫グロブリン分子の少なくとも一部、例えばこれらに限定するものでないが、重鎖もしくは軽鎖の少なくとも1つの相補性決定領域 ( C D R ) またはそのリガンド結合部分、重鎖もしくは軽鎖可変領域、重鎖もしくは軽鎖定常領域、フレームワーク領域またはこれのいずれかの部分、または I L - 6 受容体もしくは結合蛋白質の少なくとも一部など ( これらを本発明の抗体の中に組み込むことができる ) を含んで成る蛋白質もしくはペプチド含有分子のいずれも含まれる。そのような抗体は、場合により、更に、特定のリガンドに影響を与える可能性もあり、例えば、これらに限定するものでないが、そのような抗体は少なくとも1種の I L - 6 の活性もしくは結合または I L - 6 受容体の活性もしくは結合に関してインビトロ、インシトウおよび/またはインビボで修飾、低下、向上、アンタゴニストとしての作用、アゴニストとしての作用、軽減、緩和、阻害、抑制、無効および/または妨害などを及ぼす。非限定例として、本発明の適切な抗 - I L - 6 抗体、特定部分または変異体は少なくとも1種の I L - 6 分子またはこれの特定部分、変異体またはドメインと結合し得る。また、適切な抗 - I L - 6 抗体、特定部分または変異体は場合により I L - 6 の活性または機能、例えばこれらに限定するものでないが、RNA、DNAまたは蛋白質の合成、I L - 6 の放出、I L - 6 受容体のシグナル伝達、膜 I L - 6 の開裂、I L - 6 の活性、I L - 6 の産生および/または合成などの中の少なくとも1つにも影響を与える。

10

## 【 0 0 2 0 】

更に、用語「抗体」は抗体、この消化フラグメント、特定部分および変異体 [ 抗体またはこの特定フラグメントもしくは部分の構造および/または機能を模倣するか或は模倣する抗体部分を含んで成る抗体模倣物 ( 一本鎖抗体およびこのフラグメントを包含 ) を包含 ] を包含することも意図する。機能的フラグメントには、哺乳動物の I L - 6 と結合する抗原結合フラグメントが含まれる。本発明は例えば I L - 6 もしくはこの部分と結合し得る抗体フラグメントなどを包含し、それには、これらに限定するものでないが、F a b ( 例えばパイン消化による )、F a b ' ( 例えばペプシン消化および部分的還元による ) および F ( a b ' ) <sub>2</sub> ( 例えばペプシン消化による )、f a c b ( 例えばプラスミン消化による )、p F c ' ( 例えばペプシンまたはプラスミン消化による )、F d ( 例えばペプシン消化、部分的還元および再集合による )、F v または s c F v ( 例えば分子生物学技術による ) フラグメントが含まれる ( 例えば上記 C o l l i g a n、I m m u n o l o g y を参照 )。

20

30

## 【 0 0 2 1 】

そのようなフラグメントの生成は本技術分野で公知および/または本明細書に記述する如き酵素による開裂、合成または組換え技術を用いて実施可能である。また、1つ以上の終止コドン天然の終止部位の上流に導入しておいた抗体遺伝子を用いることで抗体をいろいろな切断型で生じさせることも可能である。例えば、F ( a b ' ) <sub>2</sub> 重鎖部分をコードする組換え遺伝子が重鎖の C H <sub>1</sub> ドメインおよび/またはヒンジ領域をコードする D N A 配列を含有するようにそれを設計することも可能である。抗体のいろいろな部分を通常技術を用いて化学的に一緒に結合させてもよいか、或は遺伝子工学技術を用いて連続した蛋白質として調製することも可能である。

40

## 【 0 0 2 2 】

本明細書で用いる如き用語「ヒト改変抗体」は、少なくとも完全にヒトのフレームワークおよび定常領域 [ C <sub>L</sub>、C <sub>H</sub> ドメイン ( 例えば C <sub>H</sub> 1、C <sub>H</sub> 2、C <sub>H</sub> 3 ) およびヒンジ ] および抗原結合抗体由来 C D R を伴う抗体である。完全にヒトのフレームワークには、ヒト生殖細胞配列ばかりでなく体細胞変異を伴う配列に相当するフレームワークが含まれる。C D R は、抗体フレームワークのいずれかに関連して I L - 6 と結合する1つ以上の C D R に由来するものであってもよい。例えば、本発明のヒト改変抗体の C D R は、マウス抗体フレームワークに関連して I L - 6 と結合する C D R に由来するものであってもよく、その後、完全にヒトのフレームワークに関連して I L - 6 と結合するようにそれを改変させる。そのようなヒト改変抗体はしばしばヒトに実質的に免疫原性を示さない。

50

## 【 0 0 2 3 】

同様に、抗体が霊長類〔サル、バブーン (baboon)、チンパンジーなど〕、齧歯類 (マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスターなど) および他の哺乳動物を指定する場合、それは、そのような種、亜属、属、亜科および科に特異的な抗体を示す。その上、キメラ抗体には前記の任意組み合わせが含まれ得る。そのような変形もしくは変異体は、場合によるが好適には、ヒトまたは他の種において、修飾を受けさせていない抗体に比べて免疫原性を保持しているか或は低い免疫原性を示す。従って、ヒト改変抗体はキメラ抗体ともヒト化抗体とも異なる。

## 【 0 0 2 4 】

機能的に再配列させたヒトもしくはヒト改変免疫グロブリン (例えば重鎖および/または軽鎖) 遺伝子を発現し得る動物 (ヒト以外) または原核もしくは真核細胞を用いてヒト改変抗体を生じさせることができることを指摘する。その上、ヒト改変抗体が一本鎖抗体の場合、これは天然のヒト抗体には見られないリンカーペプチドを含んで成り得る。例えば、Fvは、重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域をつなげているリンカーペプチド、例えば2から約8個のグリシンもしくは他のアミノ酸残基などを含んで成り得る。そのようなリンカーペプチドはヒトに由来するものであると考えている。

## 【 0 0 2 5 】

また、少なくとも2種類の異なる抗原に結合特異性を示すモノクローナルの二重特異性、異種特異性、異種接合もしくは同様な抗体、好適にはヒト、ヒト改変もしくはヒト化抗体も使用可能である。本ケースでは、結合特異性の中の一方向は少なくとも1種のIL-6蛋白質に対する特異性であり、もう一方は他のいずれかの抗原に対する特異性である。二重特異性抗体を生じさせる方法は本技術分野で公知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え産生は、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対 (2つの重鎖が異なる特異性を示す) を一緒に発現させることが基になっている [Milstein and Cuello、Nature 305:537 (1983)]。免疫グロブリンの重および軽鎖の組み合わせは無作為であることから、そのようなハイブリドーマ (クアドローマ) は10種類の異なる抗体分子の潜在的混合物をもたらし、これらの中での的確な二重特異性を示す構造を有するのは1つのみである。その的確な分子の精製は一般にアフィニティークロマトグラフィー段階で実施される。同様な手順が例えばWO 93/08829、米国特許第6210668、6193967、6132992、6106833、6060285、6037453、6010902、5989530、5959084、5959083、5932448、5833985、5821333、5807706、5643759、5601819、5582996、5496549、4676980、WO91/00360、WO92/00373、EP03089、Trauncker 他、EMBO J. 10:3655 (1991)、Suresh 他、Methods in Enzymology 121:210 (これらは各々引用することによって全体が本明細書に組み入れられる) に開示されている。

## 【 0 0 2 6 】

本発明の方法および組成物で用いるに有用な抗-IL-6抗体は、場合により、IL-6に高い親和力で結合することでも特徴付け可能であり、かつ場合によるが好適には、毒性が低いとしても特徴付け可能である。個々の成分、例えば可変領域、定常領域およびフレームワークなどが個別および/または集合的に場合によるが好適には低い免疫原性を示す本発明の抗体、特定フラグメントまたは変異体が特に本発明で用いるに有用である。本発明で使用可能な抗体は、場合により、患者を長期間に渡って測定可能な症状軽減を伴いつつ低いおよび/または受け入れられる毒性度合で処置することができることでも特徴付けられる。免疫原性が低いか或は受け入れられる度合でありそして/または親和力が高いばかりでなく他の適切な特性を有することが、そのように達成する治療結果に貢献している可能性がある。本明細書では、抗-IL-6抗体で処置した患者における「低い免疫原性」を、処置期間の間の推奨される治療期間の間に推奨用量で処置した場合に抗-IL-6抗体に対する抗体が滴定濃度で発生する率が処置した患者の25%未満、好適には処置

10

20

30

40

50

した患者の10%未満であるとして定義する。

【0027】

本発明の単離核酸は、少なくとも1種の抗-IL-6抗体もしくはこれの特定変異体を生じさせる目的で使用可能であり、それらは、これらに限定するものでないが、免疫疾患もしくは病、心臓血管疾患もしくは病、感染、悪性および/または神経学的疾患または病気または他の公知もしくは特定のIL-6関連状態の中の少なくとも1つから選択した少なくとも1種のIL-6状態を診断、監視、調節、処置、改善、発生率阻止の補助または症状の軽減を測定または実施する目的で細胞、組織、器官または動物(哺乳動物およびヒトを包含)で使用可能である。

【0028】

前記方法は、そのような症状、影響または機構における修飾、処置、改善、予防または軽減を必要としている細胞、組織、器官、動物または患者に少なくとも1種の抗-IL-6抗体を含有させておいた組成物または製薬学的組成物を有効量で投与することを含んで成り得る。そのような有効量には、本明細書に記述するか或は関連技術で公知の如き公知方法を用いて実施および測定した時に1回(例えばボラス)、多数回または連続投与当たり約0.001から500mg/kgの量または1回、多数回または連続投与当たり血清濃度1ml当たり0.01-5000μgの血清中濃度が達成される量、またはそれらの中の有効な範囲または値のいずれも含まれ得る。

【0029】

本発明の抗体-産生および発生

本発明の少なくとも1種の抗-IL-6抗体を場合により本技術分野で良く知られている如き細胞系、混合細胞系、不死化細胞または不死化細胞のクローン集団を用いて産生させることができる。例えば下記を参照: Ausubel, 他編集、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook 他、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第2版、Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan 他編集、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan 他、Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001)。

【0030】

ヒトIL-6蛋白質またはこのフラグメントに特異的なヒト改変抗体を適切な免疫原性抗原、例えば単離IL-6蛋白質および/またはこれの一部(合成分子、例えば合成ペプチドを包含)に対して生じさせることができる。他の特定または一般的哺乳動物抗体も同様に生じさせることができる。免疫原性抗原の調製およびモノクローナルの産生は適切な技術のいずれかを用いて実施可能である。

【0031】

1つのアプローチでは、適切な不死化細胞系[例えば骨髓腫細胞系、例えばこれらに限定するものでないが、Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, L243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACTIV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMALWA, NEURO 2A など、またはヘテロミョーマ(heteromyelomas)、これの融合生成物、またはそれから生じさせた細胞または融合細胞のいずれも、または本技術分野で公知の如き他の適切な細胞系のいずれも含まれる](例えばwww.atcc.org, www.lifetech.com, などを参照)と抗体産生細胞、例えばこれらに限定するものでないが、単離

10

20

30

40

50

もしくはクローン化脾臓、抹消血液、リンパ液、扁桃腺または他の免疫もしくはB細胞含有細胞、または重もしくは軽鎖定常もしくは可変もしくはフレームワークもしくはCDR配列を発現する他の細胞のいずれかの融合を内因性もしくは異種核酸としてか、組換え型もしくは内因性ウイルス、細菌、藻、原核生物、両生類、昆虫、爬虫類、魚類、哺乳動物、齧歯類、ウマ、ウシ、ヤギ、ヒツジ、霊長類、真核生物、ゲノムDNA、cDNA、rDNA、ミトコンドリアDNAもしくはRNA、緑葉体DNAもしくはRNA、hnRNA、mRNA、tRNA、1本鎖、2本鎖もしくは3本鎖、雑種形成などまたはこれらの任意組み合わせのいずれかとして起こさせることでハイブリドーマを生じさせる。例えば、上記Ausubelおよび上記Colligan、Immunologyの2章(引用することによって全体が本明細書に組み入れられる)を参照のこと。

10

## 【0032】

抗体産生細胞を、また、興味を持たれる抗原を用いて免疫性を与えておいたヒトまたは他の適切な動物の抹消血または好適には脾臓またはリンパ節から得ることも可能である。また、本発明の抗体、これの特定フラグメントまたは変異体をコードする異種もしくは内因性核酸を発現させる目的で他の適切な宿主細胞のいずれかを用いることも可能である。融合させた細胞(ハイブリドーマ)または組換え型細胞を選択的培養条件または他の適切な公知方法を用いて単離した後、限界希釈方法または細胞選別または他の公知方法を用いてクローン化してもよい。所望特異性を示す抗体を産生する細胞を適切な検定(例えばELISA)で選択してもよい。

## 【0033】

20

また、ヒト以外またはヒトの抗体を改変またはヒト化する方法も使用可能であり、本技術分野で良く知られている。ヒト化もしくは改変抗体は、ヒト以外の源、例えばこれらに限定するものでないが、マウス、ラット、ウサギ、ヒト以外の霊長類または他の哺乳動物などに由来するアミノ酸残基を1個以上持ち得る。そのようなヒト以外のアミノ酸残基を「重要な」残基(典型的には公知ヒト配列の「重要な」可変、定常または他のドメインから取った)としばしば呼ぶ残基に置き換える。

## 【0034】

公知ヒトIg配列は例えば下記に開示されている：

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast; www.atcc.org/pha  
ge/hdb.html; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php; www.kabatdatabase.com/top.html; ftp.ncbi.nlm.nih.gov/repository/kabat; www.sc  
iquest.com; www.abcam.com; www.antibodyres  
ource.com/onlinecomp.html; www.public.ias  
tate.edu/~pedro/research\_tools.html; www.  
whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm  
; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab;  
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html  
; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html  
; www.immunologylink.com; pathbox.wustl.  
edu/~hcenter/index.html; www.appliedbiosys  
tems.com; www.nal.usda.gov/awic/pubs/anti  
body; www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa  
.html; www.biodesign.com; www.cancerresear  
chuk.org; www.biotech.ufl.edu; www.isac-ne  
t.org; baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.h  
tml; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.ed  
u; www.mrc-cpe.cam.ac.uk; www.ibt.unam.mx/  
vir/V\_mice.html; http://www.bioinf.org.u

30

40

50



k / a b s ; a n t i b o d y . b a t h . a c . u k ; w w w . u n i z h . c h ; w w w . c r y s t . b b k . a c . u k / ~ u b c g 0 7 s ; w w w . n i m r . m r c . a c . u k / C C / c c a e w g / c c a e w g . h t m l ; w w w . p a t h . c a m . a c . u k / ~ m r c 7 / h u m a n i s a t i o n / T A H H P . h t m l ; w w w . i b t . u n a m . m x / v i r / s t r u c t u r e / s t a t \_ a i m . h t m l ; w w w . b i o s c i . m i s s o u r i . e d u / s m i t h g p / i n d e x . h t m l ; w w w . j e r i n i . d e ; K a b a t 他、S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , U . S . D e p t . H e a l t h ( 1 9 8 3 ) ( 各々引用することによって全体が本明細書に組み入れられる)。

10

## 【0035】

そのような移入配列を用いて免疫原性を低下させるか或は結合、親和、オンレート (on-rate)、オフレート (off-rate)、親和性、特異性、半減期または本技術分野で公知の如き他の適切な特徴のいずれかを低下、向上または修飾することができる。一般的には、抗原の結合に影響を与えることに直接かつ最も実質的に関与しているのはCDR残基である。従って、ヒト以外またはヒトCDR配列の一部または全部を保持させながら可変もしくは定常領域のヒト以外の配列をヒトまたは他のアミノ酸と置き換えてもよい。

## 【0036】

また、場合により、抗体にヒト化または改変またはヒト抗体改変を抗原の高い親和性および他の好ましい生物学的特性を保持させながら受けさせることも可能である。そのような目的が達成されるように、場合により、親配列、改変配列およびヒト化配列の三次元モデルを用いて親配列およびいろいろな概念的ヒト化および改変産物を分析する方法を用いることでヒト化(またはヒト)または改変抗体を生じさせることも可能である。三次元免疫グロブリンモデルは一般に入手可能でありかつ本分野の技術者に良く知られている。選択した候補免疫グロブリン配列の可能性のある三次元立体配座構造を例示かつ表示するコンピュータプログラムを利用することができる。そのような表示を検査することで、当該残基が候補免疫グロブリン種の機能に関して果たす可能性のある役割を分析することができる、即ち候補免疫グロブリンがこれの抗原と結合する能力に影響を与える残基を分析することができる。このようにして、フレームワーク(FR)残基を選択しそしてコンセンサス配列および移入配列を用いて組み合わせることで必要な抗体特徴、例えば標的抗原1種または2種以上に対する親和性の向上などを達成することができる。

20

30

## 【0037】

加うるに、本発明のヒト改変IL-6抗体にヒト生殖細胞軽鎖フレームワークを含有させることも可能である。特定の態様では、そのような軽鎖生殖細胞配列をヒトVK配列から選択するが、そのようなVK配列には、これらに限定するものでないが、A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4, およびO8が含まれる。特定の態様では、そのような軽鎖ヒト生殖細胞フレームワークをV1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-2, V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4, およびV5-6から選択する。いろいろな生殖細胞配列の説明に関してはPCT WO 2005/005604を参照のこと。

40

## 【0038】

他の態様では、本発明のヒト改変IL-6抗体にヒト生殖細胞重鎖フレームワークを含

50

有させてもよい。特別な態様では、そのような重鎖ヒト生殖細胞フレームワークをVH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1, およびVH7-81から選択する。いろいろな生殖細胞配列の説明に関してはPCT WO 2005/005604を参照のこと。

10

#### 【0039】

特定の態様における軽鎖可変領域および/または重鎖可変領域はフレームワーク領域またはフレームワーク領域の少なくとも一部(例えば2または3個の小領域、例えばFR2およびFR3などを含有)を含んで成る。特定の態様において、少なくともFRL1、FRL2、FRL3またはFRL4は完全にヒトである。他の態様において、少なくともFRH1、FRH2、FRH3またはFRH4は完全にヒトである。いくつかの態様において、少なくともFRL1、FRL2、FRL3またはFRL4は生殖細胞配列(例えばヒト生殖細胞)であるか或は個々のフレームワーク用のヒトコンセンサス配列を含んで成る(この上に記述した公知ヒトIg配列の給源の所で容易に入手可能)。他の態様において、少なくともFRH1、FRH2、FRH3またはFRH4は生殖細胞配列(例えばヒト生殖細胞)であるか或は個々のフレームワーク用のヒトコンセンサス配列を含んで成る。好適な態様におけるフレームワーク領域はヒトフレームワーク領域(例えば以下の表13および14に示すヒトフレームワーク領域)である。いくつかの態様におけるフレームワーク領域は配列識別番号:105、106、107、108、109、110、111、112またはこれらの組み合わせを含んで成る。

20

#### 【0040】

本発明の抗体のヒト化もしくは改変は公知方法、例えばこれらに限定するものでないが、Winter(Jones 他、Nature 321:522(1986); Reichmann 他、Nature 332:323(1988); Verhoeyen 他、Science 239:1534(1988)), Sims 他、J. Immunol. 151:2296(1993); ChothiaおよびLesk, J. Mol. Biol. 196:901(1987), Carter 他、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285(1992); Presta 他、J. Immunol. 151:2623(1993), 米国特許第: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, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP229246, (各々引用することによって全体が本明細書に組み入れられ、それらに引用されている文献を包含)に記述されているそれらのいずれかを用いて実施可能である。

30

40

#### 【0041】

特定の態様における本抗体は改変(例えば変異)Fc領域を含んで成る。例えば、いくつかの態様では、本抗体が示すエフェクター機能が低下または向上するようにFc領域に改変を受けさせた。いくつかの態様におけるFc領域は、IgM、IgA、IgG、IgEまたは他のアイソタイプから選択したアイソタイプである。

#### 【0042】

別法としてか或は追加的に、アミノ酸修飾をIL-6結合分子のFc領域が示すC1q

50

結合および/または補体依存性細胞障害(CDC)機能を変える1種以上のさらなるアミノ酸修飾と組み合わせるのも有用であり得る。特に興味を持たれる出発ポリペプチドは、C1qと結合しかつ補体依存性細胞障害を示すポリペプチドであり得る。前以て存在するC1q結合活性を有するポリペプチドが場合によりCDCを調節する能力を更に持つようにそれに修飾を受けさせることでそのような活性の中の一方向または両方を向上させることができる。C1qを変えそして/またはその補体依存性細胞障害機能を修飾するアミノ酸修飾は例えばW0042072(これは引用することによって本明細書に組み入れられる)に記述されている。

#### 【0043】

この上で考察したように、本発明のヒト改変IL-6抗体のFc領域が改変エフェクター機能を持つようにデザインすることができ、例えばC1q結合および/またはFcR結合を修飾することでCDC活性および/またはADCC活性を変えることなどでデザインすることができる。「エフェクター機能」は、生物学的活性(例えばある被験体における)を活性化または低下させる責任を負っている。エフェクター機能の例には、これらに限定するものではないが、C1q結合、補体依存性細胞障害(CDC)、Fc受容体結合、抗体依存性細胞介在細胞障害(ADCC)、食作用、細胞表面受容体(例えばB細胞受容体、即ちBCR)の下方調節などが含まれる。そのようなエフェクター機能を持たせるには、Fc領域を結合ドメイン(例えば抗体可変ドメイン)と組み合わせる必要があり得、それをいろいろな検定(例えばFc結合検定、ADCC検定、CDC検定など)で検定することができる。

#### 【0044】

例えば、本ヒト改変IL-6抗体が向上したC1q結合および向上したFcRIII結合を示す(例えば向上したADCC活性と向上したCDC活性の両方を持つ)ように、その変異Fc領域を生じさせることができる。別法として、エフェクター機能を低下させるか或はなくす必要がある場合には、CDC活性が低下しそして/またはADCC活性が低下するように変異Fc領域に改変を受けさせることも可能である。他の態様では、そのような活性の中の一方向のみを向上させかつ場合によりまたもう一方の活性を低下させることも可能である(例えばADCC活性が向上しているがCDC活性が低下しているように改変されたFc領域そしてその逆のFc領域を生じさせる)。

#### 【0045】

また、Fc変異を改変に導入してそれらと新生児Fc受容体(FcRn)の相互作用を変えることで薬物動態特性を向上させることも可能である。FcRnとの結合が向上したヒトFc変異体の収集は記述されている(Shields他、(2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcRI, FcRII, FcRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcR, J. Biol. Chem. 276: 6591-6604)。

#### 【0046】

別の種類のアミノ酸置換を用いて、本ヒト改変IL-6抗体のFc領域が示すグリコシル化パターンを変える。Fc領域が示すグリコシル化は典型的にN-結合またはO-結合のいずれかである。N-結合は、炭水化物部分がアスパラギン残基の側鎖と結合することを指す。O-結合グリコシル化は、糖であるN-アセチルガラクトサミン、ガラクトースまたはキシロースの中の1つとヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはトレオニンの結合を指すが、また、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリシンを用いることも可能である。そのような炭水化物部分とアスパラギン側鎖ペプチド配列の酵素による結合を認識する配列はアスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニンであり、ここで、Xはプロリンを除くアミノ酸のいずれかである。従って、そのようなペプチド配列の中のいずれかがポリペプチドに存在すると潜在的グリコシル化部位が作り出される。

## 【0047】

そのグリコシル化パターンを変えようとする場合、例えばポリペプチドに存在するグリコシル化部位を1つ以上取り除きそして/またはポリペプチドに存在しないグリコシル化部位を1つ以上付加させることなどで変化させることができる。ヒト改変IL-6抗体のFc領域にグリコシル化部位を付加させようとする場合、便利には、そのアミノ酸配列が上述したトリペプチド配列(N-結合グリコシル化部位用の)を1つ以上含有するようにそれを変えることで付加を達成する。典型的なグリコシル化変異体では、重鎖の残基Asn 297のアミノ酸が置き換わっている。また、元々のポリペプチドの配列に1個以上のセリンまたはトレオニン残基(O-結合グリコシル化部位用の)を付加させるか或は置換させることでそのような改変を行うことも可能である。加うるに、Asn 297をAla 10

## 【0048】

特定の態様では、本発明のヒト改変IL-6抗体をベータ(1,4)-N-アセチルグルコサミンルトランスフェラーゼIII(GnT III)を発現する細胞の中で発現させることで、GnT IIIによってGlcNAcが本ヒト改変IL-6抗体に付加するようにする。そのような様式で抗体を生じさせる方法はWO/9954342, WO/03011878, 特許公開 20030003097A1, およびUmana 他, Nature Biotechnology, 17:176-180, 1999年2月に示されている。

## 【0049】

場合により、本明細書に記述しそして/または本技術分野で公知の如く、ヒト抗体のレパートリーをもたらし得る形質転換動物(例えばマウス、ラット、ハムスター、ヒト以外の霊長類など)に免疫性を与えることでヒト抗-IL-6抗体を生じさせることも可能である。ヒト抗-IL-6抗体を産生する細胞を前記動物から単離した後、適切な方法、例えば本明細書に記述する方法などを用いてそれを不死化させる。

## 【0050】

ヒト抗原と結合するヒト抗体のレパートリーをもたらし得る形質転換マウスを公知方法を用いて生じさせることができる[例えばこれらに限定するものでないが、Lonberg 他に発行された米国特許第5,770,428, 5,569,825, 5,545,806, 5,625,126, 5,625,825, 5,633,425, 5,661,016 および5,789,650 issued to Lonberg 他, Jakobovits 他, WO 98/50433, Jakobovits 他, WO 98/24893, Lonberg 他, WO 98/24884, Lonberg 他, WO 97/13852, Lonberg 他, WO 94/25585, Kucherlapate 他, WO 96/34096, Kucherlapate 他, EP 0463151 B1, Kucherlapate 他, EP 0710719 A1, Surani 他, 米国特許第5,545,807, Bruggemann 他, WO 90/04036, Bruggemann 他, EP 0438474 B1, Lonberg 他, EP 0814259 A2, Lonberg 他, GB 2272440 A, Lonberg 他, Nature 368:856-859(1994), Taylor 他, Int. Immunol. 6(4):579-591(1994), Green 他, Nature Genetics 7:13-21(1994), Mendez 他, Nature Genetics 15:146-156(1997), Taylor 他, Nucleic Acids Research 20(23):6287-6295(1992), Tuailon 他, Proc Natl Acad Sci USA 90(8):3720-3724(1993), Lonberg 他, Int Rev Immunol 13(1):65-93(1995) および Fishwald 他, Nat Biotechnol 14(7):845-851(1996), (これらは各々引用することによって全体が本明細書に組み入れられる)]。

## 【0051】

10

20

30

40

50

一般に、そのようなマウスは、少なくとも1種のヒト免疫グロブリン遺伝子座に由来するDNAを含んで成る少なくとも1種のトランス遺伝子を含有し、それを機能的に再配列させるか或はそれに機能的再配列を受けさせてもよい。そのようなマウスでは、内因性免疫グロブリン遺伝子座が崩壊または欠如していることで、その動物の内因性遺伝子がコードする抗体を産生する能力が消失している。

#### 【0052】

同様な蛋白質またはフラグメントと特異的に結合する抗体を選別しようとする場合、便利には、ペプチド提示ライブラリーを用いてそれを達成することができる。このような方法は、大きなペプチド集団に選別を所望の機能または構造を有する個々の員に関して受けさせることを伴う。ペプチド提示ライブラリーの抗体選別は本技術分野で良く知られている。その提示させるペプチド配列は長さがアミノ酸3から5000個分以上、しばしば長さがアミノ酸5 - 100個分、しばしば長さがアミノ酸約8から25個分であり得る。ペプチドライブラリーを生じさせるに適した直接化学的合成方法に加えて、組換え型DNA方法がいくつか記述された。1つの種類の方法は、ペプチド配列をバクテリオファージもしくは細胞の表面に提示させることを伴う方法である。バクテリオファージまたは細胞は各々が個々の提示ペプチド配列をコードするヌクレオチド配列を含有する。そのような方法はPCT特許公開番号91/17271、91/18980、91/19818および93/08278に記述されている。

#### 【0053】

ペプチドのライブラリーを生じさせる他のシステムは、インビトロ化学的合成と組換え方法の両方の面を有する。PCT特許公開番号92/05258、92/14843および96/19256を参照。また、米国特許第5,658,754号および5,643,768号も参照のこと。ペプチド提示ライブラリー、ベクターおよび選別用キットはInvitrogen (Carlsbad, CA) およびCambridge Antibody Technology (Cambridgeshire, UK) の如き供給業者から商業的に入手可能である。例えばEnzonに譲渡された米国特許第4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456、Dyaxに譲渡された5223409、5403484、5571698、5837500、Affymaxに譲渡された5427908、5580717、Cambridge Antibody Technologyに譲渡された5885793、Genentechに譲渡された5750373、Xomaに譲渡された5618920、5595898、5576195、5698435、5693493、5698417、上記Colligan、上記Ausubelまたは上記Sambrookを参照のこと。また、少なくとも1種の抗-IL-6抗体をコードする核酸を用いて、そのような抗体を乳の中に産生するように遺伝子が導入された動物もしくは哺乳動物、例えばヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジ、ウサギなどがもたらされるようにすることも本発明の抗体を生じさせることができる。公知方法を用いてそのような動物を生じさせることができる。例えば、これらに限定するものでないが、米国特許第5,827,690; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616; 5,565,362; 5,304,489など(これらは各々引用することによって全体が本明細書に組み入れられる)を参照のこと。

#### 【0054】

加うるに、少なくとも1種の抗-IL-6抗体をコードする核酸を用いて、そのような抗体、特定部分または変異体をこれらを用いて培養した植物部分または細胞の中にもたらず形質転換植物を生じさせそして植物細胞(例えばこれらに限定するものでないが、タバコおよびトウモロコシ)を培養することでも、本発明の抗体を生じさせることができる。非限定例として、組換え型蛋白質を発現する形質転換タバコ葉を用いて組換え型蛋白質を成功裏に多量に生じさせることが行われ、例えば誘導プロモーターを用いることなどで行われた。例えばCramer他、Curr. Top. Microbiol. Immunol

10

20

30

40

50

. 240:95-118 (1999) およびそこに引用されている文献を参照のこと。また、哺乳動物の蛋白質を商業的生産濃度で発現する形質転換トウモロコシも用いられ、その生物学的活性は他の組換えシステムで生産されたそれまたは天然源から精製されたそれに相当する。例えば Hood 他、Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-149 (1999) およびそれに引用されている文献を参照のこと。また、抗体フラグメント、例えば 1 本鎖抗体 (scFv) などを含む形質転換植物の種 (タバコの種およびジャガイモの塊茎を包含) を用いて抗体を多量に生じさせることも行われた。例えば Conrad 他、Plant Mol. Biol. 38:101-109 (1998) およびそこに引用されている文献を参照のこと。このように、また、形質転換植物を公知方法に従って用いることで本発明の抗体を生じさせることも可能である。また、例えば Fische 他、Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108 (Oct., 1999), Ma 他、Trends Biotechnol. 13:522-7 (1995); Ma 他、Plant Physiol. 109:341-6 (1995); Whitelam 他、Biochem. Soc. Trans. 22:940-944 (1994); およびそれらに引用されている文献も参照のこと。

#### 【0055】

本発明の抗体はヒト IL-6 と幅広い範囲の親和力 ( $K_D$ ) で結合し得る。好適な態様において、場合により、本発明の少なくとも 1 種のヒト mAb はヒト IL-6 と高い親和力で結合し得る。例えば、ヒトもしくはヒト改変 mAb はヒト IL-6 と約  $10^{-7}$  M に等しいか或はそれ以下の  $K_D$  [例えばこれらに限定するものでないが、 $0.1-9.9$  (またはこれの中のいずれかの範囲または値)  $\times 10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$ 、 $10^{-12}$ 、 $10^{-13}$ 、 $10^{-14}$ 、 $10^{-15}$  またはこれの中のいずれかの範囲または値 (本分野の技術者が実施する如き表面プラズモン共鳴または Kinexa 方法で測定した時)] で結合し得る。

#### 【0056】

ある抗体がある抗原に対して示す親和力または親和性は適切な方法のいずれかを用いて実験的に測定可能である [例えば Berzofsky, 他、"Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E. 編集、Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); および本明細書に記述する方法を参照]。個々の抗体-抗原相互作用の測定親和力は測定条件 (例えば塩の濃度、pH) が異なると変わる可能性がある。従って、親和力および他の抗原結合パラメーター (例えば  $K_D$ 、 $K_{on}$ 、 $K_{off}$ ) の測定を好適には抗体および抗原の標準溶液および標準緩衝液、例えば本明細書に記述する緩衝液などを用いて実施する。

#### 【0057】

IL-6 との結合に関して本発明の抗体と一緒にどの蛋白質、抗体および他のアンタゴニストが競合しそして / または エピトープ領域を共有するかを測定する目的で、本発明の抗体を用いた競合検定を実施してもよい。そのような検定は本分野の通常技術者に良く知られており、ある蛋白質が有する限られた数の結合部位に関して示すアンタゴニストまたはリガンド間の競合を評価するものである。競合前または後に蛋白質および / または抗体を固定または不溶にしそして IL-6 と結合したサンプルを結合しなかったサンプルから分離、例えば傾斜法 (蛋白質 / 抗体を前以て不溶にしておいた場合) または遠心分離 (蛋白質 / 抗体が競合反応後に沈澱する場合) などで分離する。また、抗体と蛋白質が結合するか或は結合しないことによって機能が変化するか否か、例えば抗体分子が例えば標識の酵素による活性を抑制するか或は促進させるかなどによって、競合的結合を決定することも可能である。本技術分野で良く知られている如き ELISA および他の機能的検定を用いてもよい。

#### 【0058】

本発明の好適な抗-IL-6 抗体は以下の表 1-5 および 12-14 に示す配列を有す

る。例えば、本発明の抗 - I L - 6 抗体は、表 1 に示す軽鎖 C D R 配列 ( 即ち、C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 ) の中の 1 つおよび表 2 に示す重鎖 C D R 配列 ( 即ち、C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 ) の中の 1 つを有する。より具体的には、抗 - I L - 6 抗体 ( 分子 A M E - A 9 ) は、配列識別番号 : 1 5 の C D R L 1、配列識別番号 : 2 7 の C D R L 2、配列識別番号 : 3 5 の C D R L 3、配列識別番号 : 4 7 の C D R H 1、配列識別番号 : 6 1 の C D R H 2、配列識別番号 : 9 1 の C D R H 3 を有する。

#### 【 0 0 5 9 】

##### 核酸分子

本明細書に示す情報を用いることで、本明細書に記述する方法を用いるか或は本技術分野で公知のようにして、例えば、本明細書に開示する他の配列の中で配列識別番号 : 9 3、9 7 および 1 0 1 の軽鎖可変領域の中の少なくとも 1 つと本明細書に開示する他の配列の中で配列識別番号 : 9 5、9 9 および 1 0 3 の重鎖可変領域の中の少なくとも 1 つから成る連続したアミノ酸の少なくとも 7 0 - 1 0 0 % をコードするヌクレオチド配列、これの特定フラグメント、変異体またはコンセンサス配列、またはそのような配列の中の少なくとも 1 つ含有して成る寄託ベクター ( deposited vector )、少なくとも 1 種の抗 - I L - 6 抗体をコードする本発明の核酸分子などを得ることができる。

#### 【 0 0 6 0 】

本発明の核酸分子は、R N A、例えば m R N A、h n R N A、t R N A などの形態または他のいずれかの形態であり得るか、或は D N A ( これらに限定するものでないが、クローン化で得ることができるか或は合成で生じさせることができる c D N A およびゲノム D N A が含まれる ) の形態、またはこれらの任意組み合わせであり得る。そのような D N A は 3 本鎖、2 本鎖または 1 本鎖またはこれらの任意組み合わせであり得る。そのような D N A または R N A の中の少なくとも 1 本の鎖のいずれかの部分はコード鎖 ( またセンス鎖としても知られる ) であってもよい、或はそれは非コード鎖 ( またアンチセンス鎖とも呼ばれる ) であってもよい。

#### 【 0 0 6 1 】

本発明の単離核酸分子には、本明細書に記述しそして / または本技術分野で公知の如く、オープンリーディングフレーム ( O R F ) を場合により 1 種以上のイントロン、例えばこれらに限定するものでないが、少なくとも 1 つの重鎖 ( 例えば配列識別番号 : 3 8、4 0、4 2、4 4 など ) または軽鎖 ( 例えば配列識別番号 : 2、4、6、8 など ) の少なくとも 1 つの C D R、例えば C D R 1、C D R 2 および / または C D R 3 などの少なくとも 1 種の特定物を含んで成る核酸分子 ; 抗 - I L - 6 抗体または可変領域 ( 例えば本明細書に開示する他の配列の中で配列識別番号 : 9 4、9 8 および 1 0 2 の軽鎖可変領域および配列識別番号 : 9 6、1 0 0 および 1 0 4 の重鎖可変領域など ) のコード配列を含んで成る核酸分子 ; およびこの上に記述したヌクレオチド配列とは実質的に異なるヌクレオチド配列を含有するが遺伝子コードが縮重していることが理由でまだ少なくとも 1 種の抗 - I L - 6 抗体をコードする核酸分子が含まれ得る。勿論、遺伝子コードは本技術分野で良く知られている。従って、本発明の特定の抗 - I L - 6 抗体をコードするそのような縮重核酸変異体を生じさせることは本分野の技術者にとって常規のことである。例えば、上記 A u s u b e 1 他が参考になり、そしてそのような核酸変異体も本発明に含まれる。

#### 【 0 0 6 2 】

本明細書に示すように、抗 - I L - 6 抗体をコードする核酸を含んで成る本発明の核酸分子には、これらに限定するものでないが、抗体フラグメントのアミノ酸配列をコードする核酸自身 ; その抗体全体またはこれの一部のコード配列 ; 抗体、フラグメントまたは蛋白質のコード配列ばかりでなく追加的配列、例えば少なくとも 1 種のシグナルリーダーもしくは融合ペプチドのコード配列 [ これは、追加的非コード配列 ( これらに限定するものでないが、非コード 5 ' および 3 ' 配列を包含 )、例えば転写、m R N A プロセシング ( スプライシングおよびポリアデニル化シグナルを包含 ) である役割 ( 例えはりボソーム結合および m R N A の安定性 ) を果たす転写された非翻訳配列と一緒に上述した追加的コード配列、例えば少なくとも 1 種のイントロンなどを伴うか或は伴わない ] ; 追加的アミノ

10

20

30

40

50

酸、例えば追加的機能を与えるアミノ酸などをコードする追加的コード配列が含まれ得る。従って、抗体をコードする配列をマーカー配列、例えば抗体のフラグメントまたは部分を含んで成る融合抗体の精製を容易にするペプチドをコードする配列などと融合させることも可能である。

#### 【0063】

本明細書に記述する如きポリヌクレオチドと選択的にハイブリダイズするポリヌクレオチド

本発明は、本明細書に開示するポリヌクレオチドと選択的ハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズする単離核酸を提供する。従って、この態様のポリヌクレオチドを用いて、そのようなポリヌクレオチドを含有して成る核酸を単離、検出および/または量化することができる。例えば、本発明のポリヌクレオチドを用いて、寄託ライブラリーの中の部分的または全長クローンを同定、単離または増幅することができる。いくつかの態様におけるポリヌクレオチドは、ヒトまたは哺乳動物の核酸ライブラリーから単離したゲノムもしくはcDNA配列または他の様式でcDNAと相補的なそれらである。

#### 【0064】

そのようなcDNAライブラリーは、好適には、全長配列の少なくとも80%、好適には全長配列の少なくとも85%または90%、より好適には全長配列の少なくとも95%を含有する。そのcDNAライブラリーに標準化を受けさせることで稀な配列の発現量を増加させることも可能である。相補的配列に比べて配列同一性が低い配列を用いる時には、排他的ではないが典型的に、ストリンジェンシーが低いか或は中程度のハイブリダイゼーション条件を用いる。同一性がより高い配列の場合には、場合により、ストリンジェンシーが中程度および高い条件を用いてもよい。低いストリンジェント条件を用いると、配列同一性が約70%の配列の選択的ハイブリダイズを起こさせることが可能になり、それを用いて、オーソログまたはパラログ配列を識別することができる。

#### 【0065】

場合により、本発明のポリヌクレオチドが本明細書に記述するポリヌクレオチドがコードする抗体の少なくとも一部をコードするようにしてもよい。本発明のポリヌクレオチドには、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドと選択的にハイブリダイズさせる目的で使用可能な核酸配列が含まれる。例えば上記Ausubel、上記Colligan(これらは各々引用することによって全体が本明細書に組み入れられる)を参照のこと。

#### 【0066】

##### 核酸の構築

本発明の単離核酸の構築は、本技術分野で良く知られている如き(a)組換え方法、(b)合成技術、(c)精製技術および/または(d)これらの組み合わせを用いて実施可能である。

#### 【0067】

本核酸に本発明のポリヌクレオチドに加えて便利な配列を含有させることも可能である。例えば、エンドヌクラーゼ制限部位を1個以上含んで成るマルチクローン化部位(multi-cloning sites)を本核酸に挿入することで本ポリヌクレオチドの単離に役立たせることも可能である。また、翻訳可能配列を挿入させることで本発明の翻訳されたポリヌクレオチドの単離に役立たせることも可能である。例えば、ヘキサ-ヒスチジンマーカー配列は本発明の蛋白質を精製する便利な手段を与える。本発明の核酸(コード配列を除く)は場合により本発明のポリヌクレオチドをクローン化および/または発現させるためのベクター、アダプターまたはリンカーであってもよい。

#### 【0068】

そのようなクローン化および/または発現用配列がクローン化および/または発現で果たす機能を最適にするか、本ポリヌクレオチドの単離を補助するか、或は本ポリヌクレオチドを細胞に導入する時の導入を向上させる追加的配列を付加させることも可能である。クローン化用ベクター、発現用ベクター、アダプターおよびリンカーの使用は本技術分野で良く知られている(例えば上記Ausubelまたは上記Sambrookを参照のこと)

10

20

30

40

50



と)。

【0069】

核酸を構築するに適した組換え方法

本分野の技術者に公知のいろいろなクローン化方法のいずれかを用いることで本発明の単離核酸組成物、例えばRNA、cDNA、ゲノムDNAまたはこれらの任意組み合わせを生物学的源から得ることができる。いくつかの態様では、本発明のポリヌクレオチドと緊縮条件下で選択的に雑種形成するオリゴヌクレオチドプローブを用いてcDNAまたはゲノムDNAライブラリーの中の所望配列を同定する。RNAの単離およびcDNAおよびゲノムライブラリーの構築は本分野の通常の技術者に良く知られている(例えば上記A us u b e lまたは上記S a m b r o o kを参照のこと)。

10

【0070】

核酸の選別および単離方法

本発明のポリヌクレオチドの配列、例えば本明細書に開示する如き配列などが基になったプローブを用いてcDNAまたはゲノムライブラリーに選別を受けさせることができる。同じまたは異なる有機体の中に入っている相同遺伝子を単離する目的でゲノムDNAまたはcDNA配列とハイブリダイズするプローブを用いることができる。本分野の技術者は、そのような検定でいろいろなストリンジェント条件下のハイブリダイゼーションを用いることができ、かつハイブリッド形成もしくは洗浄用媒体のいずれかがストリンジェントであってもよいことを理解するであろう。ハイブリッド形成条件のストリンジェンシーが高くなるにつれて、プローブと二重鎖形成標的の間に存在する相補度をより高くすべきである。温度、イオン濃度、pHおよび部分変性溶媒、例えばホルムアミドなどの存在の中の1種以上を用いてストリンジェンシーを制御することができる。例えば、便利には、反応体溶液の極性を例えばホルムアミドの濃度が0%から50%の範囲内になるように操作することなどで変えることでハイブリダイゼーションのストリンジェンシーを変える。結合が検出可能であるに必要な相補度(配列同一性)はハイブリッド形成用媒体および/または洗浄用媒体のストリンジェンシーに応じて変わるであろう。相補度は最適には100%または70-100%またはこれの中のいずれかの範囲または値であろう。しかしながら、プローブとプライマーの配列が若干異なる場合にはハイブリッド形成および/または洗浄用媒体のストリンジェンシーを低下させることでそれを補うことができると理解されるべきである。

20

30

【0071】

RNAまたはDNAを増幅させる方法は本技術分野で良く知られており、それを本明細書に示す教示および指針を基にして過度な実験を行うことなく本発明に従って用いることができる。

【0072】

公知のDNAもしくはRNA増幅方法には、これらに限定するものでないが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)および関連増幅方法[例えばM u l l i s他の米国特許第4,683,195号、4,683,202号、4,800,159号、4,965,188号、T a b o r他の米国特許第4,795,699号およびお4,921,794号、I n n i sの米国特許第5,142,033号、W i l s o n他の米国特許第5,122,464号、I n n i sの米国特許第5,091,310号、G y l l e n s t e n他の米国特許第5,066,584号、G e l f a n d他の米国特許第4,889,818号、S i l v e r他の米国特許第4,994,370号、B i s w a sの米国特許第4,766,067号、R i n g o l dの米国特許第4,656,134号を参照]、および2本鎖DNA合成の鋳型として標的配列に対するアンチセンスRNAを用いるRNA媒介増幅(M a l e k他の米国特許第5,130,238号、商標N A S B A)(これらの文献の内容は全体が引用することによって本明細書に組み入れられる)(例えば上記A u s u b e lまたは上記S a m b r o o kを参照のこと)が含まれる。

40

【0073】

例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術を用いて本発明のポリヌクレオチドの配

50

列および関連遺伝子をゲノムDNAまたはcDNAライブラリーから直接増幅させることができる。また、PCRおよび他のインビトロ増幅方法も有用であり、例えば発現させるべき蛋白質をコードする核酸配列をクローン化する方法、サンプルの中に入っている所望mRNAの存在を検出する目的、核酸の配列を決定する目的または他の目的のプローブとして用いる核酸を生じさせる方法なども有用であり得る。技術者をインビトロ増幅方法に導くに十分な技術の例が上記Berger、上記Sambrookおよび上記AusubelばかりでなくMullis他の米国特許第4,683,202号(1987)およびInnis他のPCR Protocols A Guide to Methods and Applications、Academic Press Inc.編集、San Diego、CA(1990)に見られる。ゲノムPCR増幅用市販キットは本技術分野で公知である。例えばAvantage-GC Genomic PCT Kit (Clontech)を参照のこと。加うるに、長鎖PCR産物の収率を向上させる目的で例えばT4遺伝子32蛋白質(Boehringer Mannheim)を用いることも可能である。

10

#### 【0074】

##### 核酸を構築するに適した合成方法

本発明の単離核酸の調製をまた公知方法による直接的化学合成で実施することも可能である(例えば上記Ausubelを参照のこと)。化学的合成では一般に1本鎖オリゴヌクレオチドがもたらされ、これを相補的配列と雑種形成させるか或は1本鎖を鋳型として用いたDNAポリメラーゼによる重合で2本鎖DNAに変化させることができる。本分野の技術者は、DNAの化学的合成は塩基数が約100またはそれ以上の配列に制限され得るが、より短い配列を連結させることでより長い配列を得ることも可能であることを理解するであろう。

20

#### 【0075】

##### 組換え型発現カセット

本発明は、更に、本発明の核酸を含有して成る組換え型発現カセットも提供する。本発明の抗体をコードする本発明の核酸配列、例えばcDNAまたはゲノム配列などを用いて、少なくとも1種の所望宿主細胞の中に導入することができる組換え型発現カセットを構築することができる。組換え型発現カセットは、典型的に、意図した宿主細胞の中で起こさせる本ポリヌクレオチドの転写を指図する転写開始調節配列と機能的に連結している本発明のポリヌクレオチドを含んで成る。本発明の核酸の発現を指図する目的で異種プロモーターおよび異種ではない(即ち内因性)プロモーターの両方を用いることができる。

30

#### 【0076】

いくつかの態様では、プロモーター、エンハンサーまたは他の要素として働く単離核酸を異種ではない形態の本発明のポリヌクレオチドの適切な場所(イントロンの上流、下流または中)に導入することで本発明のポリヌクレオチドの発現を上方または下方調節することも可能である。例えば、内因性プロモーターに変異、欠如および/または置換による改変をインビボまたはインビトロで受けさせてもよい。

#### 【0077】

##### ベクターおよび宿主細胞

本発明は、また、本発明の単離核酸分子を含有させたベクター、本組換え型ベクターを用いて遺伝的に改変を受けさせた宿主細胞、および本技術分野で良く知られている如き組換え技術を用いて少なくとも1種の抗-IL-6抗体を生じさせることにも関する。例えば上記Sambrook他、上記Ausubel他(各々引用することによって全体が本明細書に組み入れられる)を参照のこと。

40

#### 【0078】

本ポリヌクレオチドを場合により選択可能マーカ含有ベクターと連結させて宿主の中で増殖させてもよい。一般的には、プラスミドベクターを沈澱物、例えば磷酸カルシウム沈澱物などまたは帯電脂質との複合体の中に導入する。当該ベクターがウイルスの場合、適切なパッケージング細胞株を用いてそれにパッケージングをインビトロで受けさせた後

50

、宿主細胞の中に形質導入してもよい。

【 0 0 7 9 】

D N A 挿入断片と適切なプロモーターを動作可能なように連結させておくべきである。その発現構築物に更に転写開始部位および終止部位も含有させ、そして転写された領域の中に翻訳用リボソーム結合部位も含有させる。そのような構築物が発現する成熟した転写物のコード部分に好適には翻訳されるべき m R N A の開始部分の所に適切に位置する翻訳開始コドンおよびその末端部の所に適切に位置する終止コドン [ 例えば U A A 、 U G A または U A G ( 哺乳動物または真核細胞発現の場合には U A A および U A G が好適である ) ] を含有するようにする。

【 0 0 8 0 】

場合によるが好適には、発現ベクターに少なくとも 1 種の選択可能マーカーを含有させる。そのようなマーカーには、例えばこれらに限定するものでないが、真核細胞を培養する場合のメトトレキサート ( M T X ) 、ジヒドロホレート還元酵素 ( D H F R 、 米国特許第 4 , 3 9 9 , 2 1 6 ; 4 , 6 3 4 , 6 6 5 ; 4 , 6 5 6 , 1 3 4 ; 4 , 9 5 6 , 2 8 8 ; 5 , 1 4 9 , 6 3 6 ; 5 , 1 7 9 , 0 1 7 ) 、アンピシリン、ネオマイシン ( G 4 1 8 ) 、ミコフェノール酸またはグルタミン合成酵素 ( G S 、 米国特許第 5 , 1 2 2 , 4 6 4 号、 5 , 7 7 0 , 3 5 9 号、 5 , 9 2 7 , 7 3 9 号 ) 耐性遺伝子、そして大腸菌および他の細菌または原核細胞を培養する場合のテトラシクリンまたはアンピシリン耐性遺伝子などが含まれる ( 前記特許は引用することによって全体が本明細書に組み入れられる ) 。上述した宿主細胞用の適切な培養培地および条件は本技術分野で公知である。適切なベクターが本分野の技術者に容易に明らかになるであろう。宿主細胞へのベクター構築物の導入はリン酸カルシウムトランスフェクション、D E A E - デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染または他の公知方法を用いて実施可能である。そのような方法は本技術分野、例えば上記 S a m b r o o k の 1 - 4 章および 1 6 - 1 8 章、上記 A u s u b e l の 1 、 9 、 1 3 、 1 5 、 1 6 章などに記述されている。

【 0 0 8 1 】

本発明の少なくとも 1 種の抗体を修飾形態、例えば融合蛋白質などとして発現させることも可能であり、それに分泌シグナルばかりでなくまた追加的異種機能領域を含有させることも可能である。例えば、追加的アミノ酸、特に帯電しているアミノ酸などの領域を抗体の N 末端に付加させることで、精製または次の取り扱いおよび貯蔵中にそれが宿主細胞内で示す安定性および持続性を向上させることも可能である。また、精製を容易にするペプチド部分を本発明の抗体に付加させることも可能である。そのような領域を抗体またはこれの少なくとも 1 つのフラグメントを最終的に調製する前に除去しておくことも可能である。そのような方法は数多くの標準的実験マニュアル、例えば上記 S a m b r o o k の 1 7 . 2 9 - 1 7 . 4 2 章および 1 8 . 1 - 1 8 . 7 4 章、上記 A u s u b e l の 1 6 、 1 7 および 1 8 章などに記述されている。

【 0 0 8 2 】

本分野の通常の技術者は、本発明の蛋白質をコードする核酸の発現で利用可能な数多くの発現系を認識するであろう。別法として、本発明の核酸の発現を本発明の抗体をコードする内因性 D N A を含有する宿主細胞の中でターンオン ( t u r n i n g o n ) ( 操作 ) することで宿主細胞の中で起こさせることも可能である。そのような方法は例えば米国特許第 5 , 5 8 0 , 7 3 4 号、 5 , 6 4 1 , 6 7 0 号、 5 , 7 3 3 , 7 4 6 号および 5 , 7 3 3 , 7 6 1 号 ( これらは引用することによって全体が本明細書に組み入れられる ) に記述されているように本技術分野で良く知られている。

【 0 0 8 3 】

本抗体、これの特定部分または変異体を産生させるに有用な細胞培養物の例は哺乳動物の細胞である。哺乳動物の細胞系はしばしば単層形態の細胞であるが、また、哺乳動物の細胞の懸濁液またはバイオリアクターを用いることも可能である。無傷のグリコシル化蛋白質を発現し得る適切な宿主細胞系が本技術分野で数多く開発され、それらには、C O S

10

20

30

40

50

- 1 (例えば、ATCC CRL 1650), COS-7 (例えば、ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (例えば、ATCC CRL-10), CHO (例えば、ATCC CRL 1610) および BSC-1 (例えば、ATCC CRL-26) 細胞株、Cos-7 細胞、CHO 細胞、hep G2 細胞、P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, 293 細胞、HeLa 細胞などが含まれ、これらは例えば American Type Culture Collection、Manassas、Va (www.atcc.org) などから容易に入手可能である。好適な宿主細胞には、リンパ系起源の細胞、例えば骨髄腫およびリンパ腫細胞などが含まれる。特に好適な宿主細胞は、P3X63Ag8.653 細胞 (ATCC Accession Number CRL-1580) および SP2/0-Ag14 細胞 (ATCC Accession Number CRL-1851) が含まれる。特に好適な態様における組換え型細胞は P3X63Ag8.653 または SP2/0-Ag14 細胞である。

10

#### 【0084】

そのような細胞用の発現ベクターに下記の発現制御配列、例えばこれらに限定するものでないが、複製起点；プロモーター [例えば後期もしくは早期 SV40 プロモーター、CMV プロモーター (米国特許第 5,168,062 号、5,385,839 号)、HSV tk プロモーター、pgk (ホスホグリセレートキナーゼ) プロモーター、EF-1 アルファ プロモーター (米国特許第 5,266,491 号)、少なくとも 1 種のヒト免疫グロブリン プロモーター；エンハンサー および / または プロセッシング情報部位、例えば リボソーム結合部位、RNA スプライス部位、ポリアデニル化部位 (例えば SV40 ラージ T Ag ポリ A 付加部位)、および転写終了配列などの中のもの 1 つ以上を含有させてもよい。例えば上記 Ausubel 他、上記 Sambrook 他を参照。本発明の核酸または蛋白質の産生で用いるに有用な他の細胞も公知でありそして / または入手可能、例えば American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (www.atcc.org) または他の公知もしくは商業源から入手可能である。

20

#### 【0085】

真核宿主細胞を用いる場合、典型的には、ポリアデニル化または転写終了配列をベクターの中に取り込ませる。終了配列の一例はウシ成長ホルモン遺伝子に由来するポリアデニル化配列である。また、転写物の正確なスプライシングを起こさせる配列を含めることも可能である。スプライシング配列の一例は SV40 に由来する VP1 イントロンである [Sprague 他、J. Virol. 45:773-781 (1983)]。加うるに、本技術分野で公知のように、宿主細胞の中で起こる複製を制御する遺伝子配列をベクターの中に取り込ませることも可能である。

30

#### 【0086】

##### 抗体の精製

抗-IL-6 抗体を良く知られた方法で組換え型細胞培養物から回収して精製することができるが、そのような方法には、これらに限定するものでないが、蛋白質 A による精製、硫酸アンモニウムもしくはエタノールによる沈澱、酸による抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーなどが含まれる。また、高性能液クロ (「HPLC」) を精製で用いることも可能である。例えば Colligan, Current Protocols in Immunology または Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001) の例えば 1、4、6、8、9、10 章 (各々引用することによって全体が本明細書に組み入れられる)などを参照のこと。

40

#### 【0087】

本発明の抗体には、天然精製生成物、化学合成手順の生成物および真核宿主 (例えば酵母菌、高等植物、昆虫および哺乳動物の細胞を包含) を用いた組換え技術で生じさせた生

50

成物が含まれる。組換え産生手順で用いる宿主に応じて、本発明の抗体にグリコシル化を受けさせてもよいが或はグリコシル化を受けさせなくてもよいが、グリコシル化を受けさせるのが好適である。そのような方法は数多くの標準的実験マニュアルに記述されており、例えば上記 Sambrook の 17.37 - 17.42 章、上記 Ausubel の 10、12、13、16、18 および 20 章、上記 Colligan、Protein Science の 12 - 14 章（これらは全部引用することによって全体が本明細書に組み入れられる）などに記述されている。

【0088】

抗 - IL - 6 抗体

本発明に従う抗 - IL - 6 抗体には、免疫グロブリン分子の少なくとも一部、例えばこれらに限定するものでないが、少なくとも 1 つのリガンド結合部分 (LBP)、例えばこれらに限定するものでないが、重もしくは軽鎖の相補性決定領域 (CDR) またはそのリガンド結合部分、重鎖もしくは軽鎖可変領域、フレームワーク領域 (例えば FR1、FR2、FR3、FR4 またはこれらのフラグメント、または配列識別番号: 105 - 112 に示す如き領域、更に場合により少なくとも 1 種の置換、挿入または欠失を含んで成っているもよい)、重鎖もしくは軽鎖定常領域 (例えば少なくとも 1 つの CH1、ヒンジ1、ヒンジ2、ヒンジ3、ヒンジ4、CH2 または CH3、またはこれらのフラグメントを含んで成り、更に場合により少なくとも 1 種の置換、挿入または欠失を含んで成っているもよい)、またはこれらのいずれかの部分 (これらを本発明の抗体の中に組み込むことができる) を含んで成る蛋白質もしくはペプチド含有分子のいずれも含まれる。本発明の抗体には、いずれかの哺乳動物、例えばこれらに限定するものでないが、ヒト、マウス、ウサギ、ラット、齧歯類、霊長類またはこれらの任意組み合わせなどの抗体またはそれらに由来する抗体が含まれる。

【0089】

本発明の単離抗体は、適切なポリヌクレオチドのいずれかまたは単離もしくは調製抗体のいずれかがコードする本明細書に開示する抗体アミノ酸配列を含んで成る。好適には、本ヒト抗体もしくは抗原結合フラグメントはヒト IL - 6 と結合することで、その蛋白質が示す少なくとも 1 種の生物学的活性をある程度または実質的に中和する。少なくとも 1 種の IL - 6 蛋白質もしくはフラグメントが示す少なくとも 1 種の生物学的活性をある程度または好適には実質的に中和する抗体またはこれの特定部分または変異体は、その蛋白質またはフラグメントと結合することで IL - 6 と IL - 6 受容体の結合が介在するか或は IL - 6 に依存するか或はそれが介在する他の機構による活性を抑制する。本明細書で用いる如き用語「中和抗体」は、IL - 6 依存活性を検定に応じて約 20 - 120%、好適には少なくとも約 10、20、30、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100% またはそれ以上抑制し得る抗体を指す。抗 - IL - 6 抗体が IL - 6 依存活性を抑制する能力の検定を好適には本明細書に記述しそして / または本技術分野で公知の如き少なくとも 1 種の適切な IL - 6 蛋白質もしくは受容体検定で実施する。本発明のヒト抗体は、如何なる種類 (IgG、IgA、IgM、IgE、IgD など) またはアイソタイプであってもよく、カッパもしくはラムダ軽鎖を含んで成り得る。1 つの態様における本ヒト抗体は IgG 重鎖もしくは限定フラグメント、例えばアイソタイプ、IgG1、IgG2、IgG3 または IgG4 (例えば 1、2、3 または 4) の中の少なくとも 1 つを含んで成る。この種類の抗体の調製は、本明細書に記述しそして / または本技術分野で公知の如き少なくとも 1 つのヒト軽鎖 (例えば IgG、IgA および IgM) トランス遺伝子を含んで成る遺伝子導入マウスまたは他の遺伝子導入哺乳動物 (ヒト以外) を用いて実施可能である。別の態様における抗 - ヒト IL - 6 ヒト抗体は IgG1 重鎖および IgG1 軽鎖を含んで成る。

【0090】

本発明の少なくとも 1 種の抗体は、少なくとも 1 種の IL - 6 蛋白質、これのサブユニット、フラグメント、部分または任意組み合わせに特異的な少なくとも 1 つの特定エピト

10

20

30

40

50

ープと結合する。前記少なくとも1つのエピートープは、本蛋白質の少なくとも一部を含んで成る少なくとも1つの抗体結合領域を含んで成っていてもよく、好適には、そのエピートープを本蛋白質の少なくとも1つの細胞外、可溶、親水性、外側または細胞質部分で構成させる。前記少なくとも1つの特定エピートープは、配列識別番号：115の連続したアミノ酸の中の少なくとも1-3個のアミノ酸から特定部分全体の少なくとも1種のアミノ酸配列の任意組み合わせ、例えばアミノ酸残基151-178、より具体的には残基171-182を含んで成っていてもよい。

#### 【0091】

本発明のヒト抗体もしくは抗原結合フラグメントは、一般に、少なくとも1つの重鎖可変領域の少なくとも1つのヒト相補性決定領域(CDR1、CDR2およびCDR3)もしくは変異体および少なくとも1つの軽鎖可変領域の少なくとも1つのヒト相補性決定領域(CDR1、CDR2およびCDR3)もしくは変異体を含んで成る抗原結合領域を含有して成る。前記CDR配列はヒト生殖細胞配列に由来するものであってもよいか或は生殖細胞配列に密に合致するものであってもよい。例えば、元々のマウスCDRから生じさせた合成ライブラリーに由来するCDRなどを用いてもよい。元々のマウス配列に同類置換を取り込ませることでそのようなCDRを生じさせることができる。非限定例として、本抗体もしくは抗原結合部分もしくは変異体は、配列識別番号：79、81、83、85、87、89および91から成る群から選択したアミノ酸配列を有する重鎖CDR3および/または配列識別番号：29、31、33および35から成る群から選択したアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3の中の少なくとも一方を含んで成り得る。特別な態様における本抗体もしくは抗原結合フラグメントは、CDR1、2および/または3(例えば配列識別番号：37、49および79)に相当するアミノ酸配列を有する少なくとも1つの重鎖CDR(即ちCDR1、CDR2および/またはCDR3)の少なくとも一部を含んで成る抗原結合領域を持ち得る。別の態様における本抗体もしくは抗原結合部分もしくは変異体は、CDR1、2および/または3(例えば配列識別番号：1、17および9)に相当するアミノ酸配列を有する少なくとも1つの軽鎖CDR(即ちCDR1、CDR2および/またはCDR3)の少なくとも一部を含んで成る抗原結合領域を持ち得る。

#### 【0092】

好適な態様において、本抗体もしくは抗原結合フラグメントの前記3つの重鎖CDRおよび前記3つの軽鎖CDRは、本明細書に記述する如きmAb AME-A9, AME-1b, AME-18a, AME-22a, AME-20b, AME-23a, および AME-19aの中の少なくとも1つの相当するCDRのアミノ酸配列を有する。そのような抗体の調製は、本抗体のいろいろな部分(例えばCDR、フレームワーク)を通常技術を用いて一緒に化学的に結合させるか、本抗体をコードする核酸分子(即ち1種以上の分子)を調製しそして通常の技術である組換えDNA技術を用いて発現させるか、或は他の適切な方法のいずれかを用いて実施可能である。

#### 【0093】

本抗-IL-6抗体は、限定したアミノ酸配列を有する重もしくは軽鎖可変領域の中の少なくとも一方を含んで成り得る。例えば、好適な態様における本抗-IL-6抗体は、少なくとも1つの重鎖可変領域(場合により配列識別番号：95、99、103、118、122、126および130から成る群から選択したアミノ酸配列を持たせてもよい)および/または少なくとも1つの軽鎖可変領域(場合により配列識別番号：93、97、101、116、120、124および/または128から成る群から選択したアミノ酸配列を持たせてもよい)の中の少なくとも一方を含んで成る。ヒトIL-6と結合しかつ限定した重もしくは軽鎖可変領域を含んで成る抗体の調製は適切な方法、例えばファージ提示法[Katsube, Y. 他, Int J Mol Med, 1(5):863-868(1998)]または本技術分野で公知でありそして/または本明細書に記述する如き遺伝子導入動物を用いる方法などを用いて実施可能である。例えば、機能的に再配列させたヒト免疫グロブリン重鎖トランス遺伝子および機能的再配列を受けていてもよいヒト免疫グロブリン軽鎖遺伝子座に由来するDNAを含んで成るトランス遺伝子を含有して成

10

20

30

40

50

る遺伝子導入マウスにヒトIL-6またはこれのフラグメントを用いて免疫性を与えることなどで抗体の産生を引き出してもよい。必要ならば、そのような抗体産生細胞を単離してもよく、そして本明細書に記述しそして/または本技術分野で公知のようにして、ハイブリドーマまたは他の不死化抗体産生細胞を生じさせてもよい。別法として、コード化核酸またはこれの一部を適切な宿主細胞の中で用いることで本抗体、特定部分または変異体を発現させることも可能である。

【0094】

アミノ酸コード

本発明の抗-IL-6抗体を構成するアミノ酸をしばしば省略形で示す。アミノ酸の表示を本技術分野で十分に理解されているように当該アミノ酸をその単一文字コード、3文字コード、名前または3ヌクレオチドコドン1種または2種以上で表示することで示すことができる(Alberts, B., 他、Molecular Biology of The Cell, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994)を参照)。

10

【0095】

本発明の抗-IL-6抗体は、本明細書に示す如き1種以上のアミノ酸置換、欠失または付加(自然変異またはヒトによる操作のいずれかによる)を含んでいてもよい。本発明の抗-IL-6抗体の中の機能に必須なアミノ酸を本技術分野で公知の方法、例えば部位特異的突然変異誘発法またはアラニン走査突然変異誘発法[例えば上記Ausubelの8、15章、CunninghamおよびWells、Science 244:1081-1085(1989)]などで同定することができる。後者の手順では、分子中の全て残基の所に単一のアラニン変異を導入する。次に、その結果としてもたらされた変異分子に生物学的活性、例えばこれらに限定するものでないが、少なくとも1種のIL-6中和活性などに関する試験を受けさせる。また、抗体結合に重要な部位も構造分析、例えば結晶化、核磁気共鳴または光親和性標識(Smith, 他、J. Mol. Biol. 224:899-904(1992)およびde Vos, 他、Science 255:306-312(1992))などを用いることで同定可能である。

20

【0096】

本発明の抗-IL-6抗体は、これらに限定するものでないが、配列識別番号:91、93、95、97、99などの中の少なくとも1つの連続したアミノ酸の中の5個から全部から選択した少なくとも一部、配列または組み合わせを含有し得る。

30

【0097】

この示した活性の中の少なくとも1つが向上しているか或はそれを維持し得る非限定変異体には、これらに限定するものでないが、開示する変異アミノ酸配列の中の変化した残基の中の少なくとも1つの置換に相当する少なくとも1種の変異を更に含んで成る前記ポリペプチドのいずれも含まれる。

【0098】

抗-IL-6抗体に更に場合により配列識別番号:95、99および103などの中の少なくとも1つの連続したアミノ酸の配列から変化したアミノ酸配列を有するポリペプチドを含有させることも可能である(例えば本明細書に示す配列の1種以上の同類置換)。また、本発明は、配列識別番号:93、97または101の軽鎖可変領域のアミノ酸配列または配列識別番号:79、81、83、85、87、89または91の重鎖のアミノ酸配列の変異体も包含する。

40

【0099】

技術者が理解するであろうように、本発明は、本発明の少なくとも1種の生物学的活性抗体を包含する。生物学的活性抗体は、天然(合成ではない)、内因性または関連および公知抗体が示す活性の少なくとも20%、30%または40%、好適には少なくとも50%、60%または70%、最も好適には少なくとも80%、90%または95%-100%またはそれ以上の比活性を示す。酵素の活性および基質の特異性の尺度を検定および量化する方法は本分野の技術者に良く知られている。

50

## 【 0 1 0 0 】

本発明は、別の面において、有機部分を共有結合させることによる修飾を受けさせておいた本明細書に記述する如きヒト抗体および抗原結合フラグメントに関する。そのような修飾によって、薬物動態特性が向上した（例えば生体内血清中半減期が向上した）抗体または抗原結合フラグメントを生じさせることができる。その有機部分は直鎖もしくは分枝親水性重合体基、脂肪酸基または脂肪酸エステル基であってもよい。特別な態様では、そのような親水性重合体基に約 800 から約 120,000 ダルトンの分子量を持たせてもよく、それはポリアルカングリコール [例えばポリエチレングリコール (PEG)、ポリプロピレングリコール (PPG)]、炭水化物重合体、アミノ酸重合体またはポリビニルピロリドンなどであってもよく、そして脂肪酸もしくは脂肪酸エステル基は炭素原子を約 8 から約 40 個含有していてもよい。

10

## 【 0 1 0 1 】

本発明の修飾を受けさせた抗体および抗原結合フラグメントは、本抗体と共有結合しているか、直接的または間接的に結合している 1 種以上の有機部分を含んで成り得る。本発明の抗体または抗原結合フラグメントと結合させる有機部分は各々独立して親水性重合体基、脂肪酸基または脂肪酸エステル基であってもよい。本明細書で用いる如き用語「脂肪酸」にはモノカルボン酸およびジカルボン酸が含まれる。「親水性重合体基」を本明細書で用語として用いる場合、これは水中の溶解度の方がオクタン中の溶解度より高い有機重合体を指す。例えば、ポリリシンは水中の方がオクタン中よりも高い溶解性を示す。従って、ポリリシンを共有結合させることによる修飾を受けさせた抗体は本発明に含まれる。本発明の抗体に修飾を受けさせる時に用いるに適した親水性重合体は直鎖もしくは分枝であってもよく、それには例えばポリアルカングリコール [例えば PEG、モノメトキシポリエチレングリコール (mPEG)、PPG など]、炭水化物 (例えばデキストラン、セルロース、オリゴ糖、多糖など)、親水性アミノ酸の重合体 (例えばポリリシン、ポリアルギニン、ポリアスパルテートなど)、ポリアルカンオキサイド (例えばポリエチレンオキサイド、ポリプロピレンオキサイドなど) およびポリビニルピロリドンなどが含まれる。好適には、本発明の抗体を修飾する親水性重合体が個別の分子実体として示す分子量を約 800 から約 150,000 ダルトンにする。例えば PEG<sub>5000</sub> および PEG<sub>20000</sub> [下付き文字は重合体が示す平均分子量 (ダルトン) である] を用いてもよい。そのような親水性重合体基は 1 から約 6 個のアルキル、脂肪酸または脂肪酸エステル基で置換されていてもよい。脂肪酸または脂肪酸エステル基で置換されている親水性重合体の調製は適切な方法を用いることで実施可能である。例えば、アミン基を含有する重合体を脂肪酸もしくは脂肪酸エステルのカルボキシレートと連成させてもよく、そして脂肪酸または脂肪酸エステルが有する活性カルボキシレート (例えば N,N-カルボニルジイミダゾールで活性化させた) を重合体が有するヒドロキシル基と連成させてもよい。

20

30

## 【 0 1 0 2 】

本発明の抗体に修飾を受けさせる時に用いるに適した脂肪酸および脂肪酸エステルは飽和であってもよいか或は不飽和単位を 1 個以上含有していてもよい。本発明の抗体に修飾を受けさせる時に用いるに適した脂肪酸には、例えば n-ドデカノエート (C<sub>12</sub>、ラウレート)、n-テトラデカノエート (C<sub>14</sub>、ミリストレート)、n-オクタデカノエート (C<sub>18</sub>、ステアレート)、n-エイコサノエート (C<sub>20</sub>、アラキデート)、n-ドコサノエート (C<sub>22</sub>、ベヘネート)、n-トリアコンタノエート (C<sub>30</sub>)、n-テトラコンタノエート (C<sub>40</sub>)、シス-9-オクタデカノエート (C<sub>18</sub>、オレエート)、あらゆるシス-5,8,11,14-エイコサテトラエノエート (C<sub>20</sub>、アラキドネート)、オクタ二酸、テトラデカン二酸、オクタデカン二酸、ドコサン二酸などが含まれる。適切な脂肪酸エステルには、直鎖もしくは分枝低級アルキル基を含有するジカルボン酸モノエステルが含まれる。そのような低級アルキル基は炭素原子を 1 から約 12 個、好適には 1 から約 6 個含有し得る。

40

## 【 0 1 0 3 】

そのような修飾を受けたヒト抗体および抗原結合フラグメントの調製は適切な方法、例

50



えば1種以上の修飾剤を用いた反応などで実施可能である。「修飾剤」を本明細書で用語として用いる場合、これは、活性基を含有する適切な有機基（例えば親水性重合体、脂肪酸、脂肪酸エステル）を指す。「活性基」は、適切な条件下で2番目の化学基と反応して当該修飾剤と前記2番目の化学基の間に共有結合を形成し得る化学的部分または官能基である。例えば、アミン反応性活性基には親電子基、例えばトシレート、メシレート、ハロ（クロロ、プロモ、フルオロ、ヨード）、N-ヒドロキシスクシニミジルエステル（NH S）などが含まれる。チオールと反応し得る活性基には、例えばマレイミド、ヨードアセチル、アクリロイル、ピリジルジスルフィド、5-チオール-2-ニトロ安息香酸チオール（TNB-チオール）などが含まれる。アルデヒド官能基をアミン含有もしくはヒドラジン含有分子と連成させることができ、そしてアジド基を三価燐基と反応させることでホスホルアミデートまたはホスホルイミド結合を生じさせることができる。活性基を分子の中に導入するに適した方法は本技術分野で公知である（例えばHermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)）を参照）。活性基を有機基（例えば親水性重合体、脂肪酸、脂肪酸エステル）と直接結合させてもよいか、或はリンカー部分、例えば二価C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>基（ここで、1個以上の炭素原子がヘテロ原子、例えば酸素、窒素または硫黄に置き換わっていてもよい）などを通して結合させてもよい。適切なリンカー部分には、例えばテトラエチレングリコール、-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-、-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-NH-、-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH-および-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-NH-が含まれる。リンカー部分を含有して成る修飾剤の製造は、例えばモノ-Boc-アルキルジアミン（例えばモノ-Boc-エチレンジアミン、モノ-Boc-ジアミノヘキサン）と脂肪酸を1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド（EDC）の存在下で反応させて遊離アミンと脂肪酸のカルボキシレート間にアミド結合を生じさせることなどで実施可能である。その生成物にトリフルオロ酢酸（TFA）を用いた処理を受けさせることで前記Boc保護基を除去することで第一級アミン基を露出させることができ、それを別のカルボキシレート（記述した如き）と連成させてもよいか、或は無水マレイン酸と反応させそしてその結果として生じた生成物を環化させることで当該脂肪酸の活性マレイミド誘導体を生じさせてもよい〔例えばThompson他、WO 92/16221（この教示は全体が引用することによって本明細書に組み入れられる）を参照〕。

#### 【0104】

本発明の修飾抗体の製造は、ヒト抗体または抗原結合フラグメントを修飾剤と反応させることで実施可能である。例えば、アミン反応性修飾剤、例えばPEGのNHSEステルなどを用いて有機部分を本抗体と部位に特異的ではない様式で結合させてもよい。また、抗体または抗原結合フラグメントのジスルフィド結合（例えば鎖内ジスルフィド結合）に還元を受けさせることを通して、修飾ヒト抗体または抗原結合フラグメントを調製することも可能である。次に、その還元を受けさせた抗体もしくは抗原結合フラグメントをチオール反応性修飾剤と反応させることで本発明の修飾抗体を生じさせることができる。本発明の抗体の特定部位と結合している有機部分を含んで成る修飾ヒト抗体および抗原結合フラグメントの調製は適切な方法、例えば逆蛋白分解（Fisch他、*Bioconjugate Chem.*, 3: 147-153 (1992); Werlen他、*Bioconjugate Chem.*, 5: 411-417 (1994); Kumaran他、*Protein Sci.* 6(10): 2233-2241 (1997); Itoh他、*Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996); Capella他、*Biotechnol. Bioeng.*, 56(4): 456-463 (1997)）、およびHermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)に記述されている方法などを用いて実施可能である。

#### 【0105】

抗-IL-6抗体組成物に対する抗イディオタイプ抗体

本発明は、モノクローナル抗 - I L - 6 抗体に加えて、また、本発明の前記抗体に特異的な抗イディオタイプ (抗 - I d ) 抗体にも向けたものである。抗 - I d 抗体は、別の抗体の抗原結合領域に一般に関連したユニークな決定基を認識する抗体である。そのような抗 - I d の調製は、同じ種および遺伝型の動物 (例えばマウス株) を I d 抗体の源として用いてそれに本抗体またはこれの C D R 含有領域を用いて免疫性を与えることで実施可能である。その免疫性を与えた動物は免疫抗体のイディオタイプ決定基を認識しかつ反応することで抗 - I d 抗体を産生する。その抗 - I d 抗体をまた「免疫原」として用いて更に別の動物に免疫反応を誘発することでいわゆる抗 - 抗 - I d 抗体を生じさせることも可能である。

#### 【 0 1 0 6 】

本発明は、また、本発明の抗 - I L - 6 抗体を少なくとも 1 種、少なくとも 2 種、少なくとも 3 種、少なくとも 4 種、少なくとも 5 種、少なくとも 6 種またはそれ以上含有して成る少なくとも 1 種の抗 - I L - 6 抗体組成物も提供し、本明細書に記述しそして / または本技術分野で公知のようにして、それらを天然には存在しない組成物、混合物または形態として提供する。そのような組成物には、配列識別番号 : 1 - 1 1 4 および 1 1 6 - 1 3 8 の連続したアミノ酸の中の 7 0 - 1 0 0 % から成る群から選択した抗 - I L - 6 抗体アミノ酸配列またはこれの特定フラグメント、ドメインまたは変異体の全長、C 末端および / または N 末端欠如変異体、ドメイン、フラグメントまたは特定変異体を少なくとも 1 つまたは 2 つ含んで成る天然には存在しない組成物が含まれる。好適な抗 - I L - 6 抗体組成物は、本明細書に記述する抗 - I L - 6 抗体配列の一部、例えば配列識別番号 : 1 5 20、2 7、3 5、4 7、6 1 および 9 1 の 7 0 - 1 0 0 % またはこれの特定フラグメント、ドメインまたは変異体を含有する少なくとも 1 種の C D R または L B P として全長、フラグメント、ドメインまたは変異体を少なくとも 1 つまたは 2 つ含有する。さらなる好適な組成物は、例えば配列識別番号 : 9 3、9 5、9 7、9 9、1 0 1、1 0 3 などの 7 0 - 1 0 0 % の中の少なくとも 1 つの 4 0 - 9 9 % またはこれの特定フラグメント、ドメインまたは変異体を含んで成る。そのような組成物のパーセントは、本技術分野で公知であるか或は本明細書に記述するように、液体または無水溶液、混合物、懸濁液、乳液、粒子、粉末またはコロイドとしての重量、体積、濃度、モル濃度または重量モル濃度である。

#### 【 0 1 0 7 】

さらなる治療有効成分を含有して成る抗体組成物

本発明の抗体組成物に場合により更に抗感染薬、心臓血管 ( C V ) 系作用薬、中枢神経系 ( C N S ) 作用薬、自律神経系 ( A N S ) 作用薬、呼吸器作用薬、胃腸 ( G I ) 管作用薬、ホルモン薬、体液もしくは電解質平衡用薬剤、血液製剤、抗癌薬、免疫修飾薬、眼、耳もしくは鼻用薬剤、局所用薬剤、栄養薬などの中の少なくとも 1 種から選択した少なくとも 1 種の化合物もしくは蛋白質を有効量で含有させることも可能である。そのような薬剤は本技術分野で良く知られており、それには本明細書に示す各々の調製、適応、投薬および投与が含まれる (例えば Nursing 2001 Handbook of Drugs, 第 21 版, Springhouse Corp., Springhouse, P A, 2001; Health Professional's Drug Guide 2001, 編集, Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; Pharmacotherapy Handbook, Wells 他編集, Appleton & Lange, Stamford, CT, 各々引用することによって全体が本明細書に組み入れられるを参照)。

#### 【 0 1 0 8 】

前記抗感染薬は、抗アメーバ薬または少なくとも 1 種の抗原虫薬、駆虫薬、抗真菌薬、抗マラリア薬、抗結核薬または少なくとも 1 種の抗ハンセン菌薬、アミノグリコシド、ペニシリン、セファロスポリン、テトラシクリン、スルホンアミド、フルオロキノロン、抗ウイルス薬、マクロライド系抗感染薬およびいろいろな抗感染薬から選択した少なくとも 1 種であってもよい。前記 C V 作用薬は強心薬、抗不整脈薬、抗狭心症薬、抗高血圧薬お

10

20

30

40

50

よびいろいろな心臓脈管薬から選択した少なくとも1種であってもよい。前記CNS作用薬は、非麻薬性鎮痛薬から選択した少なくとも1種または解熱薬、非ステロイド系抗炎症薬、麻酔薬または少なくとも1種のオピオイド鎮痛薬、睡眠-鎮痛薬、抗けいれん薬、抗うつ薬、抗不安薬、抗精神病薬、中枢神経系興奮薬、抗パーキンソン病薬、およびいろいろな中枢神経系薬剤から選択した少なくとも1種であってもよい。前記ANS作用薬は、コリンアゴニスト(副交感神経作用薬)、抗コリン作用薬、アドレナリン作用薬(交感神経作用薬)、アドレナリン遮断薬(交感神経遮断薬)、骨格筋弛緩薬および神経筋遮断薬から選択した少なくとも1種であってもよい。前記呼吸器作用薬は、抗ヒスタミン剤、気管支拡張剤、去痰薬または少なくとも1種の鎮咳薬、およびいろいろな呼吸器作用薬から選択した少なくとも1種であってもよい。前記GI管作用薬は、制酸薬または少なくとも1種の粘滑薬または少なくとも1種の整腸薬、消化酵素または少なくとも1種の胆石溶解剤、下痢止め薬、下剤、制吐薬および抗潰瘍薬から選択した少なくとも1種であってもよい。前記ホルモン薬は、コルチコステロイド、アンドロゲンまたは少なくとも1種のアナボリックステロイド、エストロゲンまたは少なくとも1種のプロゲステロン、ゴナドトロピン、抗糖尿病薬または少なくとも1種のグルカゴン、甲状腺ホルモン、甲状腺ホルモンアンタゴニスト、下垂体ホルモンおよび副甲状腺様薬剤から選択した少なくとも1種であってもよい。前記体液および電解質平衡用薬剤は、利尿薬、電解質または少なくとも1種の置換溶液、酸性化薬または少なくとも1種のアルカリ性化薬から選択した少なくとも1種であってもよい。前記血液製剤は、造血剤、抗凝血薬、血液製剤および血栓溶解酵素から選択した少なくとも1種であってもよい。前記抗癌薬は、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗腫瘍性抗生物質、ホルモン平衡を変える抗癌薬およびいろいろな抗癌薬から選択した少なくとも1種であってもよい。前記免疫修飾薬は、免疫抑制剤、ワクチンまたは少なくとも1種のトキソイド、抗毒素薬または少なくとも1種の抗毒血清、免疫血清、および生物反応修飾物質から選択した少なくとも1種であってもよい。前記眼、耳および鼻用薬剤は、眼科用抗感染薬、眼科用抗炎症薬、縮瞳薬、散瞳薬、眼科用血管収縮薬、いろいろな眼、耳および鼻用薬剤から選択した少なくとも1種であってもよい。前記局所用薬剤は、局所抗感染薬、局所抗疥癬薬、または少なくとも1種のシラミ駆除剤または外用副腎皮質ホルモン剤から選択した少なくとも1種であってもよい。前記栄養薬は、ビタミン、ミネラルまたはカロリー薬(calorics)から選択した少なくとも1種であってもよい。例えば上記Nursing 2001 Drug Handbookの内容を参照のこと。

【0109】

前記少なくとも1種の抗アメーバ薬または抗原虫薬は、アトバクオン、塩酸クロロキン、磷酸クロロキン、メトロインダゾール、塩酸メトロニダゾールおよびイセチオン酸ペンタミジンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の駆虫薬は、メベンダゾール、パモ酸ピランテルおよびチアベンダゾールから選択した少なくとも1種であってもよい。前記抗真菌薬は、アンホテリシンB、アンホテリシンB硫酸コレステリル複合体、アンホテリシンB脂質複合体、アンホテリシンBリポソーム、フルコナゾール、フルシトシン、微細グリセオフルビン、超微細グリセオフルビン、イトラコナゾール、ケトコナゾール、ニスタチンおよび塩酸テルビナフィンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗マalaria薬は、塩酸クロロキン、磷酸クロロキン、ドキシシクリン、硫酸ヒドロキシクロロキン、塩酸メフロキン、磷酸プリマキン、ピリメタミンおよびスルファドキシンを伴うピリメタミンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗結核薬または抗ハンセン菌薬は、クロファジミン、シクロセリン、ダブソン、塩酸エタムブトール、イソニアジド、ピラジナミド、リファブチン、リファムピン、リファベンチンおよび硫酸ストレプトマイシンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のアミノグリコシドは、硫酸アマカシン、硫酸ゲンタマイシン、硫酸ネオマイシン、硫酸ストレプトマイシンおよび硫酸トブラマイシンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のペニシリンは、アモキシシリン/クラバン酸カリウム、アモキシシリン三水和物、アンピシリン、アンピシリンナトリウム、アンピシリン三水和物、アンピシリンナトリウム/スルバクタムナトリ

10

20

30

40

50

ウム、クロキサシリンナトリウム、ジクロキサシリンナトリウム、メズロシリンナトリウム、ナフシリンナトリウム、オキサシリンナトリウム、ペニシリンGベンザチン、ペニシリンGカリウム、ペニシリンGプロカイン、ペニシリンGナトリウム、ペニシリンVカリウム、ピペラシリンナトリウム、ピペラシリンナトリウム/タゾバクタムナトリウム、チカルシリンジナトリウムおよびチカルシリンジナトリウム/クラブラン酸カリウムから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のセファロスポリンは、セファクロル、セファドロキシル、セファゾリンナトリウム、セフジニル、塩酸セフェピム、セフィキシム、セフメタゾールナトリウム、セフォニシドナトリウム、セフォペラゾンナトリウム、セフォタキシムナトリウム、セフォテタンジナトリウム、セフォキシチンナトリウム、セフボドキシムプロキセチル、セフプロジル、セフトアジジム、セフチブテン、セフチゾキシムナトリウム、セフトリアクソンナトリウム、セフロキシムアクセチル、セフロキシムナトリウム、塩酸セファレキシム、セファレキシム一水和物、セファラジンおよびロラカルベフから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のテトラシクリンは、塩酸デメクロシクリン、ドキシシクリンカルシウム、ドキシシクリンヒクレート、塩酸ドキシシクリン、ドキシシクリン一水和物、塩酸ミノシクリンおよび塩酸テトラシクリンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のスルホンアミドは、コ-トリモキサゾール、スルファジアジン、スルファメトキサゾール、スルフィソキサゾールおよびスルフィソキサゾールアセチルから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のフルオロキノロンは、メシル酸アラトロフロキサシン、シプロフロキサシン、エノキサシン、レボフロキサシン、塩酸ロメフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、オフロキサシン、スパルフロキサシンおよびメシル酸トロバフロキサシンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のフルオロキノロンは、メシル酸アラトロフロキサシン、シプロフロキサシン、エノキサシン、レボフロキサシン、塩酸ロメフロキサシン、ナリジクス酸、ノルフロキサシン、オフロキサシン、スパルフロキサシンおよびメシル酸トロバフロキサシンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗ウイルス薬は、硫酸アバカビル、アシクロビルナトリウム、塩酸アマンタジン、アムプレナビル、シドホビル、メシル酸デラビルジン、ジダノシン、エファピレンズ、ファミシクロビル、ホミビルセンナトリウム、ホスカルネットナトリウム、ガンシクロビル、硫酸インジナビル、ラミブジン、ラミブジン/ジドブジン、メシル酸ネルフィナビル、ネビラピン、燐酸オセルタミビル、リバビリン、塩酸リマンタジン、リトナビル、サキナビル、メシル酸サキナビル、スタブジン、塩酸バラシクロビル、ザルシタピン、ザナミビルおよびジドブジンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のマクロリン抗感染薬は、アジトロマイシン、クラリトロマイシン、ジリトロマイシン、エリスロマイシン塩基、エリスロマイシンエステル、エチルこはく酸エリスロマイシン、ラクトビオン酸エリスロマイシンおよびステアリン酸エリスロマイシンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のいろいろな抗感染薬は、アズトレオナム、バシトラシン、こはく酸クロラムフェニコールナトリウム、塩酸クリンダマイシン、塩酸クリンダマイシンパルミテート、燐酸クリンダマイシン、イミペネムおよびシラスタチンナトリウム、メロペネム、ニトロフラントイン巨結晶、ニトロフラントイン微結晶、キヌプリスチン/ダルホプリスチン、塩酸スペクチノマイシン、トリメトプリムおよび塩酸バンコマイシンから選択した少なくとも1種であってもよい(例えばNursing 2001 Drug Handbookの24-214頁を参照)。

#### 【0110】

前記少なくとも1種の強心薬は、乳酸アムリノン、ジゴキシンおよび乳酸ミルリノンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗不整脈薬は、アデノシン、塩酸アミオダロン、硫酸アトロピン、トシル酸プレチリウム、塩酸ジルチアゼム、ジソピラミド、燐酸ジソピラミド、塩酸エスモロール、酢酸フレカイニド、フマル酸イブチリド、塩酸リドカイン、塩酸メキシレチン、塩酸モリジジン、フェニトイン、フェニトインナトリウム、塩酸プロカイナミド、塩酸プロパフェノン、塩酸プロプラノロール、ニ

10

20

30

40

50

硫酸キニジン、グルコン酸キニジン、ポリガラクトロン酸キニジン、硫酸キニジン、ソタロール、塩酸トカイニドおよび塩酸ベラパミルから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗狭心症薬は、アムロジピンベシレート、亜硝酸アミル、塩酸ペプリジル、塩酸ジルチアゼム、二硝酸イソソルビド、一硝酸イソソルビド、ナドロール、塩酸ニカルジピン、ニフェジピン、ニトログリセリン、塩酸プロプラノロール、ベラパミルおよび塩酸ベラパミルから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗高血圧薬は、塩酸アセプトロール、アムロジピンベシレート、アテノロール、塩酸ベナゼプリル、塩酸ベタキソロール、フマル酸ピソプロロール、カンデサルタンシレキセチル、カプトプリル、塩酸カルテオロール、カルベジロール、クロニジン、塩酸クロニジン、ジアゾキシド、塩酸ジルチアゼム、メシル酸ドキサゾシン、エナラプリラット、マレイン酸エナラプリル、メシル酸エプロサルタン、フェロジピン、メシル酸フェノロドパム、フォシノプリルナトリウム、酢酸グアナベンズ、硫酸グアナドレル、塩酸グアンファシン、塩酸ヒドララジン、イルベサルタン、イスラジピン、塩酸ラベタロール、リシノプリル、ロサルタンカリウム、メチルドーパ、塩酸メチルドベート、こはく酸メトプロロール、酒石酸メトプロロール、ミノキシジル、塩酸モエキシプリル、ナドロール、塩酸ニカルジピン、ニフェジピン、ニソルジピン、ニトロプルシドナトリウム、硫酸ペンブタロール、ペリンドプリルエルブミン、メシル酸フェントールアミン、ピンドロール、塩酸ブラゾシン、塩酸プロプラノロール、塩酸キナプリル、ラミプリル、テルミサルタン、塩酸テラゾシン、マレイン酸チモロール、トランドラプリル、バルサルタンおよび塩酸ベラパミルから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗脂血症薬は、アトルバスタチンカルシウム、セリバスタチンナトリウム、コレステラミン、塩酸コレステポール、フェノフィブラート(微粉化)、フルバスタチンナトリウム、ゲムフィブロジル、ロバスタチン、ナイアシン、プラバスタチンナトリウムおよびシムバスタチンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のいろいろなCV作用薬は、アブキシマブ、アルプロスタジル、塩酸アルブタミン、シロスタゾール、二硫酸クロピドグレル、ジピリダモール、エプチフィバチド、塩酸ミドドリン、ペントキシフィリン、塩酸チクロピジンおよび塩酸チロフィバンから選択した少なくとも1種であってもよい(例えばNursing 2001 Drug Handbookの215-336頁を参照)。

10

20

#### 【0111】

前記少なくとも1種の非麻薬性鎮痛薬または解熱薬は、アセタミノフェン、アスピリン、トリサリチル酸コリンマグネシウム、ジフルニサルおよびサリチル酸マグネシウムから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の非ステロイド系抗炎症薬は、セレコキシブ、ジクロフェナクカリウム、ジクロフェナクナトリウム、エトドラク、フェノプロフェンカルシウム、フルルピプロフェン、イブプロフェン、インドメタシン、インドメタシンナトリウム三水和物、ケトプロフェン、ケトロラクトロメタミン、ナブメトン、ナプロキセン、ナプロセンナトリウム、オキサプロジン、ピロキシカム、ロフェコキシブおよびスリダクから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の麻酔薬またはオピオイド鎮痛薬は、塩酸アフェタニル、塩酸ブプレノルフィン、酒石酸ブトルファノール、燐酸コデイン、硫酸コデイン、クエン酸フェンタニル、フェンタニル経皮システム、フェンタニル経粘膜、塩酸ヒドロモルフォン、塩酸メペリジン、塩酸メタドン、塩酸モルヒネ、硫酸モルヒネ、酒石酸モルヒネ、塩酸ナルブフィン、塩酸オキシコドン、オキシコドンペクチネート、塩酸オキシモルフォン、塩酸ペンタゾシン、塩酸ペンタゾシンおよび塩酸ナロキソン、乳酸ペンタゾシン、塩酸プロボキシフェン、ナシル酸プロボキシフェン、塩酸レミフェンタニル、クエン酸フェンタニルおよび塩酸トラマドールから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の睡眠-鎮痛薬は、抱水クロラール、エスタゾラム、塩酸フルラゼパム、ペントバルビタール、ペントバルビタールナトリウム、フェノバルビタールナトリウム、セコバルビタールナトリウム、テマゼパム、トリアゾラム、ザレプロンおよび酒石酸ゾルピデムから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗けいれん薬は、アセタゾールアミドナト

30

40

50

リウム、カルバマゼピン、クロナゼパム、クロラゼブ酸二カリウム、ジアゼパム、ジバルプロエクスナトリウム、エトスクシミド、フォスフェニトインナトリウム、ガバベンチン、ラモトリギン、硫酸マグネシウム、フェノバルビタール、フェノバルビタールナトリウム、フェニトイン、フェニトインナトリウム、フェニトインナトリウム（加増量剤）、プリミドン、塩酸チアガピン、トピラメート、バルプロエートナトリウムおよびバルプロ酸から選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗うつ薬は、塩酸アミトリプチリン、パモ酸アミトリプチリン、アモキサピン、塩酸ブプロピオン、臭化水素酸シタロプラム、塩酸クロミプラミン、塩酸デシプラミン、塩酸ドキセピン、塩酸フルオキセチン、塩酸イミプラミン、パモ酸イミプラミン、ミルタザピン、塩酸ネファゾドン、塩酸ノルトリプチリン、塩酸パロキセチン、硫酸フェネルジン、塩酸セルトラリン、硫酸トラニルシプロミン、マレイン酸トリミプラミンおよび塩酸ベンラファクシンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗不安薬は、アルプラゾラム、塩酸ブスピロン、クロルジアゼポキシド、塩酸クロルジアゼポキシド、クロラゼブ酸二カリウム、ジアゼパム、塩酸ドキセピン、ヒドロキシジンエンボネート、塩酸ヒドロキシジン、パモ酸ヒドロキシジン、ロラゼパム、メフロバメート、塩酸ミダゾラムおよびオキサゼパムから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗精神病薬は、塩酸クロルプロマジン、クロザピン、デカン酸フルフェナジン、エナント酸フルフェナジン、塩酸フルフェナジン、ハロペリドール、ドデカン酸ハロペリドール、乳酸ハロペリドール、塩酸ロキサピン、こはく酸ロキサピン、メソリダジンベシレート、塩酸モリンドン、オランザピン、ペルフェナジン、ピモジド、プロクロルペラジン、フマル酸ケチアピン、リスペリドン、塩酸チオリダジン、チオチキセン、塩酸チオチキセンおよび塩酸トリフルオペラジンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の中樞神経系興奮薬は、硫酸アンフェタミン、カフェイン、硫酸デキストロアンフェタミン、塩酸ドキサプラム、塩酸メタンフェタミン、塩酸メチルフェニデート、モダフィニル、ペモリンおよび塩酸フェンテルミンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗パーキンソン病薬は、塩酸アマタジン、メシル酸ベンズトロピン、塩酸ピペリデン、乳酸ピペリデン、メシル酸プロモクリプチン、カルビドパ-レボドパ、エンタカポン、レバドパ、メシル酸ペルゴリド、二塩酸プラミペキソール、塩酸ロピニロール、塩酸セレギリン、トルカポンおよび塩酸トリヘキシフェニジルから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のいろいろな中樞神経系作用薬は、塩酸ブプロピオン、塩酸ドネペジル、ドロペリドール、マレイン酸フルボキサミン、炭酸リチウム、クエン酸リチウム、塩酸ナラトリプタン、ニコチンポラクリレクス、ニコチン経皮システム、プロポフォル、安息香酸リザトリプタン、塩酸シブトラミン-水和物、こはく酸スマトリプタン、塩酸タクリンおよびゾルミトリプタンから選択した少なくとも1種であってもよい（例えばNursing 2001 Drug Handbookの337-530頁を参照のこと）。

#### 【0112】

前記少なくとも1種のコリンアゴニスト（例えば副交感神経作用薬）は、塩化ベタネコール、塩化エドロホニウム、臭化ネオスチグミン、メチル硫酸ネオスチグミン、サリチル酸フィゾスチグミンおよび臭化ピリドスチグミンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗コリン作用薬は、硫酸アトロピン、塩酸ジシクロミン、グリコピロレート、ヒヨスチアミン、硫酸ヒヨスチアミン、臭化プロバンテリン、スコポラミン、臭化ブチルスコポラミンおよび臭化水素酸スコポラミンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のアドレナリン作用薬（交感神経作用薬）は、塩酸ドブタミン、塩酸ドーパミン、酒石酸水素メタラミノール、酒石酸水素ノルエピネフリン、塩酸フェニレフリン、塩酸プソイドエフェドリンおよび硫酸プソイドエフェドリンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のアドレナリン遮断薬（交感神経遮断薬）は、メシル酸ジヒドロエルゴタミン、酒石酸エルゴタミン、マレイン酸メチセルギドおよび塩酸プロプラノロールから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の骨格筋弛緩薬は、バクロフェン、カリソプロドール、クロルゾキサ

10

20

30

40

50

ゾン、塩酸シクロベンザプリン、ダントロレンナトリウム、メトカルバモールおよび塩酸チザニジンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の神経筋遮断薬は、アトラクリウムベシレート、シサトラクリウムベシレート、塩化ドキサクリウム、塩化ミバクリウム、臭化パンクロニウム、臭化ピペクロニウム、臭化ラパクロニウム、臭化ロクロニウム、塩化スクシニルコリン、塩化ツボクラリンおよび臭化ベクロニウムから選択した少なくとも1種であってもよい。(例えばNursing 2001 Drug Handbookの531-84頁を参照のこと)。

【0113】

前記少なくとも1種の抗ヒスタミン剤は、マレイン酸プロムフェニラミン、塩酸セチリジン、マレイン酸クロルフェニラミン、フマル酸クレマスチン、塩酸シプロフェブタジン、塩酸ジフェンヒドラミン、塩酸フェキソフェナジン、ロラタジン、塩酸プロメタジン、プロメタジンテオクレートおよび塩酸トリプロリジンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の気管支拡張剤は、アルブテロール、硫酸アルブテロール、アミノフィリン、硫酸アトロピン、硫酸エフェドリン、エピネフリン、酒石酸水素エピネフリン、塩酸エピネフリン、臭化イプラトロピウム、イソプロテレノール、塩酸イソプロテレノール、硫酸イソプロテレノール、塩酸レバルブテロール、硫酸メタプロテレノール、オキシトリフィリン、酢酸ピルブテロール、キシナホ酸サルメテロール、硫酸テルブタリンおよびテオフィリンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の去痰薬または鎮咳薬は、ベンゾナテート、リン酸コデイン、硫酸コデイン、臭化水素酸デキストラメトルファン、塩酸ジフェンヒドラミン、グアイフェネシンおよび塩酸ヒドロモルホンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のいろいろな呼吸器作用薬は、アセチルシステイン、ジプロピオン酸ベクロメタゾン、ベラクタント、ブデソニド、カルファクタント、クロモリンナトリウム、ドルナーゼアルファ、エポプロステノールナトリウム、フルニソリド、プロピオン酸フルチカゾン、ノンテルカストナトリウム、ネドクロミルナトリウム、パリピズマブ、トリアムシノロンアセトニド、ザフィルルカストおよびジレウトンから選択した少なくとも1種であってもよい。(例えばNursing 2001 Drug Handbookの585-642頁を参照のこと)。

【0114】

前記少なくとも1種の制酸薬、粘滑薬または整腸薬は、炭酸アルミニウム、水酸化アルミニウム、炭酸カルシウム、マガルドレート、水酸化マグネシウム、酸化マグネシウム、シメチコンおよび重炭酸ナトリウムから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の消化酵素または胆石溶解剤は、パンクレアチン、パンクレリパーゼおよびウルソジオールから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の下痢止め薬は、アタパルジャイト、次サリチル酸ピスマス、カルシウムポリカルボフィル、塩酸ジフェノキシレートおよび硫酸アトロピン、ロペラミド、酢酸オクトレオチド、アヘンチンキおよびオピウムチンクレ(樟脳含有)から選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の下剤は、ピソコジル、カルシウムポリカルボフィル、カスカラサグラダ、カスカラサグラダ芳香流エキス剤、カスカラサグラダ流エキス剤、ヒマシ油、ドキュセートカルシウム、ドキュセートナトリウム、グリセリン、ラクトース、クエン酸マグネシウム、水酸化マグネシウム、硫酸マグネシウム、メチルセルロース、鉍油、ポリエチレングリコールまたは電解質溶液、オオバコ、センナンおよびリン酸ナトリウムから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の制吐薬は、塩酸クロルプロマジン、ジメンヒドリナート、メシル酸ドラセトロン、ドロナビノール、塩酸グラニセトロン、塩酸メクリジン、塩酸メトクロプロアミド、塩酸オندانセトロン、ペルフェナジン、プロクロルペラジン、エジシル酸プロクロルペラジン、マレイン酸プロクロルペラジン、塩酸プロメタジン、スコポラミン、マレイン酸チエチルペラジンおよび塩酸トリメトベンズアミドから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗潰瘍薬は、シメチジン、塩酸シメチジン、ファモチジン、ランソプラゾール、ミソプロストール、ニザチジン、オメプラゾール、ラベプロゾールナトリウム、クエン酸ランチジンピスマ

10

20

30

40

50

ス、塩酸ラニチジンおよびスクラルフェートから選択した少なくとも1種であってもよい。(例えばNursing 2001 Drug Handbookの643-95頁を参照のこと)。

【0115】

前記少なくとも1種のコルチコステロイドは、ベタメタゾン、酢酸ベタメタゾンまたは燐酸ベタメタゾンナトリウム、燐酸ベタメタゾンナトリウム、酢酸コルチゾン、デキサメタゾン、酢酸デキサメタゾン、燐酸ナトリウムデキサメタゾン、酢酸フルドロコルチゾン、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾンシピオネート、燐酸ナトリウムヒドロコルチゾン、こはく酸ナトリウムヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾン、酢酸メチルプレドニゾン、こはく酸メチルプレドニゾンナトリウム、プレドニゾン、酢酸プレドニゾン、燐酸プレドニゾンナトリウム、プレドニゾンテブテート、プレドニゾン、トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニドおよび二酢酸トリアムシノロンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のアンドロゲンまたはアナボリックステロイドは、ダナゾール、フルオキシメステロン、メチルテストステロン、デカン酸ナンドロロン、フェンプロピオン酸ナンドロロン、テストステロン、テストステロンシピオネート、エナント酸テストステロン、プロピオン酸テストステロンおよびテストステロン経皮システムから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のエストロゲンまたはプロゲステンは、エステル化エストロゲン、エストラジオール、エストラジオールシピオネート、酢酸エストラジオール/ノルエチンドロン経皮システム、吉草酸エストラジオール、エストロゲン(共役)、エストロピペート、エチニルエストラジオール、エチニルエストラジオールとデソゲストレル、エチニルエストラジオールとエチノジオールジアセテート、エチニルエストラジオールとレボノルゲストレル、エチニルエストラジオールとノレチンドロン、エチニルエストラジオールと酢酸ノルエチンドロン、エチニルエストラジオールとノルゲステメート、エチニルエストラジオールとノルゲストレル、エチニルエストラジオールとノルエチンドロンおよびアセテートとフマル酸第一鉄、レボノルゲステルエル、酢酸メドロキシプロゲステロン、メストラノールとノレチンドロン、ノレチンドロン、酢酸ノレチンドロン、ノルゲストレルおよびプロゲステロンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のゴナドトロピンは、酢酸ガニレリクス、酢酸ゴナドレリン、酢酸ヒストレリンおよびメノトロピンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗糖尿病薬またはグルカオンは、アカルボース、クロルプロパミド、グリメピリド、グリビジド、グルカゴン、グリブリド、インスリン、塩酸メトフォルミン、ミグリトール、塩酸ピオグリタゾン、レパグリニド、マレイン酸ロシグリタゾンおよびトログリタゾンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の甲状腺ホルモンは、レボチロキシンナトリウム、リオチロニンナトリウム、リオトリックスおよびチロイドから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の甲状腺ホルモンアンタゴニストは、メチマゾール、ヨウ化カリウム、ヨウ化カリウム(飽和溶液)、プロピルチオウラシル、放射性ヨウ素(ヨウ化ナトリウム<sup>131</sup>I)および強ヨウ素溶液から選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の下垂体ホルモンは、コルチコトロピン、コシントロピン、酢酸デスマフレシン、酢酸ロイプロリド、持続性コルチコトロピン、ソマトレム、ソマトロピンおよびバソプレシンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の副甲状腺様薬剤は、カルシフェジオール、カルシトニン(ヒト)、カルシトニン(サケ)、カルシトリオール、ジヒドロタキステロールおよびエチドロン酸2ナトリウムから選択した少なくとも1種であってもよい。(例えばNursing 2001 Drug Handbookの696-796頁を参照のこと)。

【0116】

前記少なくとも1種の利尿薬は、アセタゾールアミド、アセタゾールアミドナトリウム、塩酸アミロリド、ブメタニド、クロルタリドン、エタクリン酸ナトリウム、エタクリン酸、フロセミド、ヒドロクロロチアジド、インダパミド、マンニトール、メトラゾン、スピロラクトン、トルセミド、トリアムテレンおよび尿素から選択した少なくとも1種で

10

20

30

40

50



あってもよい。前記少なくとも1種の電解質または置換溶液は、酢酸カルシウム、炭酸カルシウム、塩化カルシウム、クエン酸カルシウム、カルシウムグルビオネート、カルシウムグルセプテート、グルコン酸カルシウム、乳酸カルシウム、燐酸カルシウム（二塩基性）、燐酸カルシウム（三塩基性）、デキストラン（高分子量）、デキストラン（低分子量）、ヘタスターチ、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、酢酸カリウム、重炭酸カリウム、塩化カリウム、グルコン酸カリウム、リンゲル注射液、リンゲル注射液（乳酸加）および塩化ナトリウムから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の酸性化薬またはアルカリ性化薬は、重炭酸ナトリウム、乳酸ナトリウムおよびトロメタミンから選択した少なくとも1種であってもよい。（例えばNursing 2001 Drug Handbookの797 - 833頁を参照のこと）。

10

## 【0117】

前記少なくとも1種の造血剤は、フマル酸第一鉄、グルコン酸第一鉄、硫酸第一鉄、硫酸第一鉄（乾燥）、デキストラン鉄、ソルビトール鉄、多糖 - 鉄錯体およびグルコン酸第一鉄ナトリウム錯体から選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗凝血薬は、アルデパリンナトリウム、ダルテパリンナトリウム、ダナパロイドナトリウム、エノキサパリンナトリウム、ヘパリンカルシウム、ヘパリンナトリウムおよびワルファリンナトリウムから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の血液製剤は、5%アルブミン、25%アルブミン、抗血友病因子、活性化プロトロンビン複合体、アンチトロンビンIII（ヒト）、因子IX（ヒト）、因子IX複合体および血漿蛋白画分から選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の血栓溶解酵素は、アルテプラゼ、アニストレプラゼ、レテプラゼ（組換え型）、ストレプトキナーゼおよびウロキナーゼから選択した少なくとも1種であってもよい。（例えばNursing 2001 Drug Handbookの834 - 66頁を参照のこと）。

20

## 【0118】

前記少なくとも1種のアルキル化剤は、ブスルファン、カルボプラチン、カルムスチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、イフォスファミド、ロムスチン、塩酸メクロレタミン、メルファラン、塩酸メルファラン、ストレプトゾシン、テモゾロミドおよびチオテパから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の代謝拮抗剤は、カペシタピン、クラドリピン、シタラピン、フロクスリジン、燐酸フルダラピン、フルオロウラシル、ヒドロキシ尿素、メルカプトプリン、メトトレキセート、メトトレキセートナトリウムおよびチオグアニンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗腫瘍性抗生物質は、硫酸ブレオマイシン、ダクチノマイシン、クエン酸ダウノルピシンリポソーム、塩酸ダウノルピシン、塩酸ドキシソルピシン、塩酸ドキシソルピシンリポソーム、塩酸エピルピシン、塩酸イダルピシン、ミトマイシン、ペントスタチン、プリカマイシンおよびバルルピシンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のホルモン平衡を変える抗癌薬は、アナストロゾール、ピカルタミド、燐酸エストラムスチンナトリウム、エキセメスタン、フルタミド、酢酸ゴセレリン、レトロゾール、酢酸ロイプロリド、酢酸メゲストロール、ニルタミド、クエン酸タモキシフェン、テストラクトンおよびクエン酸トレミフェンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のいろいろな抗癌薬は、アスパラギナーゼ、カルメットゲラン菌（BCG）（生膀胱内）、ダカルバジン、ドセタキセル、エトポシド、燐酸エトポシド、塩酸ゲムシタピン、塩酸イリノテカン、ミトタン、塩酸ミトキサントロン、パクリタキセル、ペガスパルゲーゼ、ボルフィマーナトリウム、塩酸プロカルバジン、リツキシマブ、テニポシド、塩酸トポテカン、トラスツブマブ、トレチノイン、硫酸ピンブラスチン、硫酸ピンクリスチンおよび酒石酸ピノレルピンから選択した少なくとも1種であってもよい。（例えばNursing 2001 Drug Handbookの867 - 963頁を参照のこと）。

30

40

## 【0119】

前記少なくとも1種の免疫抑制剤は、アザチオプリン、バシリキシマブ、シクロスポリン、ダクリズマブ、リンパ球免疫グロブリン、ムロモナブ - CD3、ミコフェノール酸モ

50

フェチル、塩酸ミコフェノール酸モフェチル、シロリマスおよびタクロリムスから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のワクチンまたはトキソイドは、BCGワクチン、コレラワクチン、ジフテリアおよび破傷風トキソイド(沈降)、ジフテリア破傷風トキソイドおよび沈降無細胞百日咳ワクチン、ジフテリア破傷風トキソイドおよびホールセル百日咳ワクチン、ヘモフィルスb共役ワクチン、A型肝炎ワクチン(不活化)、B型肝炎ワクチン(組換え型)、インフルエンザウイルスワクチン1999-2000三価タイプAおよびB(精製表面抗原)、インフルエンザウイルスワクチン1999-2000三価タイプAおよびB(サブピリオンまたは精製サブピリオン)、インフルエンザウイルスワクチン1999-2000三価タイプAおよびB(ホールピリオン)、日本脳炎ウイルスワクチン(不活化)、ライム病ワクチン(組換え型Os p A)、はしか・おたふく風邪・風疹ウイルスワクチン(生)、はしか・おたふく風邪・風疹ウイルスワクチン(弱毒化生)、はしかウイルスワクチン(弱毒化生)、髄膜炎菌多糖類ワクチン、おたふく風邪ウイルスワクチン(生)、ペストワクチン、肺炎球菌ワクチン(多価)、ポリオウイルスワクチン(不活化)、ポリオウイルスワクチン(生、経口、三価)、狂犬病ワクチン(沈降)、狂犬病ワクチン(ヒト2倍体細胞)、風疹・おたふく風邪ウイルスワクチン(生)、風疹ウイルスワクチン(生、弱毒化)、破傷風トキソイド(沈降)、破傷風トキソイド(流体)、腸チフスワクチン(経口)、腸チフスワクチン(非経口)、腸チフスVi多糖ワクチン、水痘ウイルスワクチンおよび黄熱病ワクチンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗毒素薬または抗毒血清は、クロゴケグモ抗毒血清、クロタリダエ抗毒血清(多価)、ジフテリア抗毒素(ウマ)およびサングヘビ抗毒素から選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の免疫血清は、サイトメガロウイルス免疫グロブリン(静脈内)、B型肝炎免疫グロブリン(ヒト)、免疫グロブリン筋肉内、免疫グロブリン静脈内、狂犬病免疫グロブリン(ヒト)、呼吸器合胞体ウイルス免疫グロブリン静脈内(ヒト)、Rh<sub>0</sub>(D)免疫グロブリン(ヒト)、Rh<sub>0</sub>(D)免疫グロブリン静脈内(ヒト)、破傷風免疫グロブリン(ヒト)および水痘帯状疱疹免疫グロブリンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の生物反応修飾物質は、アルデスロイキン、エポエチンアルファ、フィルグラスチム、注射用酢酸ガラティラメル、インターフェロンアルファコン-1、インターフェロンアルファ-2a(組換え型)、インターフェロンアルファ-2b(組換え型)、インターフェロンベータ-1a、インターフェロンベータ-1b(組換え型)、インターフェロンガンマ-1b、塩酸レバミゾール、オブレルベキンおよびサルグラモスティムから選択した少なくとも1種であってもよい。(例えばNursing 2001 Drug Handbookの964-1040頁を参照のこと)。

#### 【0120】

前記少なくとも1種の眼科用抗感染薬は、パシトラシン、クロラムフェニコール、塩酸シプロフロキサシン、エリスロマイシン、硫酸ゲンタマイシン、オフロキサシン0.3%、硫酸ポリミキシンB、スルファセタミドナトリウム10%、スルファセタミドナトリウム15%、スルファセタミドナトリウム30%、トブラマイシンおよびビダラビンから選択可能である。前記少なくとも1種の眼科用抗炎症薬は、デキサメタゾン、燐酸デキサメタゾンナトリウム、ジクロフェナクナトリウム0.1%、フルオロメトロン、フルルピプロフェンナトリウム、ケトロラクトロメタミン、酢酸プレドニゾロン(懸濁液)および燐酸プレドニゾロンナトリウム(溶液)から選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の縮瞳薬は、塩化アセチルコリン、カルバコール(眼球内)、カルバコール(局所)、ヨウ化エコチオフェート、ピロカルピン、塩酸ピロカルピンおよび硝酸ピロカルピンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の散瞳薬は、硫酸アトロピン、塩酸シクロペントレート、塩酸エピネフリン、ホウ酸エピネフリル、臭化水素酸ホマトロピン、塩酸フェニルエフリン、臭化水素酸スコポラミンおよびトロピカミドから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の眼科用血管収縮薬は、塩酸ナファゾリン、塩酸オキシメタゾリンおよび塩酸テトラヒドロゾリンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のいろいろな眼科用薬剤は、塩

10

20

30

40

50

酸アブラクロニジン、塩酸ベタキソロール、酒石酸ブリモニジン、塩酸カルテオロール、塩酸ジピペフリン、塩酸ドルゾラミド、ニフマル酸エメダスチン、フルオレセインナトリウム、フマル酸ケトチフェン、ラタノプロスト、塩酸レボブノロール、塩酸メチプラノロール、塩化ナトリウム（高浸透圧）およびマレイン酸チモロールから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の耳用薬剤は、ホウ酸、過酸化カルバミド、クロラムフェニコールおよびトリエタノールアミンポリペプチドオレート凝集物から選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の鼻用薬剤は、ジプロピオン酸ベクロメタゾン、ブデソニド、硫酸エフェドリン、塩酸エピネフリル、フルニゾリド、プロピオン酸フルチカゾン、塩酸ナファゾリン、塩酸オキシメタゾリン、塩酸フェニルフリン、塩酸テトラヒドロゾリン、トリアムシノロンアセトニドおよび塩酸キシロメタゾリンから選択した少なくとも1種であってもよい。（例えばNursing 2001 Drug Handbookの1041-97頁を参照のこと）。

10

## 【0121】

前記少なくとも1種の抗感染薬は、アシクロビル、アンホテリシンB、アゼライン酸クリーム、バシトラシン、硝酸ブトコナゾール、燐酸クリンダマイシン、クロトリマゾール、硝酸エコナゾール、エリスロマイシン、硫酸ゲンタマイシン、ケトコナゾール、酢酸マフェニド、メトロニダゾール（局所）、硝酸ミコナゾール、ムピロシン、塩酸ナフチフィン、硫酸ネオマイシン、ニトロフラゾン、ニスタチン、スルファジアジン銀、塩酸テルピナフィン、テルコナゾール、塩酸テトラシクリン、チオコナゾールおよびトルナフテートから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の抗疥癬薬またはシラミ駆除剤は、クロタミトン、リンダン、ペルメトリンおよびピレトリンから選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種の外用副腎皮質ホルモン剤は、ジプロピオン酸ベタメタゾン、吉草酸ベタメタゾン、プロピオン酸クロベタゾール、デソニド、デソキシメタゾン、デキサメタゾン、燐酸デキサメタゾンナトリウム、二酢酸ジフロラゾン、フルオシノロンアセトニド、フルオシノニド、フルランドレノリド、プロピオン酸フルチカゾン、ハルシノニド、ヒドロコルチゾン、酢酸ヒドロコルチゾン、酪酸ヒドロコルチゾン、吉草酸ヒドロコルチゾン、モメタゾンフロエートおよびトリアムシノロンアセトニドから選択した少なくとも1種であってもよい（例えばNursing 2001 Drug Handbookの1098-1136頁を参照のこと）。

20

## 【0122】

前記少なくとも1種のビタミンもしくはミネラルは、ビタミンA、ビタミンB複合体、シアノコバラミン、葉酸、ヒドロキソコバラミン、ロイコボリンカルシウム、ナイアシン、ナイアシンアミド、塩酸ピリドキシン、リボフラビン、塩酸チアミン、ビタミンC、ビタミンD、コレカルシフェロール、エルゴカルシフェロール、ビタミンD類似体、ドキシセルカルシフェロール、パリカルシトール、ビタミンE、ビタミンK類似体、フィトナジオン、フッ化ナトリウム、フッ化ナトリウム（局所）、微量元素、クロム、銅、ヨウ素、マンガン、セレンおよび亜鉛から選択した少なくとも1種であってもよい。前記少なくとも1種のカロリー薬は、アミノ酸輸液（結晶）、デキストロースに入っているアミノ酸輸液、電解質を伴うアミノ酸輸液、デキストロースに入っている電解質を伴うアミノ酸輸液、肝不全用アミノ酸輸液、高代謝的ストレス用アミノ酸輸液、腎不全用アミノ酸輸液、デキストロース、脂肪乳剤および中鎖脂肪酸トリグリセリドから選択した少なくとも1種であってもよい。（例えばNursing 2001 Drug Handbookの1137-63頁を参照のこと）。

30

40

## 【0123】

本発明の抗-IL-6抗体組成物には、更に、そのような調節、処置または治療を必要としている細胞、組織、器官、動物または患者に接触または投与すべき少なくとも1種の抗-IL-6抗体を含有しかつ場合により更に少なくとも1種のTNFアンタゴニスト〔例えばこれらに限定するものでないが、TNF化学もしくは蛋白質アンタゴニスト、TNFモノクローナルもしくはポリクローナル抗体もしくはフラグメント、可溶TNF受容体（例えばp55、p70またはp85）またはフラグメント、その融合ポリペプチドま

50

たは低分子TNFアンタゴニスト、例えばTNF結合蛋白質IまたはII(TBP-1またはTBP-II)、ネレリモンマブ、インフリキシマブ、エタネルセプト、CDP-571、CDP-870、アフェリモマブ、レネルセプトなど]、抗リウマチ剤(例えばメトトレキサート、オーラノフィン、アウロチオグルコース、アザチオプリン、エタネルセプト、金チオリンゴ酸ナトリウム、硫酸ヒドロキシクロロキン、レフルノミド、スルファサルジン)、筋弛緩薬、睡眠薬、非ステロイド抗炎症薬(NSAID)、鎮痛薬、麻酔薬、鎮痛剤、局所麻酔薬、神経筋遮断薬、抗菌剤(例えばアミノグリコシド、抗真菌薬、抗寄生虫薬、抗ウイルス薬、カルバペネム、セファロスポリン、フルロルキノロン、マクロリド、ペニシリン、スルホンアミド、テトラシクリン、別の抗菌剤)、乾癬治療薬、コルチコステロイド、蛋白同化ステロイド、糖尿病関連薬、ミネラル、栄養剤、甲状腺用薬剤、ビタミン、カルシウム関連ホルモン、下痢止め薬、鎮咳薬、制吐薬、抗腫瘍薬、下剤、抗凝血薬、エリスロポイエチン(例えばエポエチンアルファ)、フィルグラスチム(例えばG-CSF、Neupogen)、サルグラモスチム(GM-CSF、Leukine)、予防接種、免疫グロブリン、免疫抑制剤(例えばバシリキシマブ、シクロスポリン、ダクリズマブ)、成長ホルモン、ホルモン補充薬、エストロゲン受容体モジュレーター、散瞳薬、毛様筋調節薬、アルキル化剤、代謝拮抗剤、分裂抑制因子、放射性薬剤、抗鬱薬、抗躁薬、抗精神病薬、抗不安薬、睡眠薬、交感神経様作用薬、興奮剤、ドネペジル、タクリン、喘息用薬剤、ベータ作用薬、ステロイド剤吸引、ロイコトリエン阻害剤、メチルキサンチン、クロモリン、エピネフリンまたは類似物、ドルナーゼアルファ(Pulmozyme)、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択した少なくとも1種を含有していてもよい少なくとも1種の適切な有効量の組成物もしくは製薬学的組成物のいずれも含まれ得る。そのようなサイトカインの非限定例には、これらに限定するものでないが、IL-1からIL-23(例えばIL-1、IL-2など)のいずれも含まれる。適切な投薬量は本技術分野で良く知られている。例えばWells他編集、Pharmacotherapy Handbook, 第2版、Appleton and Lange, Stamford, CT(2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia, 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA(2000), (これらの文献は各々引用することによって全体が本明細書に組み入れられる)を参照のこと。

#### 【0124】

そのような抗癌もしくは抗感染薬には、また、本発明の少なくとも1種の抗体と会わせるか、結合させるか、共調製するか或は共投与するトキシン分子も含まれ得る。そのようなトキシンは場合により病原性細胞または組織を選択的に死滅させる働きをし得る。そのような病原性細胞は癌細胞または他の細胞であり得る。そのようなトキシンは、これらに限定するものでないが、精製もしくは組換え型トキシン、またはトキシンの少なくとも1種の機能的細胞障害ドメインを含んで成るトキシンフラグメント、例えばリシン、ジフテリアトキシン、ベノムトキシンまたは細菌トキシンの中の少なくとも1種から選択したトキシンであってもよい。用語「トキシン」はまた天然に存在するか或は突然変異を起こしたか或は組換え型の細菌またはウイルスのいずれかが産生するエンドトキシンおよびエクソトキシンの両方も含まれ、それらはヒトおよび他の哺乳動物における病気状態のいずれかの原因になり得、それには、トキシンショック(結果として死亡する可能性がある)が含まれる。そのようなトキシンには、これらに限定するものでないが、腸管毒素原性大腸菌易熱性エンテロトキシン(LT)、耐熱性エンテロトキシン(ST)、シゲラ細胞毒素、アエロモナスエンテロトキシン、毒素性ショック症候群トキシン-1(TSST-1)、ブドウ球菌エンテロトキシンA(SEA)、B(SEB)またはC(SEC)、連鎖球菌エンテロトキシンなどが含まれ得る。前記細菌には、これらに限定するものでないが、腸管毒素原性大腸菌種(ETEC)、腸管出血性大腸菌種(例えば血清型株0157:H7)、ブドウ球菌種(例えば黄色ブドウ球菌、化膿ブドウ球菌)、シゲラ種(例えばシゲラディゼンテリエ、シゲラフレキシネリ、シゲラボイジイおよびシゲラソネイ)、サル

10

20

30

40

50

モネラ種（例えばチフス菌、サルモネラコレラスイス、腸炎菌）、クロストリジウム種（例えばウェルシュ菌、クロストリジウムジフィサイル、ボツリヌス菌）、カンフロバクター種（例えばカンフロバクタージェジュニ、カンフロバクターフェタス）、ヘリコバクター種（例えばピロリ菌）、アエロモナス種（例えばアエロモナスソブリア、アエロモナス細菌、アエロモナスカビアエ）、ブレイソモナスシゲロイデス、エルシニアエンテロコリチカ、ビブリオ種（例えばビブリオコレラ、腸炎ビブリオ）、クレブシエラ種、緑膿菌および連鎖球菌の株が含まれる。例えばStein編集、INTERNAL MEDICINE、第3版、1 - 13頁、Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans 他編集、Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 第2版、239 - 254頁、Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell 他、Principles and Practice of Infectious Diseases, 第3版、Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow 他編集、The Merck Manual, 第16版、Merck and Co., Rahway, N. J., 1992; Wood 他、FEMS Microbiology Immunology, 76: 121 - 134 (1991); Marrack 他、Science, 248: 705 - 711 (1990), (これらの文献の内容は引用することによって全体が本明細書に組み入れられる)を参照のこと。

10

## 【0125】

20

本発明の抗 - I L - 6 抗体化合物、組成物または組み合わせに更に適切な全ての助剤、例えばこれらに限定するものでないが、希釈剤、結合剤、安定剤、緩衝剤、塩、親油性溶媒、防腐剤、アジュバントなどの中の少なくとも1種を含有させることも可能である。製薬学的に受け入れられる助剤が好適である。前記無菌溶液の非限定例および製造方法は本技術分野、例えばこれらに限定するものでないが、Gennaro編集、Remington's Pharmaceutical Sciences、第18版、Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990などで良く知られている。製薬学的に受け入れられる担体は、本技術分野で良く知られているか或は本明細書に記述するように、本抗 - I L - 6 抗体、フラグメントまたは変異体組成物の投与様式、溶解性および安定性に適するように常規通り選択可能である。

30

## 【0126】

本組成物で用いるに有用な製薬学的賦形剤および添加剤には、これらに限定するものでないが、蛋白質、ペプチド、アミノ酸、脂質および炭水化物 [例えば糖 (単糖、二糖、三糖、四糖およびオリゴ糖を包含)、誘導体化糖、例えばアルジトール、アルドン酸、エステル化糖など、および多糖または糖重合体) が含まれ、これらを単独または組み合わせて存在させてもよく、それには、単独または1 - 99.99重量%または体積%の組み合わせが含まれる。典型的な蛋白質賦形剤には血清アルブミン、例えばヒト血清アルブミン (HSA)、組換え型ヒトアルブミン (rHA)、ゼラチン、カゼインなどが含まれる。代表的なアミノ酸 / 抗体成分 (これはまた緩衝能力としても機能し得る) には、アラニン、グリシン、アルギニン、ペタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルタムなどが含まれる。1つの好適なアミノ酸はグリシンである。

40

## 【0127】

本発明で用いるに適した炭水化物賦形剤には、例えば単糖類、例えばフルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、D - マンノース、ソルボースなど、二糖類、例えばラクトース、スクロース、トレハロース、セロビオースなど、多糖類、例えばラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、澱粉など、およびアルジトール、例えばマンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトールソルビトール (グルシトール)、ミオイノシトールなどが含まれる。本発明で用いるに適した好適な炭水化物賦形剤はマンニトール、トレハロースおよびラフィノースである。

50

## 【0128】

抗 - I L - 6 抗体組成物にまた緩衝剤または pH 調節剤を含有させることも可能であり、そのような緩衝剤は典型的に有機酸または塩基から生じさせた塩である。代表的な緩衝剤には有機酸塩、例えばクエン酸、アスコルビン酸、グルコン酸、炭酸、酒石酸、こはく酸、酢酸またはフタル酸などの塩、T r i s、塩酸トロメタミンまたはリン酸塩緩衝剤が含まれる。本組成物で用いるに適した好適な緩衝剤は有機酸塩、例えばクエン酸塩などである。

## 【0129】

加うるに、本発明の抗 - I L - 6 抗体組成物に重合体賦形剤 / 添加剤、例えばポリビニルピロリドン、フィコール（高分子量糖）、デキストレート（例えばシクロデキストリン、例えば 2 - ヒドロキシプロピル - シクロデキストリン）、ポリエチレングリコール、風味剤、抗菌剤、甘味剤、抗酸化剤、帯電防止剤、界面活性剤（例えばポリソルベート、例えば「T W E E N 20」および「T W E E N 80」）、脂質（例えば燐脂質、脂肪酸）、ステロイド（例えばコレステロール）およびキレート剤（例えば E D T A ）などが含まれ得る。

## 【0130】

本発明に従う抗 - I L - 6 抗体、部分または変異体組成物で用いるに適した前記および追加的公知製薬学的賦形剤および / または添加剤は本技術分野で公知であり、例えば “ R e m i n g t o n : T h e S c i e n c e & P r a c t i c e o f P h a r m a c y ” 第 19 版、W i l l i a m s & W i l l i a m s , ( 1 9 9 5 ) , および “ P h y s i c i a n ’ s D e s k R e f e r e n c e ” 第 52 版、M e d i c a l E c o n o m i c s , M o n t v a l e , N J ( 1 9 9 8 ) , ( これらの開示は引用することによって全体が本明細書に組み入れられる ) に示されているように公知である。好適な担体もしくは賦形剤は炭水化物（例えば糖およびアルジトール）および緩衝剤（例えばクエン酸塩）または高分子作用剤である。典型的な担体分子はムコ多糖、ヒアルロン酸であり、これは関節内送達で用いるに有用であり得る。

## 【0131】

## 製剤

この上で述べたように、本発明は、少なくとも 1 種の抗 - I L - 6 抗体が製薬学的に受け入れられる製剤の中に入っている安定な製剤（好適にはリン酸塩緩衝剤に加えて食塩水または選択した塩を含有して成る）ばかりでなく防腐剤を含有させた防腐処理溶液および製剤、並びに製薬学または獣医用途で用いるに適した多用途防腐処理製剤を提供する。防腐処理製剤は水性希釈剤に入っている少なくとも 1 種の公知防腐剤を含有するか或は場合により少なくとも 1 種のフェノール、m - クレゾール、p - クレゾール、o - クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、亜硝酸フェニル水銀、フェノキシエタノール、ホルムアルデヒド、クロロブタノール、塩化マグネシウム（例えば六水化物）、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチルなど）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゾエトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサルなど、その重合体または混合物から成る群から選択した防腐剤を含有する。本技術分野で公知の如く適切な如何なる濃度も混合物も使用可能であり、例えば約 0 . 0 0 1 5 %、または如何なる範囲でも値でも分率でも使用可能である。非限定例には、防腐剤無し、約 0 . 1 - 2 % の m - クレゾール（例えば 0 . 2、0 . 3、0 . 4、0 . 5、0 . 9、1 . 0 %）、約 0 . 1 - 3 % のベンジルアルコール（例えば 0 . 5、0 . 9、1 . 1、1 . 5、1 . 9、2 . 0、2 . 5 %）、約 0 . 0 0 1 - 0 . 5 % のチメロサル（例えば 0 . 0 0 5、0 . 0 1）、約 0 . 0 0 1 - 2 . 0 % のフェノール（例えば 0 . 0 5、0 . 2 5、0 . 2 8、0 . 5、0 . 9、1 . 0 %）、0 . 0 0 0 5 - 1 . 0 % のアルキルパラベン 1 種または 2 種以上（例えば 0 . 0 0 0 7 5、0 . 0 0 0 9、0 . 0 0 1、0 . 0 0 2、0 . 0 0 5、0 . 0 0 7 5、0 . 0 0 9、0 . 0 1、0 . 0 2、0 . 0 5、0 . 0 7 5、0 . 0 9、0 . 1、0 . 2、0 . 3、0 . 5、0 . 7 5、0 . 9、1 . 0 %）などが含まれる。

## 【0132】

この上に示したように、本発明は、包装用材料と少なくとも1つに瓶を含んで成る製品を提供し、前記瓶に、少なくとも1種の抗-I L - 6抗体に加えて指定緩衝剤および/または防腐剤が場合により水性希釈剤に入っている溶液を入れ、ここで、前記包装用材料に、前記溶液を1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72時間またはそれ以上の時間に渡って保持することができることを示すラベルを含める。本発明は、更に、包装用材料と凍結乾燥させた少なくとも1種の抗-I L - 6抗体が入っている1番目の瓶と指定緩衝剤もしくは防腐剤を含有する水性希釈剤が入っている2番目の瓶を含んで成る製品も包含し、ここで、前記包装用材料に、前記少なくとも1種の抗-I L - 6抗体を前記水性希釈剤に入れて再構成させて24時間またはそれ以上の時間に渡って保持することができる溶液を生じさせることを患者に知らせるラベルを含める。

10

**【0133】**

本発明に従って用いる少なくとも1種の抗-I L - 6抗体の製造は組換え手段(哺乳動物の細胞または遺伝子導入を用いた調製を包含)を用いて実施可能であるか、或は本明細書に記述するか或は本技術分野で公知のように、それを他の生物学的源から精製することも可能である。

**【0134】**

本発明の製品に入れる少なくとも1種の抗-I L - 6抗体の量の範囲には、再構成時(湿潤/乾燥系で実施する場合)に約1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ から約1000  $\text{mg}/\text{ml}$ の濃度をもたらされるような量が含まれるが、より低い濃度およびより高い濃度も有効であり、これは意図した送達用媒体に依存し、例えば溶液製剤のそれは経皮パッチ、肺、経粘膜または浸透圧またはマイクロポンプ方法のそれとは異なるであろう。

20

**【0135】**

好適には、前記水性希釈剤に場合により更に製薬学的に受け入れられる防腐剤も入れておいてもよい。好適な防腐剤には、フェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン(メチル、エチル、プロピル、ブチルなど)、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゾエトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサルなどまたはそれらの混合物から成る群から選択した防腐剤が含まれる。本製剤で用いる防腐剤の濃度は、抗菌効果をもたらすに十分な濃度である。そのような濃度は選択した防腐剤に依存するが、本分野の技術者はそれを容易に決定することができるであろう。

30

**【0136】**

前記希釈剤に場合によるが好適には他の賦形剤、例えば等張剤、緩衝剤、抗酸化剤および防腐向上剤などを加えることも可能である。等張剤、例えばグリセリンなどを一般に公知濃度で用いる。好適には、pH制御を向上させる目的で生理学的に許容される緩衝剤を加える。本製剤のpHの範囲は幅広い範囲に渡り、例えば約pH4から約pH10の範囲であってもよいが、好適な範囲は約pH5から約pH9であり、最も好適な範囲は約6.0から約8.0である。本発明の製剤のpHを好適には約6.8から約7.8の範囲にする。好適な緩衝剤には、燐酸塩緩衝剤、最も好適には燐酸ナトリウム、特に燐酸塩緩衝食塩水(PBS)が含まれる。

40

**【0137】**

場合により、他の添加剤、例えばTween 20[ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート]、Tween 40[ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノパルミテート]、Tween 80[ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノオレート]、Pluronic F68(ポリオキシエチレンとポリオキシプロピレンのブロック共重合体)およびPEG(ポリエチレングリコール)などの如き製薬学的に受け入れられる可溶化剤または非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート20もしくは80またはポロキサマー184または188、Pluronic(商標)ポリル、他のブロック共重合体およびキレーター、例えばEDTAおよびEGTAなどを本製剤または組成物に添加することで凝集度合を低くすることも可能である。特に、本製剤を投与する時にポ

50

ンプまたはプラスチック製容器を用いる場合にそのような添加剤が有用である。製薬学的に受け入れられる界面活性剤を存在させると蛋白質が凝集する傾向が軽減される。

【0138】

本発明の製剤の調製は、少なくとも1種の抗-IL-6抗体とフェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチルなど）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゾエトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサルなどまたはそれらの混合物から成る群から選択した防腐剤を水性希釈剤に入れて混合することを含んで成る方法を用いて実施可能である。前記少なくとも1種の抗-IL-6抗体と防腐剤を水性希釈剤に入れて混合することを通常の溶解および混合手順を用いて実施する。適切な製剤を生じさせるには、例えば測定量の少なくとも1種の抗-IL-6抗体を緩衝溶液に入れてそれを本蛋白質および防腐剤が所望の濃度になるに充分な量で緩衝溶液に入れておいた所望防腐剤と一緒にする。本分野の通常の技術者はそのような方法の変法を認識するであろう。例えば、前記成分を添加する順、追加的添加剤を用いるか否か、当該製剤を調製する時の温度およびpHは全部が使用する濃度および投与手段毎に最適にすることができる要因である。

10

【0139】

本請求する製剤を患者に透明な溶液としてか或は凍結乾燥させた少なくとも1種の抗-IL-6抗体が入っている瓶とこれを再構成させる時の水、防腐剤および/または賦形剤、好適には燐酸塩緩衝剤および/または食塩水および選択した塩（水性希釈剤の中に入っている）が入っている2番目の瓶を包含する2個の瓶として供給してもよい。溶液が入っている単一の瓶または再構成が必要な2個の瓶のいずれも多数回再使用可能であり、患者の処置を1回または多数回実施するに充分であり得、従って、現在利用可能な処置療法に比べてより便利であり得る。

20

【0140】

この請求する製品は、即時から24時間またはそれ以上の範囲の時間に渡って投与するに有用である。従って、この請求する製品は患者に大きな利点を与える。本発明の製剤は場合により約2 から約40 の温度で安全に貯蔵可能でありかつ本蛋白質が示す生物学的活性を長期間に渡って維持させ、従ってその溶液を6、12、18、24、36、48、72または96時間またはそれ以上の時間に渡って保持しそして/または使用することができることを示すパッケージラベルを付けることを可能にする。防腐処理希釈剤を用いると、そのようなラベルに1-12カ月、半年、1年半および/または2年に及ぶ使用を含めることも可能である。

30

【0141】

本発明の少なくとも1種の抗-IL-6抗体が入っている溶液の調製は、少なくとも1種の抗体を水性希釈剤に入れて混合することを含んで成る方法を用いて実施可能である。混合を通常の溶解および混合手順を用いて実施する。適切な希釈剤を生じさせるには、例えば、測定量の少なくとも1種の抗体を水または緩衝液に入れて、これを本蛋白質および場合により防腐剤または緩衝剤が所望濃度になるに充分な量で一緒にする。本分野の通常の技術者はそのような方法の変法を認識するであろう。例えば、前記成分を添加する順、追加的添加剤を用いるか否か、当該製剤を調製する時の温度およびpHは全部が使用する濃度および投与手段毎に最適にすることができる要因である。

40

【0142】

この請求する製品を患者に透明な溶液としてか或は凍結乾燥させた少なくとも1種の抗-IL-6抗体が入っている瓶とこれを再構成させる時の水性希釈剤が入っている2番目の瓶を包含する2個の瓶として供給してもよい。溶液が入っている単一の瓶または再構成が必要な2個の瓶のいずれも多数回再使用可能であり、患者の処置を1回または多数回実施するに充分であり得、従って、現在利用可能な処置療法に比べてより便利であり得る。

【0143】

透明な溶液としてか或は凍結乾燥させた少なくとも1種の抗-IL-6抗体が入ってい

50



る瓶とこれを再構成させる時の水性希釈剤が入っている 2 番目の瓶を包含する 2 個の瓶を薬局、診療所または他のそのような機関および施設に供給することを通して、この請求する製品を患者に間接的に供給してもよい。この場合の透明な溶液の大きさは 1 リットルまたはそれ以上の量であってもよく、大型の貯蔵槽を供給して、それから、その少なくとも 1 種の抗体溶液の少ない部分を取り出し、より小さい瓶に 1 回もしくは数回移し、そして薬局または診療所が顧客および / または患者に供給するようにしてもよい。

【 0 1 4 4 】

単一瓶システムを包含すると認識される機器には、溶液送達用ペンインジェクター機器、例えば BD Pens, BD Autojector<sup>(R)</sup>, Humaject<sup>(R)</sup>, Novopen<sup>(R)</sup>, B-D<sup>(R)</sup> Pen, AutoPen<sup>(R)</sup>, and OptiPen<sup>(R)</sup>, Genotropin Pen<sup>(R)</sup>, Genotronorm Pen<sup>(R)</sup>, Humatro Pen<sup>(R)</sup>, Reco-Pen<sup>(R)</sup>, Roferon Pen<sup>(R)</sup>, Biojector<sup>(R)</sup>, Iject<sup>(R)</sup>, J-tip Needle-Free Injector<sup>(R)</sup>, Intraject<sup>(R)</sup>, Medi-Ject<sup>(R)</sup> など [Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, [www.bectondickenson.com](http://www.bectondickenson.com)), Disetronic (Burgdorf, Switzerland, [www.disetronic.com](http://www.disetronic.com)); Bioject, Portland, Oregon ([www.bioject.com](http://www.bioject.com)); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK, [www.westonmedical.com](http://www.westonmedical.com)), Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, [www.mediject.com](http://www.mediject.com)) が製造または開発した如き] および同様な適切な機器が含まれる。2 個の瓶システムを包含すると認識される機器には、凍結乾燥薬剤をカートリッジの中で再構成させて前記再構成させた溶液を送達するペンインジェクターシステム、例えば Humatro Pen (商標) などが含まれる。他の適切な機器の例には、前以て充填されているシリンジ、オートインジェクター、針を必要としないインジェクターおよび針を必要としない IV 輸液セットが含まれる。

【 0 1 4 5 】

この請求する製品に包装用材料を含める。そのような包装用材料を用いて、規制当局が要求する情報に加えて、本製品の使用を可能にする条件を示す。本発明の包装用材料を用いて、2 個の瓶の湿潤 / 乾燥製品の場合には少なくとも 1 種の抗 - IL - 6 抗体を水性希釈剤に入れて再構成させて溶液を生じさせそしてその溶液を 2 - 24 時間またはそれ以上の時間に渡って用いることができることを示す使用説明書を患者に提供する。1 個の瓶の溶液製品の場合には、ラベルを用いて、そのような溶液を 2 - 24 時間またはそれ以上の時間に渡って用いることができることを示す。この請求する製品はヒト製薬学的製品使用で用いるに有用である。

【 0 1 4 6 】

本発明の薬剤の調製は、少なくとも 1 種の抗 - IL - 6 抗体と選択した緩衝液、好適には食塩または選択した塩を入れておいた磷酸塩緩衝液を混合することを含んで成る方法を用いて実施可能である。前記少なくとも 1 種の抗 - IL - 6 抗体と緩衝剤を水性希釈剤に入れて混合することを通常の溶解および混合手順を用いて実施する。適切な薬剤を生じさせるには、例えば測定量の少なくとも 1 種の抗体を水または緩衝液に入れてそれを本蛋白質および緩衝剤が所望の濃度になるに十分な量で水に入れておいた所望緩衝剤と一緒にする。本分野の通常の技術者はそのような方法の変法を認識するであろう。例えば、前記成分を添加する順、追加的添加剤を用いるか否か、当該薬剤を調製する時の温度および pH は全部が使用する濃度および投与手段毎に最適にすることができる要因である。

【 0 1 4 7 】

請求する安定もしくは防腐処理薬剤を患者に透明な溶液としてか或は凍結乾燥させた少なくとも 1 種の抗 - IL - 6 抗体が入っている瓶とこれを再構成させる時の防腐剤または緩衝剤と賦形剤 (水性希釈剤に入っている) が入っている 2 番目の瓶を包含する 2 個の瓶として供給してもよい。溶液が入っている単一の瓶または再構成が必要な 2 個の瓶のいず

10

20

30

40

50

れも多数回再使用可能であり、患者の処置を1回または多数回実施するに充分であり得、従って、現在利用可能な処置療法に比べてより便利であり得る。

【0148】

本抗-I L - 6抗体を安定にする他の調製または方法を用いると、結果として、本抗体を含有する凍結乾燥粉末の透明な溶液以外の液が生じる可能性もある。透明ではない溶液は、とりわけ、粒子状懸濁物が入っている製剤であり、前記粒子は寸法がいろいろな構造を有する抗-I L - 6抗体が入っている組成物であり、それは微小球、微小粒子、ナノ粒子、ナノ球またはリポソームとしていろいろな公知である。そのような活性薬剤が入っている相対的に均一で本質的に球形の粒子状製剤の調製は、米国特許第4,589,330号に教示されているように、その活性薬剤が入っている水相と重合体と非水性相を接触させた後に前記非水性相を蒸発させて前記水相の粒子を合体させることで実施可能である。多孔質微小粒子の調製は、米国特許第4,818,542号に教示されているように、活性薬剤が入っている1番目の相と連続溶媒の中に分散している重合体を用いその懸濁液から前記溶媒を凍結乾燥または希釈-抽出-沈澱などで除去することで実施可能である。そのような調製に好適な重合体は、ゼラチン、寒天、澱粉、アラビノガラクトン、アルブミン、コラーゲン、ポリグリコール酸、ポリ乳酸、グリコリド-L(-)ラクチドポリ(エプシロン-カプロラクトン、ポリ(エプシロン-カプロラクトン-コ-乳酸)、ポリ(エプシロン-カプロラクトン-コ-グリコール酸)、ポリ(-ヒドロキシ酪酸)、ポリエチレンオキサイド、ポリエチレン、ポリ(アルキル-2-シアノアクリレート)、ポリ(メタアクリル酸ヒドロキシエチル)、ポリアミド、ポリ(アミノ酸)、ポリ(2-ヒドロキシエチルDL-アスパルトアミド)、ポリ(エステル尿素)、ポリ(L-フェニルアラニン/エチレングリコール/1,6-ジイソシアナトヘキサン)およびポリ(メタアクリル酸メチル)から成る群から選択した天然もしくは合成共重合体もしくは重合体である。特に好適な重合体はポリエステル、例えばポリグリコール酸、ポリ乳酸、グリコリド-L(-)ラクチドポリ(エプシロン-カプロラクトン、ポリ(エプシロン-カプロラクトン-コ-乳酸)およびポリ(エプシロン-カプロラクトン-コ-グリコール酸)などである。そのような重合体および/または活性剤を溶解させるに有用な溶媒には、水、ヘキサフルオロイソプロパノール、塩化メチレン、テトラヒドロフラン、ヘキサン、ベンゼンまたはヘキサフルオロアセトンセスキ水化物が含まれる。活性剤含有相を2番目の相を用いて分散させる方法は、前記1番目の相をノズルの中のオリフィスに通して圧力で押し出すことで液滴を生じさせることを包含し得る。

【0149】

凍結乾燥以外の方法、例えば噴霧乾燥または蒸発による溶媒抽出または結晶性組成物を沈澱させた後に水性もしくは非水性溶媒を除去する段階を1つ以上設ける方法などを用いて乾燥粉末製剤を生じさせることも可能である。噴霧乾燥抗体製剤の調製が米国特許第6,019,968号に教示されている。抗体が基になった乾燥粉末組成物の調製は当該抗体と場合により賦形剤が溶媒に入っている溶液またはスラリーに噴霧乾燥を呼吸性乾燥粉末が生じる条件下で受けさせることで実施可能である。溶媒には、乾燥で容易に除去することができる極性化合物、例えば水およびエタノールなどが含まれ得る。その噴霧乾燥手順を酸素の存在無し、例えば窒素ブランケット下で実施するか或は窒素を乾燥用ガスとして用いることで抗体の安定性を向上させることができる。別の比較的乾燥した製剤は、WO 9916419に教示されているように、多数の穴開き微小構造物を典型的にはヒドロフルオロアルカン噴射剤が入っている懸濁用媒体に入れて分散させることで生じさせた分散液である。その安定な分散液を定量投与吸入装置を用いて患者の肺に投与してもよい。噴霧乾燥薬剤の商業的製造で用いるに有用な装置をBuchi Ltd.またはNiro Corp.が製造している。

【0150】

本発明に従い、本明細書に記述する少なくとも1種の抗-I L - 6抗体を安定または防腐処理製剤または溶液の状態が多様な送達方法を用いて患者に投与してもよく、そのような送達方法には、本技術分野で良く知られているように、SCもしくはIM注入、経皮、

10

20

30

40

50

肺、経粘膜、移植、浸透圧ポンプ、カートリッジ、マイクロポンプまたは本分野の技術者が理解するであろう他の手段が含まれる。

【0151】

治療用途

本発明は、また、本発明の少なくとも1種のIL-6抗体を用いて細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1種のIL-6関連疾患を本技術分野で公知のようにしてか或は本明細書に記述するようにして調節または処置する、例えば前記細胞、組織、器官、動物または患者にIL-6抗体を治療的に有効な量で投与または接触させることなどで調節または処置する方法も提供する。本発明は、また、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1種のIL-6関連疾患を調節または処置する方法も提供し、そのような疾患には、これらに限定するものでないが、肥満、免疫関連疾患、心臓血管疾患、感染症、悪性疾患または神経学的疾患の中の少なくとも1つが含まれる。

10

【0152】

本発明は、また、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1種のIL-6関連免疫関連疾患を調節または処置する方法も提供し、それには、これらに限定するものでないが、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、全身性発症若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎、胃潰瘍、血清反応陰性関節症、変形性関節症、骨溶解、整形外科用インプラントの無菌性緩み、炎症性大腸炎、潰瘍性大腸炎、全身性エリテマトーデス、皮膚エリテマトーデス、ループス腎炎、抗リン脂質症候群、光彩毛様体炎/ブドウ膜炎/視神経炎、突発性肺線維症、全身性血管炎/ヴェーゲナー肉芽種症、サルコイドーシス、精巣炎/精管切除術を戻す手術、アレルギー性疾患/アトピー性疾患、喘息、アレルギー性鼻炎、湿疹、アレルギー性接触皮膚炎、アレルギー性結膜炎、過敏性肺炎、移植、移植臓器拒絶、移植片対宿主病、全身性炎症反応症候群、敗血症症候群、グラム陽性菌敗血症、グラム陰性菌敗血症、培養陰性菌敗血症、真菌性敗血症、好中球減少性発熱、ウロセプシス(uriosepsis)、髄膜炎菌血症、外傷/出血、火傷、電離放射線暴露、急性膵炎、成人呼吸窮迫症候群、関節リウマチ、アルコール性肝炎、慢性炎症性病変、サルコイドーシス、クローン病変、鎌状赤血球貧血、糖尿病、ネフローゼ、アトピー性疾患、超過敏性反応、アレルギー性鼻炎、花粉症、通年性鼻炎、結膜炎、子宮内膜症、喘息、じんま疹、全身性アナファラキス(anaphalaxis)、皮膚炎、悪性貧血、溶血性疾患、血小板減少症、全ての臓器もしくは組織移植拒絶反応、腎臓移植拒絶反応、心臓移植拒絶反応、肝臓移植拒絶反応、膵臓移植拒絶反応、肺移植拒絶反応、骨髄移植(BMT)拒絶反応、皮膚同種移植拒絶反応、軟骨移植拒絶反応、骨移植拒絶反応、小腸移植拒絶反応、胎児胸腺移植拒絶反応、副甲状腺移植拒絶反応、全ての臓器または組織の異種移植拒絶反応、同種移植拒絶反応、抗受容体過敏性反応(anti-receptor hypersensitivity reactions)、グレーブス病、レイノー病、タイプBインスリン抵抗性糖尿病、喘息、重症筋無力症、抗体媒介細胞傷害、III型超過敏性反応、POEMS症候群[多発性神経障害、臓器肥大症、内分泌障害、単クローン性免疫グロブリン血症および皮膚変化症候群(skin changes syndrome)]、多発性神経障害、臓器肥大症、内分泌障害、単クローン性免疫グロブリン血症、皮膚変化症候群、抗リン脂質症候群、天疱瘡、強皮症、混合結合組織病、突発性アジソン病、糖尿病、慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、白斑、脈管炎、MI心臓切開術後症候群(post-MI cardiomy syndrome)、IV型過敏症(type IV hypersensitivity)、接触皮膚炎、過敏性肺炎、同種移植拒絶反応、細胞内生物による肉芽腫、薬物過敏性、代謝性/突発性ウィルソン病、ヘマクロマトーシス(hemachromatosis)、アルファ-1-アンチトリプシン欠乏症、糖尿病性網膜症、橋本甲状腺炎、骨粗しょう症、視床下部・下垂体・副腎系評価、原発性胆汁性肝硬変、甲状腺炎、脳脊髄炎、悪液質、嚢胞性線維症、新生児慢性肺病、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、家族性ヘマトファゴシチック(hematophagocytic)リンパ組織球増多症、皮膚病変、乾癬、脱毛症、ネフローゼ症候群、腎炎、糸球体腎炎、急性腎不全、血液透析、尿毒症、毒性(toxicity)、子癇前症、

20

30

40

50

okt3療法、抗-cd3療法、サイトカイン療法、化学療法、放射線療法（例えばこれらに限定するものでないが、無力症、貧血症、悪液質などが含まれる）、慢性サリチル酸塩中毒などの中の少なくとも1つが含まれる。例えばthe Merck Manual、12-17版、Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells 他編集、第2版、Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), (各々引用することによって全体が組み入れられる)を参照のこと。

#### 【0153】

本発明は、また、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1種の心臓血管病を調節または処置する方法も提供し、それには、これらに限定するものでないが、カーディアックスタン症候群 (cardiac stun syndrome)、心筋梗塞、うっ血性心不全、心臓発作、虚血発作、出血、急性冠症候群、動脈硬化、アテローム性動脈硬化症、動脈再狭窄、糖尿病性動脈硬化性疾患、高血圧、動脈性高血圧、腎血管性高血圧、失神、ショック、心血管系の梅毒、心不全、肺性心、原発性肺高血圧症、心不整脈、心房異所性拍動、心房粗動、心房細動 (持続性または発作性)、かん流後症候群 (post perfusion syndrome)、心肺バイパス炎症反応、カオス (chaotic) または多源生心房頻拍、レギュラーナロー (regular narrow) QRS 頻拍、特異 (specific) 不整脈、心室細動、ヒス束不整脈 (His bundle arrhythmias)、房室ブロック、脚ブロック、虚血性心筋疾患、冠動脈疾患、狭心症、心不全、心筋症、拡張性うっ血性心筋症、拘束型心筋症、心臓弁膜症、心内膜炎、心膜疾患、心臓腫瘍、大動脈瘤および抹消動脈瘤、大動脈解離、大動脈の炎症、腹部大動脈および分枝の閉塞、抹消血管障害、閉塞性動脈障害、抹消アテローム性動脈硬化症、閉塞性血栓性血管炎、機能的抹消動脈障害 (functional peripheral arterial disorders)、レイノー現象およびレイノー病、肢端チアノーゼ、肢端紅痛症、静脈疾患、静脈血栓症、静脈瘤、動静脈瘻、リンフェデルマ (lymphedema)、脂肪性浮腫、不安定狭心症、再かん流障害、ポストポンプ症候群 (post pump syndrome)、虚血-再かん流障害などの中の少なくとも1つが含まれる。そのような方法に、場合により、そのような修飾、処置または治療を必要としている細胞、組織、器官、動物または患者に少なくとも1種の抗-IL-6抗体を含有して成る組成物もしくは製薬学的組成物を有効量で投与することを含めることも可能である。

#### 【0154】

本発明は、また、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1種のIL-6関連感染疾患を調節または処置する方法も提供し、それには、これらに限定するものでないが、急性または慢性細菌感染、急性および慢性寄生もしくは感染過程 (細菌、ウイルスおよび菌・カビ感染を包含)、HIV感染/HIV神経障害、髄膜炎、肝炎 (例えばA、BまたはC型など)、敗血症性関節炎、腹膜炎、肺炎、喉頭蓋炎、大腸菌O157:h7、溶血性尿毒症症候群/血栓性血小板減少性紫斑病、マラリア、デング出血熱、リーシュマニア症、ハンセン病、毒素性ショック症候群、連鎖球菌筋炎、ガス壊疽、ヒト型結核菌、ヒト結核菌細胞内、ニューモシスティスカリニ肺炎、骨盤内炎症性疾患、精巣炎/エピソード (epididymitis)、レジオネラ菌、ライム病、インフルエンザ、エプスタイン・バーウイルス、ウイルス関連ヘマトファゴシチック症候群、ウイルス性脳炎/無菌性髄膜炎などの中の少なくとも1つが含まれる。

#### 【0155】

本発明は、また、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1種のIL-6関連悪性疾患を調節または処置する方法も提供し、それには、これらに限定するものでないが、白血病、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、急性リンパ性白血病、B細胞、T細胞またはFAB ALL、急性骨髄性白血病 (AML)、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病 (CML)、慢性リンパ性白血病 (CLL)、ヘアリー細胞白血病

10

20

30

40

50

、骨髄異形成症候群（MDS）、リンパ腫、ホジキン病、悪性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、パーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、カボジ肉腫、結腸直腸癌、膵臓癌、上咽頭癌、悪性組織球増殖症、腫瘍随伴症候群／悪性カルシウム血症、固形腫瘍、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、頭部癌、頸部癌、遺伝性非腺腫性癌、ホジキンリンパ腫、肝癌、肺癌、非小細胞肺癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、腎細胞癌、精巣癌、腺癌、肉腫、悪性黒色腫、血管腫、転移性疾患、癌関連骨吸収、癌関連骨痛などの中の少なくとも1つが含まれる。

【0156】

本発明は、また、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1種のIL-6関連神経系疾患を調節または処置する方法も提供し、それには、これらに限定するものでないが、神経変性疾患、多発性硬化症、片頭痛、エイズによる認知症、脱髄疾患、例えば多発性硬化症および急性横断性脊髄炎；錐体外路疾患および小脳疾患、例えば皮質脊髄系の病変；基底核疾患；多動性運動障害、例えばハンチントン舞踏病および老人性舞踏病；薬剤誘発運動障害、例えばCNSドーパミン受容体を遮断する薬剤によって誘発される運動障害；運動不全疾患、例えばパーキンソン病；進行性核上性麻痺；小脳の構造的病変；脊髄小脳変性症、例えば脊髄性運動失調症、フリードライヒ失調症、小脳皮質変性症、多系統変性症（Mencel、Dejerine-Thomas、Shi-DragerおよびMachado-Joseph）；全身性疾患〔レフサム病、アベタリポプロテミア（abetalipoproteinemia）、運動失調、毛細血管拡張症およびミトコンドリアマルチシステム疾患（mitochondrial multi-system disorder）〕；脱髄コア（core）疾患、例えば多発性硬化症、急性横断性脊髄炎；および運動単位疾患、例えば神経原性筋萎縮症（前角細胞変性、例えば筋萎縮性側索硬化症、乳児脊髄性筋萎縮症および若年性脊髄性筋萎縮症）；アルツハイマー病、中年におけるダウン症；ディフューズレヴィー小体病（Diffuse Lewy body disease）；レヴィー小体型の老年性認知症；ウエルニッケ・コルサコフ症候群；慢性アルコール依存症；クロイツフェルト・ヤコブ病；亜急性硬化性全脳炎、ハレルフォルデン・スパッツ病；拳闘家認知症；神経外傷損傷（neurotraumatic injury）〔例えば脊髄損傷、脳損傷、脳震盪、反復性脳震盪（repetitive concussion）〕；痛覚；炎症性痛覚；自閉症；鬱病；発作；認識力障害；てんかんなどの中の少なくとも1つが含まれる。そのような方法に、場合により、そのような修飾、処置または治療を必要としている細胞、組織、器官、動物または患者に少なくとも1種のTNF抗体または指定部分または変異体含有して成る組成物もしくは製薬学的組成物を有効量で投与することを含めることも可能である。例えばthe Merck Manual、16版、Merck & Company、Rahway、NJ（1992）を参照のこと。

【0157】

本発明は、また、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1種のIL-6関連創傷、外傷または組織傷害または関連慢性状態を調節または処置する方法も提供し、それには、これらに限定するものでないが、肉体的損傷または口腔外科手術〔歯根膜手術、抜糸、歯内療法、歯インプラント挿入（insertion of tooth implants）、義歯の適用および使用を包含〕に関連した外傷の中の少なくとも1つが含まれ、或は前記創傷は、非感染創、挫傷、切り傷、裂傷、非穿通創、開放創、穿通創、貫通創、刺創、汚染創、梗塞（infarctions）および皮下創から成る群から選択され、或は前記創傷は、虚血性潰瘍、床擦れ、瘻、ひどい噛み傷、熱傷およびドナー部位創傷（donor site wounds）から成る群から選択され、或は前記創傷は、アフタ性創傷、外傷性創傷またはヘルペス関連創傷である。

【0158】

創傷および／または潰瘍は一般に皮膚または粘膜表面から突き出ているか或は器官の中の梗塞（「脳梗塞」）の結果として見られる。創傷は軟組織欠陥または病巣または下に位置する状態の結果として生じ得る。これに関連して、用語「皮膚」は動物（ヒトを包含）

10

20

30

40

50

の体の最外表面に関し、無傷またはほとんど無傷の皮膚ばかりでなく傷害のある皮膚表面を包含する。用語「粘膜」は、動物、例えばヒトなどの損傷を受けたか或は損傷を受けていない粘膜に関し、口、口腔、肛門、鼻、肺、目、胃腸、膣または直腸の粘膜であり得る。

【 0 1 5 9 】

これに関連して、用語「創傷」は、組織構造の正常な一体性の崩壊を伴う体損傷を表す。この用語にまた用語「痛み」、「病巣」、「壊死」および「潰瘍」も包含させることを意図する。一般に、用語「痛み」は、皮膚または粘膜のほとんど全ての病巣に関する一般的用語であり、用語「潰瘍」は、器官または組織の表面の局所的欠陥または掘削であり、これは壊死組織の腐肉形成によって生じる。病巣は一般に全ての組織欠陥に関する。壊死は、感染、損傷、炎症または梗塞の結果としてもたらされる死亡した組織に関する。

10

【 0 1 6 0 】

これに関連して用いる用語「創傷」は、全ての創傷（創傷の分類分けに関しては以下を参照）および治癒過程の所定段階〔治癒が始まる前の段階または外科切開の如き特定の創傷を生じさせる前の段階（予防的処置）を包含〕の創傷を示す。本発明に従って予防および/または処置することができる創傷の例は、例えば非感染創、挫傷、切り傷、裂傷、非穿孔創（即ち、皮膚は崩壊していないが下に位置する構造物に損傷が存在する創傷）、開放創、穿孔創、貫通創、刺創、汚染創、皮下創などである。痛みの例は、床擦れ、口内炎、クロムソア（chrome sores）、ヘルペス、褥創などである。潰瘍の例は、例えば消化性潰瘍、十二指腸潰瘍、胃潰瘍、痛風性潰瘍、糖尿病性潰瘍、高血圧性虚血性潰瘍、うっ血性潰瘍、下腿潰瘍（静脈性潰瘍）、舌下潰瘍、粘膜下潰瘍、症候性潰瘍、栄養障害性潰瘍、熱帯性潰瘍およびベネラル（venereal）潰瘍、例えば淋病（尿道炎、子宮頸内膜炎および直腸炎を包含）によって生じる潰瘍などである。本発明に従って成功裏に処置することができる創傷または痛みに関する状態は、火傷、炭疽、破傷風、ガス壊疽、猩紅熱、丹毒、白癬性毛瘡、毛囊炎、伝染性膿痂疹または水疱性伝染性膿痂疹などである。用語「創傷」と「潰瘍」および「創傷」と「痛み」の使用の間には特定の重なりがしばしば存在し、その上、これらの用語をしばしば無作為に用いる。従って、これに関連して、上述したように、用語「創傷」は用語「潰瘍」、「病巣」、「痛み」および「梗塞」を包含し、かつこれらの用語を特に明記しない限り無差別に用いる。

20

【 0 1 6 1 】

本発明に従って処置する創傷の種類には、また、（i）一般的創傷、例えば手術、外傷、感染、虚血、熱、化学的および水泡性創傷など、（ii）口腔に特異的な創傷、例えば摘出後の創傷、特にシスト（cysts）および膿瘍を処置することに関連した歯内創傷、細菌、ウイルスまたは自己免疫が源の潰瘍および病巣、機械的、化学的、熱、感染および苔癬状創傷など〔ヘルペス潰瘍、アフタ性口内炎、急性壊死性潰瘍性歯肉炎および口腔内しゃく熱症候群が具体例である〕、および（iii）皮膚上の創傷、例えば腫瘍、火傷（例えば化学的、熱）、病巣（細菌、ウイルス、自己免疫）、刺傷および外科切開なども含まれる。創傷を分類分けする別の方法は、（i）外科切開、小さな擦傷および小さな刺傷による小さな組織損失、または（ii）重大な組織損失として分類分けする方法である。後者の群には、虚血性潰瘍、床擦れ、癢、裂傷、ひどい刺傷、熱傷および供血者部位創傷（軟および硬組織）および梗塞が含まれる。

30

40

【 0 1 6 2 】

本発明に関連して重要な他の創傷は、虚血性潰瘍、床擦れ、癢、ひどい刺傷、熱傷および供血者部位創傷の如き創傷である。虚血性潰瘍および床擦れは、通常は治癒が非常に遅い創傷であり、特にそのようなケースでは、その患者にとって勿論治癒過程を向上させてより速めることが非常に重要である。その上、治癒が改善されかつ治癒がより迅速に起こると、そのような創傷に苦しんでいる患者の処置に伴う費用も顕著に少なくなる。

【 0 1 6 3 】

供血者部位創傷は、例えば体のある部分から硬組織を取り出して体の別の部分に移すこと、例えば移植に関連して移すことなどに関連して起こる創傷である。そのような手術の

50

結果として生じる創傷は非常に痛く、従って、治癒が改善されることは非常に価値のあることである。用語「皮膚」を非常に幅広い意味で用い、これに皮膚の表皮層および皮膚の表面が多少とも損傷を受けている場合にはまた皮膚の真皮層も含まれる。皮膚の表皮層は、角質層以外に、外側（上皮）層であり、そして皮膚のより深い所の結合組織層を真皮と呼ぶ。

【 0 1 6 4 】

本発明は、また、細胞、組織、器官、動物または患者における I L - 6 関連疾患（これらに限定するものでないが、免疫関連疾患、心臓血管疾患、感染、悪性および/または神経学的疾患の中の少なくとも1つを包含）としてこの上に挙げた他の病気の中でとりわけ変形性関節症、全身性エリテマトーデス、皮膚エリテマトーデス、ループス腎炎、2型糖尿病および慢性閉塞性肺疾患を調節または処置する方法も提供する。前記方法に、場合により、そのような調節、処置または治療を必要としている細胞、組織、器官、動物または患者に少なくとも1種の抗 - I L - 6 抗体を含有して成る少なくとも1種の組成物もしくは製薬学的組成物を有効量で投与することを含めてもよい。

【 0 1 6 5 】

本発明の方法はいずれもそのような修飾、処置または治療を必要としている細胞、組織、器官、動物または患者に少なくとも1種の抗 - I L - 6 抗体を含有して成る組成物もしくは製薬学的組成物を有効量で投与することを含んで成り得る。前記方法に、場合により更に、そのような病気または疾患を処置するための共投与または組み合わせ治療を含めることも可能であり、その場合、前記少なくとも1種の抗 - I L - 6 抗体、これの特定部分または変異体の投与に、更に、少なくとも1種の T N F アンタゴニスト [ 例えばこれらに限定するものでないが、T N F の化学的もしくは蛋白質アンタゴニスト、T N F のモノクローナルもしくはポリクローナル抗体もしくはフラグメント、可溶 T N F 受容体（例えば p 5 5、p 7 0 または p 8 5 ）またはフラグメント、その融合ポリペプチドまたは低分子 T N F アンタゴニスト、例えば T N F 結合蛋白質 I または I I（T B P - 1 または T B P - I I）、ネレリモンマブ、インフリキシマブ、エタネルセプト [ E n b r e l（商標）]、アダリムラブ [ H u m i r a（商標）]、C D P - 5 7 1、C D P - 8 7 0、アフエリモマブ、レネルセブなど]、抗リウマチ剤（例えばメトトレキサート、オーラノフィン、アウロチオグルコース、アザチオプリン、金チオリンゴ酸ナトリウム、硫酸ヒドロキシクロロキソン、レフルノミド、スルファサルジン）、筋弛緩薬、睡眠薬、非ステロイド抗炎症薬（N S A I D）、鎮痛薬、麻酔薬、鎮痛剤、局所麻酔薬、神経筋遮断薬、抗菌剤（例えばアミノグリコシド、抗真菌薬、抗寄生虫薬、抗ウイルス薬、カルバペネム、セファロスポリン、フルロルキノロン、マクロリド、ペニシリン、スルホンアミド、テトラシクリン、別の抗菌剤）、乾癬治療薬、コルチコステロイド、蛋白同化ステロイド、糖尿病関連薬、ミネラル、栄養剤、甲状腺用薬剤、ビタミン、カルシウム関連ホルモン、下痢止め薬、鎮咳薬、制吐薬、抗腫瘍薬、下剤、抗凝血薬、エリスロポイエチン（例えばエポエチンアルファ）、フィルグラスチム（例えば G - C S F、N e u p o g e n）、サルグラモスチム（G M - C S F、L e u k i n e）、予防接種、免疫グロブリン、免疫抑制剤（例えばバシリキシマブ、シクロスポリン、ダクリズマブ）、成長ホルモン、ホルモン補充薬、エストロゲン受容体モジュレーター、散瞳薬、毛様筋調節薬、アルキル化剤、代謝拮抗剤、分裂抑制因子、放射性医薬品、抗鬱薬、抗躁薬、抗精神病薬、抗不安薬、睡眠薬、交感神経様作用薬、興奮剤、ドネペジル、タクリン、喘息用薬剤、ベータ作用薬、ステロイド剤吸引、ロイコトリエン阻害剤、メチルキサンチン、クロモリン、エピネフリンまたは類似物、ドルナーゼアルファ（P u l m o z y m e）、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択した少なくとも1種を前以て、同時および/または後に投与することも含める。適切な投薬は本技術分野で良く知られている。例えば W e l l s 他編集、P h a r m a c o t h e r a p y H a n d b o o k、第2版、A p p l e t o n a n d L a n g e, S t a m f o r d, C T ( 2 0 0 0 ); P D R P h a r m a c o p o e i a, T a r a s c o n P o c k e t P h a r m a c o p o e i a 2 0 0 0, 豪華版、T a r a s c o n P u b l i s h i n g, L o m a L i n d a, C A ( 2 0 0

10

20

30

40

50

0) ; Nursing 2001 Handbook of Drugs , 第21版、Springhouse Corp. , Springhouse , PA , 2001 ; Health Professional's Drug Guide 2001 , 編集、Shannon , Wilson , Stang , Prentice - Hall , Inc , Upper Saddle River , NJ . (これらの文献の各々は引用することによって全体が本明細書に組み入れられる)を参照のこと。

【0166】

本発明の組成物、組み合わせ治療、共投与、機器および/または方法(更に本発明の少なくとも1種の抗体、これの特定部分および変異体も含んで成る)に適切なTNFアンタゴニストには、これらに限定するものでないが、抗-TNF抗体(例えばこの上で定義した如き少なくとも1種のTNFアンタゴニスト)、これの抗原結合フラグメント、およびTNFと特異的に結合する受容体分子; TNF合成、TNF放出またはそれが標的細胞に対して示す作用を防止および/または抑制する化合物、例えばタリドミド、テニダップ、ホスホジエステラーゼ阻害剤(例えばペントキシフィリンおよびロリプラム)、A2bアデノシン受容体アゴニストおよびA2bアデノシン受容体強化薬など; TNF受容体のシグナル伝達を防止および/または抑制する化合物、例えばマイトジェン活性化蛋白質(MAP)キナーゼ阻害剤など; 膜TNF開裂を阻害および/または抑制する化合物、例えばメタロプロテイナーゼ阻害剤など; TNF活性を阻害および/または抑制する化合物、例えばアンジオテンシン変換酵素(ACE)阻害剤(例えばカプトプリル)など; およびTNFの産生および/または合成を阻害および/または抑制する化合物、例えばMAPキナーゼ阻害剤などが含まれる。

【0167】

本明細書で用いる如き「腫瘍壊死因子抗体」、「TNF抗体」、「TNF抗体」またはフラグメントなどは、TNF活性をインビトロ、インシトウおよび/または好適にはインビボで低下、阻害、抑制、無効または妨害する。例えば、本発明の適切なTNFヒト抗体はTNFと結合する能力を有し、それにはTNFと特異的に結合する抗-TNF抗体、これの抗原結合フラグメントおよび特定の変異体またはドメインが含まれる。また、適切なTNF抗体またはフラグメントもTNFのRNA、DNAまたは蛋白質の合成、TNFの放出、TNF受容体のシグナル伝達、膜TNFの開裂、TNFの活性、TNFの産生および/または合成を低下、阻害、無効、妨害、防止および/または抑制し得る。

【0168】

TNF抗体もしくはアンタゴニストの例はキメラ抗体cA2である。本発明で使用可能なモノクローナル抗-TNF抗体の追加的例は本技術分野で記述されている[例えば米国特許第5,231,024号; Moller, A他、Cytokine 2(3):162-169(1990); 米国出願番号07/943,852(1992年9月11日付けで出願); Rathjen他の国際公開番号WO 91/02078(1991年2月21日付けで公開); Rubin他のEPO特許公開番号0218868(1987年4月22日付けで公開); Yone他のEPO特許公開番号0288088(1988年10月26日); Liang, 他、Biochem, Biophys. Res. Comm. 137:847-854(1986); Meager, 他、Hybridoma 6:305-311(1987); Fendly 他、Hybridoma 6:359-369(1987); Bringman 他、Hybridoma 6:489-507(1987); および、Hirai, 他、J. Immunol. Meth. 96:57-62(1987)を参照]。

【0169】

TNF受容体分子

本発明で用いるに有用な好適なTNF受容体分子は、TNFと高い親和力で結合する分子であり[例えばFeldmann他の国際公開番号WO 92/07076(1992年4月30日付けで公開); Schall 他、Cell 61:361-370(1990); およびLoetscher 他、Cell 61:351-359(1990)(

10

20

30

40

50



これらの文献は引用することによって全体が本明細書に組み入れられる)を参照]、そしてそれらは場合により低い免疫原性を示す。特に、55 kDa (p55 TNF-R) および75 kDa (p75 TNF-R) のTNF細胞表面受容体が本発明で用いるに有用である。そのような受容体の切断形態[この受容体の細胞外ドメイン(ECD)を含有する]またはこれの機能的部分[例えばCorcoran他、Eur. J. Biochem. 223: 831-840 (1994)を参照]もまた本発明で用いるに有用である。そのようなECDを含有して成る切断形態のTNF受容体が30 kDaおよび40 kDaのTNF阻害結合蛋白質として尿および血清中に検出された[Engelmann, H.他、J. Biol. Chem. 265: 1531-1536 (1990)]。TNF受容体多量体分子およびTNF免疫受容体融合分子およびこれらの誘導体およびフラグメントまたは部分が本発明の方法および組成物で用いるに有用なTNF受容体分子の追加的例である。

10

#### 【0170】

本発明で用いるに有用なTNF受容体多量体分子は、1個以上のポリペプチドリンカーまたは他の非ペプチドリンカー、例えばポリエチレングリコール(PEG)などで連結している2個以上のTNF受容体のECDの全部または機能的部分を含有して成る。前記TNF免疫受容体融合分子の例はTNF受容体/IgG融合蛋白質である。TNF免疫受容体融合蛋白質およびその製造方法は本技術分野に記述されている[(Lesslauer他、Eur. J. Immunol. 21: 2883-2886 (1991); Ashkenazi他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10535-10539 (1991); Peppel他、J. Exp. Med. 174: 1483-1489 (1991); Kolls他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 215-219 (1994); Butler他、Cytokine 6(6): 616-623 (1994); Baker他、Eur. J. Immunol. 24: 2040-2048 (1994); Beutler他の米国特許第5,447,851号および米国出願番号08/442,133(1995年5月16日付けで出願)(これらの文献は各々引用することによって全体が本明細書に組み入れられる)]。また、免疫受容体融合分子を生じさせる方法をCapon他の米国特許第5,116,964号、Capon他の米国特許第5,225,538号およびCapon他、Nature 337: 525-531 (1989)(これらの文献は引用することによって全体が本明細書に組み入れられる)にも見ることができる。

20

30

#### 【0171】

サイトカインには公知サイトカインのいずれも含まれる。例えばCopewith Cytokines.comを参照。サイトカインアンタゴニストには、これらに限定するものでないが、全ての抗体、フラグメントまたは模擬物、全ての可溶受容体、フラグメントまたは模擬物、全ての低分子アンタゴニストまたはこれらの任意組み合わせが含まれる。

#### 【0172】

##### 治療処置

本発明の方法はいずれもIL-6媒介疾患を処置する方法を含んで成り得、この方法は、そのような修飾、処置または治療を必要としている細胞、組織、器官、動物または患者に少なくとも1種の抗-IL-6抗体を含有して成る組成物もしくは製薬学的組成物を有効量で投与することを含んで成る。前記方法に、場合により更に、そのような病気または疾患を処置するための共投与または組み合わせ治療を含めることも可能であり、その場合、前記少なくとも1種の抗-IL-6抗体、これの特定部分または変異体の投与に、更に、抗感染薬、心臓血管(CV)系作用薬、中枢神経系(CNS)作用薬、自律神経系(ANS)作用薬、呼吸器作用薬、胃腸(GI)管作用薬、ホルモン薬、体液もしくは電解質平衡用薬剤、血液製剤、抗癌薬、免疫修飾薬、眼、耳もしくは鼻用薬剤、局所用薬剤、栄養薬など、少なくとも1種のTNFアンタゴニスト[例えばこれらに限定するものでないが、TNF抗体もしくはフラグメント、可溶TNF受容体もしくはフラグメント、そのの

40

50

融合ポリペプチドまたは低分子TNFアンタゴニスト]、抗リウマチ剤(例えばメトトレキサート、オーラノフィン、アウロチオグルコース、アザチオプリン、エタネルセプト、金チオリンゴ酸ナトリウム、硫酸ヒドロキシクロロキン、レフルノミド、スルファサルジン)、筋弛緩薬、睡眠薬、非ステロイド抗炎症薬(NSAID)、鎮痛薬、麻酔薬、鎮痛剤、局所麻酔薬、神経筋遮断薬、抗菌剤(例えばアミノグリコシド、抗真菌薬、抗寄生虫薬、抗ウイルス薬、カルバペネム、セファロsporin、フルロルキノロン、マクロリド、ペニシリン、スルホンアミド、テトラシクリン、別の抗菌剤)、乾癬治療薬、コルチコステロイド、蛋白同化ステロイド、糖尿病関連薬、ミネラル、栄養剤、甲状腺用薬剤、ビタミン、カルシウム関連ホルモン、下痢止め薬、鎮咳薬、制吐薬、抗腫瘍薬、下剤、抗凝血薬、エリスロポイエチン(例えばエポエチンアルファ)、フィルグラスチム(例えばG-CSF、Neupogen)、サルグラモスチム(GM-CSF、Leukine)、予防接種、免疫グロブリン、免疫抑制剤(例えばバシリキシマブ、シクロスポリン、ダクリズマブ)、成長ホルモン、ホルモン補充薬、エストロゲン受容体モジュレーター、散瞳薬、毛様筋調節薬、アルキル化剤、代謝拮抗剤、分裂抑制因子、放射性医薬品、抗鬱薬、抗躁薬、抗精神病薬、抗不安薬、睡眠薬、交感神経様作用薬、興奮剤、ドネペジル、タクリン、喘息用薬剤、ベータ作用薬、ステロイド剤吸引、ロイコトリエン阻害剤、メチルキサンチン、クロモリン、エピネフリンまたは類似物、ドルナーゼアルファ(Pulmozyme)、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニストから選択した少なくとも1種を前以て、同時および/または後に投与することも含める。そのような薬剤は本技術分野で良く知られており、それには本明細書に示す各々の調製、適応、投薬および投与が含まれる(例えばNursing 2001 Handbook of Drugs, 第21版、Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; Health Professional's Drug Guide 2001, 編集、Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; Pharmacotherapy Handbook, Wells 他編集、Appleton & Lange, Stamford, CT, 各々引用することによって全体が本明細書に組み入れられるを参照)。

### 【0173】

病理学的状態の処置を典型的には少なくとも1種の抗-IL-6抗体組成物を有効な量もしくは投薬量で投与することで実施するが、少なくとも1種の抗-IL-6抗体の総量を当該組成物に含有させる活性薬剤の比活性に応じて平均で1回投与当たり患者1キログラム当たり少なくとも約0.01から500ミリグラムの範囲、好適には1回もしくは多数回投与当たり患者1キログラム当たり少なくとも約0.1から100ミリグラムの抗体にする。別法として、有効血清中濃度が1回もしくは多数回投与当たり血清1ml当たり0.1-5000 $\mu$ gの濃度になるようにしてもよい。適切な投薬量は医者に公知であり、勿論、個々の病気状態、投与すべき組成物が示す比活性および処置を受けさせる個々の患者に依存するであろう。ある場合には、必要な治療量を達成する目的で、投与を繰り返し行う必要があり得る、即ち用量を特別に監視または計量して個別の投与を繰り返し行う必要があり得るが、その場合、個々の投与を必要な1日当たりの投薬量または効果が達成されるまで繰り返す。

### 【0174】

好適な投薬量には、場合により、投与1回当たり約0.1-99および/または100-500mg/kgまたはこれの如何なる範囲も値も分率も含まれ得るか、或は1回もしくは多数回投与当たり血清1ml当たり約0.1-5000 $\mu$ g濃度の血清中濃度を達成する用量またはこれの如何なる範囲も値も分率も含まれ得る。本発明の抗-IL-6抗体に好適な投薬範囲は、患者の体重1kg当たり約1mgから約3、約6または約12mgである。

### 【0175】

別法として、投薬量を公知要因、例えば個々の薬剤が示す薬物動態特性、その投与様式および経路; 受益者の年齢、健康および体重; 症状の性質および度合、現在受けている

10

20

30

40

50

治療の種類、治療の頻度および必要な効果などに応じて変えることも可能である。有効成分の投薬量を通常は体重1キログラム当たり約0.1から100ミリグラムにしてもよい。必要な結果を得ようとするに有効な量は、通常、1回投与または持続放出形態において1キログラム当たり0.1から50、好適には0.1から10ミリグラムである。

【0176】

非限定例として、ヒトまたは動物の処置を本発明の少なくとも1種の抗体の1回または定期的投与として1回、輸液または繰り返し投与を用いて1-40日の中の少なくとも1日、または別法としてとしてか或は追加的に、152週の中の少なくとも1週、または別法としてとしてか或は追加的に、1-20年の中の少なくとも1年またはこれらの任意組み合わせで1日当たり約0.1から100mg/kgまたはこれらのいずれかの範囲、値または分率で行ってもよい。

10

【0177】

体内投与に適した投薬形態物(組成物)の有効成分含有量を単位または容器当たり一般に約0.001ミリグラムから約500ミリグラムにする。そのような製薬学的組成物に存在させる有効成分の量を通常は当該組成物の総重量を基準にして約0.5-99.99重量%の量にする。

【0178】

非経口投与の場合、本抗体を溶液、懸濁液、乳液、粒子、粉末または凍結乾燥粉末として個別にか或は製薬学的に受け入れられる非経口用媒体と一緒に調製してもよい。そのような媒体の例は、水、食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液および約1-10%のヒト血清アルブミンである。また、リポソームおよび非水性媒体、例えば不揮発性油なども使用可能である。そのような媒体または凍結乾燥粉末に等張性を維持する添加剤(例えば塩化ナトリウム、マンニトール)および化学的安定性を維持する添加剤(例えば緩衝剤および防腐剤)などを含有させてもよい。そのような製剤に滅菌を公知または適切な技術を用いて受けさせる。

20

【0179】

適切な製薬学的担体が本分野の標準的な文献であるRemington's Pharmaceutical Sciences(A.Osol)の最新版に記述されている。

【0180】

代替投与

30

本発明に従う少なくとも1種の抗-IL-6抗体を製薬学的に有効な量で投与する目的で数多くの公知および開発された様式を本発明に従って用いることができる。以下の説明では肺投与を用いるが、他の投与様式を本発明に従って用いることでも適切な結果を得ることができる。本発明のIL-6抗体を担体に入れるか、溶液、乳液、コロイドまたは懸濁液としてか或は乾燥粉末として本技術分野の範囲内または公知の吸入またはここに記述する他の様式で投与するに適したいろいろな機器および方法のいずれかを用いて送達してもよい。

【0181】

非経口製剤および投与

40

非経口投与用製剤に無菌水もしくは食塩水、ポリアルキレングリコール、例えばポリエチレングリコールなど、植物が源の油、水添ナフタレンなどを一般的賦形剤として含有させてもよい。注射用の水性もしくは油性懸濁液の調製は、適切な乳化剤もしくは湿潤剤および懸濁剤を用いて公知方法に従って実施可能である。注射用の薬剤は、経口では投与不能な無毒の希釈剤、例えば水溶液、無菌注射可能溶液または溶媒に入っている懸濁液であってもよい。使用可能な媒体または溶媒として、水、リンゲル液、等張食塩水などが可能であり、通常は溶媒または懸濁用溶媒として無菌の非揮発性油を用いてもよい。そのような目的で全ての種類の非揮発性油および脂肪酸を用いることができ、それには天然もしくは合成もしくは半合成の脂肪油もしくは脂肪酸、天然もしくは合成もしくは半合成のモノ-もしくはジ-もしくはトリ-グリセリドが含まれる。非経口投与は本技術分野で公知であり、それには、これらに限定するものでないが、通常は注射手段、米国特許第5,85

50

1, 198号に記述されている如き気体加圧の無針注射器具、および米国特許第5, 839, 446号(引用することによって全体が本明細書に組み入れられる)に記述されている如きレーザー穴開け装置などが含まれる。

#### 【0182】

##### 代替送達

本発明は、更に、少なくとも1種の抗-IL-6抗体を非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、洞内、腔内、小脳内、脳室内、結腸内、頸管内、胃内、肝内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎内、網膜内、髄腔内、滑液嚢内、胸郭内、子宮内、膀胱内、病巣内、ポラス、膻、直腸、口腔、舌下、鼻内または経皮手段で投与することにも関する。少なくとも1種の抗-IL-6抗体組成物は、これを非経口(皮下、筋肉内または静脈内)または他のいずれかの投与で用いる場合には、特に液状溶液または懸濁液の形態、膻または直腸投与で用いる場合には、特に半固体形態、例えばこれらに限定するものでないが、クリームおよび座薬など形態、口腔または舌下投与の場合には、例えばこれらに限定するものでないが、錠剤またはカプセルの形態、または鼻内の場合にはこれらに限定するものでないが、粉末、鼻用液滴またはエロゾルまたは特定の作用剤の形態、または経皮の場合には、これらに限定するものでないが、ゲル、軟膏、ローション、懸濁液、またはパッチ送達系{皮膚構造を修飾するか或は経皮パッチの中の薬剤濃度を高くする化学的促進剤、例えばジメチルスルホキシドなど(Junginger, 他、In "Drug Permeation Enhancement;" Hsieh, D. S. 編集、59-90頁(Marcel Dekker, Inc. New York 1994, 引用することによって全体が本明細書に組み入れられる)を用いるか或は蛋白質およびペプチドが入っている製剤を皮膚に投与することを可能にする酸化剤(WO 98/53847)を用いるか或は一時的輸送経路を作り出す目的で電場をかける(例えばエレクトロポレーション)か或は帯電している薬剤が皮膚を通過する可動性を向上(例えばイオン導入)させるか或は超音波をかける[例えば音波導入(米国特許第4, 309, 989号および4, 767, 402号)]ことを伴わせて}などで用いるに適するように調製可能である(この上に示した出版物および特許は引用することによって全体が本明細書に組み入れられる)。

#### 【0183】

##### 肺/鼻投与

肺投与の場合、好適には、少なくとも1種の抗-IL-6抗体組成物を肺もしくは洞の下方気道に到達させるに有効な粒径にして送達する。本発明に従い、治療薬を吸引で投与にすることが本技術分野で知られているいろいろな吸入もしくは鼻用器具のいずれかを用いて少なくとも1種の抗-IL-6抗体を送達することができる。エロゾル化した製剤を患者の空洞または肺胞の中に付着させる能力を有する器具には、定量吸入器、ネブライザー、乾燥粉末発生装置、噴霧装置などが含まれる。本技術分野ではまた肺または鼻への抗体投与を指示するに適した適切した他の器具も公知である。そのような器具では、全部で、抗体を投与する目的でエロゾルの状態で分与するに適した製剤を用いることができる。そのようなエロゾルを溶液(水性および非水性の両方)または固体粒子のいずれかで構成させてもよい。

#### 【0184】

Ventolin(商標)定量吸入器の如き定量吸入器では、典型的に、噴射用ガスが用いられておりかつこれを吸入中に作動させる必要がある(例えばWO 94/16970、WO 98/35888を参照)。Inhale Therapeuticsが市販しているTurbuhaler<sup>TM</sup>(Astra)、Rotahaler<sup>(R)</sup>(Glaxo)、Diskus<sup>(R)</sup>(Glaxo)、Spiros<sup>TM</sup> Inhaler(Dura)器具の如き乾燥粉末吸入器およびSpinhaler(商標)粉末吸入器(Fisons)では、混合粉末を息で作動させることが利用されている[(US 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US 5458135 Inhale, WO 94

/ 0 6 4 9 8 F i s o n s ( 引用することによって全体が本明細書に組み入れられる ) ]。A E R x <sup>T M</sup> A r a d i g m , U l t r a v e n t <sup>(R)</sup> ネブライザー ( M a l l i n c k r o d t ) および A c o r n I I <sup>(R)</sup> ネブライザー ( M a r q u e s t M e d i c a l P r o d u c t s ) ( U S 5 4 0 4 8 7 1 A r a d i g m , W O 9 7 / 2 2 3 7 6 ) , ( 前記文献は引用することによって全体が本明細書に組み入れられる ) の如きネブライザーでは、溶液からエアロゾルを生じさせるが、定量吸入器、乾燥粉末吸入器などでは小さい粒子のエアロゾルを生じさせる。そのような市販吸入器具の具体例は本発明の実施で用いるに適した具体的な器具の代表例であることを意図したものであり、本発明の範囲を限定することを意図したものでない。

【 0 1 8 5 】

好適には、少なくとも1種の抗 - I L - 6 抗体を含有して成る組成物を乾燥粉末吸入器または噴霧器で送達する。本発明の少なくとも1種の抗体を投与するに適した吸入器具に求められる特徴はいくつか存在する。例えば、吸入器具による送達は有利に信頼できて再現性がある正確である。そのような吸入器具を用いて場合により小さい乾燥粒子、例えば約 1 0 μ m 未満、好適には約 1 - 5 μ m の粒子を良好な呼吸性で送達することができる。

【 0 1 8 6 】

I L - 6 抗体組成物をスプレーとして投与

少なくとも1種の抗 - I L - 6 抗体が入っている懸濁液または溶液をノズルの中を通して加圧下で押し出すことで I L - 6 抗体組成物を含有するスプレーを生じさせることができる。そのノズルの大きさおよび形態、かける圧力および液体供給速度を選択することで必要な放出量および粒径を達成することができる。エレクトロスプレーを例えば電場を毛细管またはノズル供給と併せて用いることなどで生じさせることができる。有利には、噴霧装置を用いて送達する少なくとも1種の抗 - I L - 6 抗体組成物の粒子の粒径が約 1 0 μ m 未満、好適には約 1 μ m から約 5 μ m の範囲、最も好適には約 2 μ m から約 3 μ m になるようにする。

【 0 1 8 7 】

噴霧装置で用いるに適した少なくとも1種の抗 - I L - 6 抗体組成物の製剤には、典型的に、少なくとも1種の抗 - I L - 6 抗体組成物の濃度が溶液 1 m l 当たり約 0 . 1 m g から約 1 0 0 m g ( 即ち m g / g ) またはこれの中のいずれかの範囲、値または分率である水溶液の状態の抗体組成物が含まれる。そのような製剤に賦形剤、緩衝剤、等張剤、防腐剤、界面活性剤および好適には亜鉛などの如き作用剤を含有させることも可能である。そのような製剤に、また、本抗体組成物を安定にする賦形剤または作用剤、例えば緩衝剤、還元剤、バルク蛋白質または炭水化物などを含有させることも可能である。抗体組成物を調製する時に用いるに有用なバルク蛋白質には、アルブミン、プロタミンなどが含まれる。抗体組成物を調製する時に用いるに有用な典型的な炭水化物には、スクロース、マンニトール、ラクトース、トレハロース、グルコースなどが含まれる。本抗体組成物製剤に、また、エアロゾルを生じさせる時に溶液を噴霧することに伴って抗体組成物が表面で誘発されて凝集する度合を軽減または防止し得る界面活性剤を含有させることも可能である。いろいろな通常の界面活性剤、例えばポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよびアルコール、およびポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステルなどを用いることができる。量を一般的に当該製剤の 0 . 0 0 1 から 1 4 重量% の範囲内にする。本発明の目的に特に好適な界面活性剤はポリオキシエチレンソルビタンモノオレート、ポリソルベート 8 0、ポリソルベート 2 0 などである。また、蛋白質、例えば I L - 6 抗体または特定部分または変異体などの調製に適することが本技術分野で知られている追加的作用剤を本製剤に含有させることも可能である。

【 0 1 8 8 】

ネブライザーによる I L - 6 抗体組成物の投与

本発明の抗体組成物の投与をネブライザー、例えばジェットネブライザーまたは超音波ネブライザーなどを用いて実施することも可能である。ジェットネブライザーの場合、典

10

20

30

40

50

型的に、オリフィスを通る高速空気ジェットを生じさせる目的で圧縮空気源を用いる。そのガスが前記ノズルを出て膨張する時に低圧領域が作り出され、それによって、抗体組成物の溶液が液体貯蔵槽と連結している毛細管の中に吸い込まれる。その毛細管から出た液体流れが前記管を出る時にせん断を受けて不安定なフィラメントおよび液滴になることでエアロゾルが作り出される。所定のジェットネブライザーを用いて所望の性能特徴を達成しようとする時にある範囲の形態、流量およびバツフルの種類を用いることができる。超音波ネブライザーの場合には、高周波数の電気エネルギーを用いて振動する機械的エネルギーを作り出すが、典型的には圧電変換器を用いる。そのエネルギーを本抗体組成物の製剤に直接にか或はカップリング流体を通して伝達することで、本抗体組成物を含有するエアロゾルを生じさせる。有利には、ネブライザーで送達する抗体組成物の粒子の粒径が約 10  $\mu\text{m}$  未満、好適には約 1  $\mu\text{m}$  から約 5  $\mu\text{m}$  の範囲、最も好適には約 2  $\mu\text{m}$  から約 3  $\mu\text{m}$  になるようにする。

#### 【0189】

ネブライザー（ジェットまたは超音波のいずれか）と一緒に用いるに適した少なくとも 1 種の抗 - IL - 6 抗体製剤に含有させる少なくとも 1 種の抗 - IL - 6 抗体蛋白質の濃度を典型的に溶液 1 ml 当たり約 0.1 mg から約 100 mg にする。その製剤に賦形剤、緩衝剤、等張剤、防腐剤、界面活性剤および好適には亜鉛などの如き作用剤を含有させることも可能である。そのような製剤に、また、本少なくとも 1 種の抗 - IL - 6 抗体組成物を安定にする賦形剤または作用剤、例えば緩衝剤、還元剤、バルク蛋白質または炭水化物などを含有させることも可能である。少なくとも 1 種の抗 - IL - 6 抗体を調製する時に用いるに有用なバルク蛋白質には、アルブミン、プロタミンなどが含まれる。少なくとも 1 種の抗 - IL - 6 抗体組成物を調製する時に用いるに有用な典型的な炭水化物には、スクロース、マンニトール、ラクトース、トレハロース、グルコースなどが含まれる。本少なくとも 1 種の抗 - IL - 6 抗体組成物製剤に、また、エアロゾルを生じさせる時に溶液を噴霧することに伴って少なくとも 1 種の抗 - IL - 6 抗体が表面で誘発されて凝集する度合を軽減または防止し得る界面活性剤を含有させることも可能である。いろいろな通常の界面活性剤、例えばポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよびアルコール、およびポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステルなどを用いることができる。量を一般的に当該製剤の 0.001 から 14 重量% の範囲内にする。本発明の目的に特に好適な界面活性剤はポリオキシエチレンソルビタンモノオレート、ポリソルベート 80、ポリソルベート 20 などである。また、蛋白質、例えば抗体蛋白質などの調製に適することが本技術分野で知られている追加的作用剤を本製剤に含有させることも可能である。

#### 【0190】

定量吸入器による IL - 6 抗体組成物の投与

定量吸入器 (MDI) では、噴射剤、少なくとも 1 種の抗 - IL - 6 および任意の賦形剤または他の添加剤を液化圧縮ガス含有混合物として容器の中に入れる。定量弁を作動させることで前記混合物をエアロゾル、好適には大きさの範囲が約 10  $\mu\text{m}$  未満、好適には約 1  $\mu\text{m}$  から 5  $\mu\text{m}$ 、最も好適には約 2  $\mu\text{m}$  から約 3  $\mu\text{m}$  の粒子を含有するエアロゾルとして放出させる。本分野の技術者に知られているいろいろな方法を用いて生じさせた抗体組成物製剤を用いることで必要なエアロゾル粒径を得ることができるが、そのような方法には、ジェットミリング、噴霧乾燥、臨界点凝縮などが含まれる。好適な定量吸入器には、3M または Glaxo が製造している吸入器が含まれ、それらにはヒドロフルオロカーボン噴射剤が用いられている。定量吸入器で用いるに適した少なくとも 1 種の抗 - IL - 6 抗体製剤に、一般に、少なくとも 1 種の抗 - IL - 6 抗体が非水性媒体に入っている懸濁液、例えば界面活性剤を用いて噴射剤の中に懸濁させた懸濁液として少なくとも 1 種の抗 - IL - 6 抗体が入っている微細粉末を含有させる。そのような噴射剤はそのような目的で用いられる通常の方法、例えばクロロフルオロカーボン、ヒドロクロロフルオロカーボン、ヒドロフルオロカーボンまたは炭化水素などのいずれであってもよく、それにはトリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタンおよび 1, 1, 1, 2 - テトラフルオロエタン、HFA - 134a (ヒドロフルオロア

10

20

30

40

50

ルカン - 134a)、HFA - 227 (ヒドロフルオロアルカン - 227) などが含まれる。そのような噴射剤は好適にはヒドロフルオロカーボンである。少なくとも1種の抗 - IL - 6 抗体をこれが噴射剤に入っている懸濁液として安定にすること、活性薬剤が化学的劣化に対して抵抗するように保護することなどをもたらす界面活性剤を選択することができる。適切な界面活性剤には、ソルビタントリオレート、大豆レシチン、オレイン酸などが含まれる。ある場合には、溶媒、例えばエタノールなどを用いた溶液のエーロゾルが好適である。また、蛋白質調製技術で公知の追加的作用剤を本製剤に含有させることも可能である。本分野の通常の技術者は、少なくとも1種の抗 - IL - 6 抗体組成物を本明細書に記述しなかった器具を用いて肺投与することで本発明の方法を達成することも可能であることを認識するであろう。

10

#### 【0191】

##### 経口製剤および投与

経口投与用製剤は、アジュバント (例えばレゾルシノールおよび非イオン性界面活性剤、例えばポリオキシエチレンオレイルエーテルおよびn - ヘキサデシルポリエチレンエーテル) を一緒に投与して腸壁透過性を人工的に向上させることばかりでなく酵素阻害剤 (例えば膵臓トリプシン阻害剤、ジイソプロピルフルオロホスフェート (DFP) およびトラシロール) を一緒に投与することで酵素の劣化を抑制することに頼っている。親水性薬剤 (蛋白質および抗体、および経口、口腔、粘膜、鼻、肺、膈膜貫通または直腸投与を意図する場合の少なくとも2種類の界面活性剤の組み合わせを包含) を送達するための製剤が米国特許第6,309,663号に教示されている。経口投与用の固体型投薬形態物の有効成分化合物を少なくとも1種の添加剤と混合してもよく、そのような添加剤には、スクロース、ラクトース、セルロース、マンニトール、トレハロース、ラフィノース、マルチトール、デキストラン、澱粉、寒天、アルギン酸塩、キチン、キトサン、ペクチン、トラガカントゴム、アラビアゴム、ゼラチン、コラーゲン、カゼイン、アルブミン、合成もしくは半合成重合体およびグリセリドが含まれる。そのような投薬形態物にまた他の種類の添加剤、例えば不活性な希釈剤、滑剤、例えばステアリン酸マグネシウムなど、パラベン、防腐剤、例えばソルビン酸、アスコルビン酸、アルファ - トコフェロールなど、抗酸化剤、例えばシステインなど、崩壊剤、結合剤、増粘剤、緩衝剤、甘味剤、風味剤、芳香剤などを含有させることも可能である。

20

#### 【0192】

錠剤およびピルにさらなる処理を受けさせることで腸溶性膜被覆製剤にすることも可能である。経口投与用液状製剤には、医学用途に受け入れられる乳液、シロップ、エリキシル、懸濁液および溶液製剤が含まれる。そのような製剤に前記分野で通常用いられる不活性な希釈剤、例えば水などを含有させることも可能である。また、インスリンおよびヘパリン用の薬剤送達系としてリボソームも記述された (米国特許第4,239,754号)。より最近になって、薬剤を送達する目的で混合アミノ酸の人工重合体の微小球 (プロテイノイド) が用いられた (米国特許第4,925,673号)。更に、米国特許第5,879,681号および米国特許第5,871,753号に記述されている担体化合物を生物学的活性薬剤を経口送達する目的で用いることも本技術分野で公知である。

30

#### 【0193】

##### 粘膜用製剤および投与

生物活性薬剤を経口投与する目的でマイクロカプセルがもたらされるように1種以上の生体適合性重合体もしくは共重合体賦形剤、好適には生分解性重合体もしくは共重合体の中に封じ込めておいた製剤を用いると、その結果としてもたらされるマイクロカプセルは大きさが適切なことから、結果として、その薬剤が集合リンパ小節 (他に、動物の「Peyerパッチ」または「GALT」としても知られる) に到達してそれによって吸収されることから、その薬剤が胃腸管を通ることによって起こる効果損失が起こらない。同様な集合リンパ小節が気管支 (BALT) および大腸にも存在し得る。この上に記述した組織は一般に粘膜関連リンパ細網組織 (MALT) と呼ばれる。粘膜表面を貫通する吸収を起こさせるには、少なくとも1種の抗 - IL - 6 抗体を投与する組成物および方法に、多数のサ

40

50

ブミクロン粒子、粘膜接着性高分子、生物学的活性を示すペプチドおよび水性連続相を含有して成る乳液（乳液粒子の粘膜接着を達成することで粘膜表面を貫通する吸収を助長する）を含める（米国特許第5,514,670号）。本発明の乳液を付着させるに適した粘膜表面には、角質、結膜、口腔、舌下、鼻、膈、肺、胃、腸および直腸経路の投与が含まれ得る。膈もしくは直腸投与用製剤、例えば座薬などの場合、これに例えばポリアルキレングリコール、ワセリン、ココアバターなどを賦形剤として含有させてもよい。鼻内投与用製剤は固体であってもよく、これに例えばラクトースを賦形剤として含有させてもよいが、或はそれは鼻液滴の水性もしくは油性溶液であってもよい。口腔投与の場合の賦形剤には、糖、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、前以てゼラチン状にしておいた澱粉などが含まれる（米国特許第5,849,695号）。

10

## 【0194】

## 経皮製剤および投与

経皮投与の場合には、少なくとも1種の抗-IL-6抗体を送達用デバイス、例えばリポソームまたは重合体ナノ粒子、微小粒子、ミクロカプセルまたは微小球（特に明記しない限り、集散的に微小粒子と呼ぶ）の中に封じ込める。適切なデバイスが数多く公知であり、それには合成重合体、例えばポリヒドロキシ酸、例えばポリ乳酸、ポリグリコール酸およびこれらの共重合体、ポリオルトエステル、ポリ無水物およびポリホスファゼンなど、および天然重合体、例えばコラーゲン、ポリアミノ酸、アルブミンおよび他の蛋白質、アルギネートおよび他の多糖などおよびこれらの組み合わせで出来ている微小粒子が含まれる（米国特許第5,814,599号）。

20

## 【0195】

## 長期投与および製剤

本発明の化合物を被験体に1回の投与で長期間、例えば1週間から1年間に渡って送達するのが望ましい可能性がある。いろいろな徐放、持続性薬剤または移植投薬形態物を利用することができる。例えば、投薬形態物に体液中の溶解度が低い当該化合物の製薬学的に受け入れられる無毒塩、例えば(a)多塩基酸、例えば燐酸、硫酸、クエン酸、酒石酸、タンニン酸、パモ酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンモノ-もしくはジ-スルホン酸、ポリガラクトロン酸などを用いた酸付加塩、(b)多価金属カチオン、例えば亜鉛、カルシウム、ビスマス、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、銅、コバルト、ニッケル、カドミウムなどとの塩または例えばN,N'-ジベンジルエチレンジアミンまたはエチレンジアミンなどを用いて生じさせた有機カチオンとの塩、または(c)(a)と(b)の組み合わせ、例えばタンニン酸亜鉛塩などを含有させてもよい。加うるに、本発明の化合物または好適には相対的に不溶な塩、例えばこの直ぐ上に記述した塩などを注射に適するゲル、例えばモノステアリン酸アルミニウムゲルの状態に例えばゴマ油などを用いて調製することも可能である。特に好適な塩は亜鉛塩、タンニン酸亜鉛塩、パモ酸塩などである。他の種類の注射用徐放持続性製剤に、分散させた化合物または塩を含有させ、それを米国特許第3,773,919号に記述されているように劣化速度が遅い無毒の非抗原性重合体、例えばポリ乳酸/ポリグリコール酸重合体などの中に封じ込めてもよい。そのような化合物または好適には相対的に不溶な塩、例えばこの上に記述した塩などをまたコレステロールマトリクスシラスティックペレット、特に動物に用いるに適したペレットの状態に調製することも可能である。追加的徐放性、持続性もしくは移植製剤、例えば気体または液体状のリポソームなども文献（米国特許第5,770,222号および“Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems”, J.R. Robinson 編集, Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978）で公知である。

30

40

## 【0196】

本発明を一般的に記述してきたが、例示として示すものでありかつ限定として解釈されるべきではない以下の実施例を参照することで前記がより容易に理解されるであろう。

## 【0197】

適応症

50



## 関節リウマチ ( R A )

関節リウマチ ( R A ) は、自己免疫特徴を伴う慢性全身性炎症疾患である。 R A の特徴の多くは無調節な I L - 6 の作用によるものであると説明可能である。

### 【 0 1 9 8 】

R A に関連している可能性のある I L - 6 の作用には、 B 細胞分化因子として I L - 6 が示す作用によるポリクローナル高ガンマグロブリン血症および自己抗体産生 ( リウマトイド因子 ) の誘発 ; I L - 2 に呼応して起こる細胞障害 T 細胞発生の増進 ; 肝細胞刺激活性による急性期蛋白質 ( C R P 、 S A A 、 フィブリノーゲン ) の産生 ; 破骨細胞活性化による関節周囲骨粗しょう症および骨破壊 ; 巨核球分化因子としての作用によるトロンボサイトーシスの誘発 ; および V E G F の調節、従って I L - 1 および T N F に呼応して起こり得る血管形成が含まれる。

10

### 【 0 1 9 9 】

I L - 6 は T N F もしくは I L - 1 で刺激された R A 滑膜性線維芽細胞によって産生され、 R A では、滑膜液 ( S F ) および血清の両方の中に高濃度で存在する。血清中濃度と臨床 / 実験室疾患活動指数の間に相関関係が存在する。

### 【 0 2 0 0 】

抗 - I L - 6 / I L - 6 R m A b に活動性 R A にかかっている患者に数種の臨床試験を実施することによる試験を受けさせた。今日までに得た結果を以下に簡単に記述する。

### 【 0 2 0 1 】

#### フェーズ I / I I 試験

この試験の 1 番目として、マウス抗 - I L - 6 m A b ( B E - 8 ) を R A にかかっている 5 人の患者に連続 1 0 日間に渡って毎日投与し、そして一時的な臨床および実験室改善度合と関連付けた ( 9 ) ( W e n d l i n g , D 他、 1 9 9 3 J . R h e u m a t o l . 2 0 : 2 5 9 ) 。 R A にかかっている患者にヒト化抗 - I L - 6 R ( 8 0 k D a ) m A b ( M R A ; C h u g a i ) を用いた試験をいくつかのフェーズ I / I I 試験で受けさせた。これらの中の 1 番目として M R A を 1 週間に 1 回または 2 回の割合で 1 - 5 0 m g の用量で I V 注入することで投与し、週に 5 0 m g の維持処置を 6 カ月に及んで実施した。その結果として急性期測定値、 C - 反応性蛋白質 ( C R P ) およびフィブリノーゲンが急速に減少し、かつ熱、疲れおよび臨床スコア、例えば朝の硬直および膨れおよび関節圧痛カウント数などは低い度合であった。また、貧血、トロンボサイトーシスおよび高ガン

20

30

### 【 0 2 0 2 】

#### フェーズ I I 試験

この試験の 1 番目として、 1 5 人の患者に M R A を用いた処置 ( 2 4 週間に渡って 2 週間毎に 2 、 4 または 8 m g / k g の投薬濃度 ) を受けさせた結果、 2 4 週間で 1 5 人中 1 3 人に A C R 2 0 反応が現れ、 C R P / 血清アミロイド A ( S A A ) は正常であった。重要な急性安全懸念は全く存在しなかったが、患者の 2 / 3 は顕著な L D L コレステロール濃度上昇を示した。第二フェーズ I I 試験では、 D M A R D 耐性 R A にかかっている 1 6 4 人の患者にプラセボまたは M R A を用いた処置を I V 注入 ( 3 カ月に渡って 4 週間毎に 4 または 8 m g / k g の投薬濃度 ) で受けさせた結果、 1 2 週の時に示した A C R 2 0 反応率はプラセボ、 4 および 8 m g / k g の場合それぞれ 1 1 % 、 5 7 % および 7 8 % であった。最後に、活動性 R A にかかっている 3 5 9 人の患者に M T X 単独 ( 1 0 - 2 5 m g / 週 ) 、 M R A 単独 ( I V 注入で毎月 2 、 4 または 8 m g / k g の投薬濃度 ) または M T X と M R A を投与した。 A C R 2 0 反応で測定した時に M R A および M R A + M T X の方が M T X 単独よりも有効であった。

40

### 【 0 2 0 3 】

#### 全身性エリトマトーデス ( S L E )

50

SLEは、多様な症状を伴う慢性の潜在的に致命的な自己免疫病である。その病因は未知である。この病気の1つの特徴は、B細胞の過増殖、活性化および多様な自己抗原に対して起こる自己抗体の産生を伴う。

#### 【0204】

IL-6は、B細胞の分化を誘発することで抗体産生細胞を生じさせる。SLEでは、自己抗体(ANA、抗-dsDNA)産生細胞による前記抗体の産生および免疫複合体の沈着量が増加する。IL-6は、細胞障害T細胞発生を助長し、肝急性期反応物質、メサンギウム細胞増殖、ケラチノサイト増殖、巨核球分化および血栓形成を増加させる。

#### 【0205】

SLE患者およびマウスSLEモデルの両方ともIL-6濃度が高い。IL-6受容体がB細胞に結合するとB細胞が自己抗体産生細胞になる最終的分化が誘発されることが立証された。

10

#### 【0206】

Linker-Israeli 他、(Linker-Israeli M 他、1991 J Immunol 147:117-123)は、IL-6に対する中和抗体を用いると自然発生的ポリクローナル抗体産生が減少することを示した。Kitani 他(Kitani A, 他、1992 Clin Exp Immunol 88:75-83)は、SLE培養物中のIL-6のインビトロT細胞産生量が2倍になることとSLEのB細胞がIL-6を産生する量は対照のB細胞が産生する量の5倍であることを立証することで前記発見を裏付けた。しかしながら、SLEにおける自己抗体の病的産生がIL-6の効果のみに限定されることはない。また、IL-6受容体が果たす役割も研究された。Nagafuchi 他は、IL-6受容体がSLEのB細胞の大部分を正常なB細胞と比べて上方調節することを示した。抗-IL-6受容体抗体はそのようなB細胞が抗体産生細胞になる最終的分化を阻害した。そのような可溶IL-6受容体がSLEで果たす役割はまだ確認されていない。

20

#### 【0207】

### 2型糖尿病(T2DM)

インスリン耐性(インスリン作用不全)および細胞機能不全(膵臓細胞によるインスリン分泌の機能的欠乏)がT2DM発症の主原因であると見なされている。インスリン耐性は、抹消組織がインスリンチャレンジに十分な反応を示さないことで血糖値が高くなる

30

として明らかになる。病気の初期段階でインスリン耐性および血糖値が高くなることに続いて膵臓の細胞が補足的にインスリンを過剰に分泌する。T2DMが進行するにつれて、細胞がインスリンを分泌する能力が悪化する。

#### 【0208】

インスリン耐性発症の一因となる基礎的機構は不明である。T2DMの発症に最も一般的に関連した1つの状態は肥満であり、T2DMにかかっている患者では減量を適度に行ったとしても血糖値が有意に高い。

#### 【0209】

肥満およびインスリン耐性/高インスリン血の両方に加えて脂質異常症、耐糖能異常および高血圧はメタボリック症候群と呼ばれる状態を特徴付けるものである。メタボリック症候群からT2DMに自然に進行した人は微細および巨視的血管変化を起こし易く、それによって心臓血管(CV)病にかかりそして最終的に死亡する可能性がある。肥満、インスリン耐性および高インスリン血がT2DMとCV病の間を関連付けている可能性が最も高いと示唆されている。

40

#### 【0210】

脂肪組織は、代謝を調節する主要な器官の中の1つであると識別されており、それは、インスリン感受性調節に関与する数多くの分子を分泌するエネルギー貯蔵場所および内分泌器官の両方である。レプチン、レスチン、アジポネクチンおよびTNFに加えて、脂肪組織もIL-6を分泌し、このことが肥満と炎症とT2DMと心臓血管(CV)病の間の関連に相当すると示唆されている。

50

## 【 0 2 1 1 】

脂肪過多症と I L - 6 濃度の間に積極的な相互関係が存在することが示された。肥満状態の時に脂肪組織が増加すると循環している I L - 6 の増加が維持される可能性があり、それによって、インスリン反応性組織における炎症が助長されることでインスリン感受性が低下するか或はインスリンシグナル伝達カスケードに関係する蛋白質の活性および発現が妨害されることでインスリン耐性が起こる可能性がある。I L - 6 がインスリン耐性発症である役割を果たしている可能性を裏付けるか或は否定するインビトロおよびインビボ両方のデータが存在する。

## 【 0 2 1 2 】

肝臓 ( H e p G 2 ) ( 4 4 )、脂肪 ( 3 T 3 L 1 ) または単離ラット膵島細胞を包含する十分に定義された細胞系を用いたインビトロデータは、I L - 6 がインスリンシグナル伝達、糖吸収およびインスリン分泌のそれぞれに対して直接的な否定的影響を与えることを示している。他方、骨格筋生検を用いて実施された実験で得られたデータは、運動している筋肉では I L - 6 が糖吸収度合を向上させ得ることを示唆している。

10

## 【 0 2 1 3 】

I L - 6 濃度とインスリン感受性の間の関連に関するインビボデータも同様に混在している。I L - 6 過剰発現もしくは完全切除モデルは、I L - 6 活性を完全に抑制しても有益な効果は得られない可能性があることを示唆している。例えば、肥満ではない遺伝子導入糖尿病 ( N O D ) マウスでは、ヒト I L - 6 が過剰発現することで糖尿病の発症が遅れかつ寿命が伸びる。加うるに、I L - 6 がゼロのマウスを用いたデータは、I L - 6 がエネルギー均衡調節である役割を果たしている可能性があることを示唆している、と言うのは、そのような動物は遅発性肥満を発症しかつ血糖値がより高いからである。

20

## 【 0 2 1 4 】

ヒトでは、I L - 6 プロモーター領域内に自然に起こる変異が存在すると I L - 6 分泌率が高くなる。そのような変異はインスリン感受性の増大および低下の両方に関係している。

## 【 0 2 1 5 】

別の組の実験で外因性 I L - 6 の効果を評価した。正常な被験体では、I L - 6 を投与すると血漿中インスリン濃度に影響が生じることなく血糖値が高くなるが、癌患者では、I L - 6 を加えると糖処理度合が高くなった。加うるに、I L - 6 濃度とインスリン耐性の間の相互関係も試験した。そのような試験で得たデータは、男性および女性の両方とも循環している I L - 6 濃度が高くなることとインスリン耐性が高いことが相互に関係していたが、原因と影響の関係は測定すべき状態のままであることを示している。

30

## 【 0 2 1 6 】

肥満に関連したインスリン耐性の発症で I L - 6 がある重要な役割を果たしていることが分かった。しかしながら、それがインスリン耐性である役割を果たしている可能性を裏付けするか或は否定する両方の相反するインビトロおよびインビボデータが存在する。

## 【 0 2 1 7 】

変形性関節症 ( O A )

O A は、関節軟骨が失われることに関連して軟骨下骨が変化することで特徴づけられる慢性の変性関節疾患である。関節鏡検査または滑膜生検片でいろいろな炎症度合が観察されるが、その病気は主に炎症ではない。むしろ、軟骨細胞および/または骨芽細胞代謝が変化することに由来すると考えられている。T N F、I L - 1 および I L - 6 がそのような変化に最も強力に関連しているサイトカインである。

40

## 【 0 2 1 8 】

O A にかかっている患者から得た骨膜液の中に I L - 6 が検出されるが、その濃度は炎症性関節症で見られる濃度より実質的に低い ( B e r t a z z o l o , N . 他 1 9 9 4 A g e n t s a n d A c t i o n s 4 1 : 9 0 - 9 2 ) 。

## 【 0 2 1 9 】

I L - 6 は、肝急性期蛋白質合成の主要な刺激因子であると認識されており、そして C

50

R Pの濃度と膝にO Aが存在することが関連しており、C R Pと肥満の間に関連があることが知られていることを考慮に入れたとしても関連している (M o h t a i , M . 他、1 9 9 6 J O r t h o p e d i c R e s e a r c h 1 4 : 6 7 - 7 3 ) 。

#### 【0220】

I L - 6はO Aの軟骨に由来する軟骨細胞の中では発現するが、正常な軟骨では発現しない (S o w e r s , M . 他、2 0 0 2 O s t e o a r t h r i t i s a n d C a r t i l a g e 1 0 : 5 9 5 - 6 0 1 ) 。機械的応力が軟骨細胞によるサイトカイン発現に対して示す影響をインビトロで試験する実験において、体液によって誘発されたせん断応力によってI L - 6 m R N Aおよび蛋白質が顕著に上方調節された。このことは、O Aの軟骨にI L - 6が発現するのは機械的付加の結果によるものである可能性があること

10

#### 【0221】

ヒト関節軟骨細胞を生体外で培養することによる他の実験において、I L - 6がs I L - 6と一緒にプロテオグリカン合成の抑制をもたらしたが、そのような影響はI L - 1に比べて控えめであった (G u e r n e , P . 他、1 9 9 9 M a t r i x B i o l o g y 1 8 : 2 5 3 - 2 6 0 ) 。

#### 【0222】

### 慢性閉塞性肺疾患 (C O P D)

C O P Dは、気道狭窄が完全には可逆的ではないことで特徴づけられる病気状態である。気道狭窄は一般に進行性でありかつ肺が毒性粒子および気体に対して異常な免疫反応を示すことに関連している (P a u w e l s R A 他、2 0 0 1 A m . J . R e s p i r C r i t C a r e M e d 1 6 3 : 1 2 5 6 - 1 2 7 6 ) 。

20

C O P Dは、加齢に伴って見られる正常な肺機能低下が加速することで特徴づけられる。気道狭窄がゆっくりと進行すると身体障害そして早期死亡をもたらされる。C O P Dは死亡および身体障害の主要な原因ではあるが、細胞および分子の観点から広範な研究が成されたのはほんの最近である (B a r n e s P . J . 他、2 0 0 3 E u r R e s p i r J 2 2 : 6 7 2 - 6 8 8 ) 。

C O P Dでは、抹消気道が一定して狭くなりかつ肺泡崩壊 (肺気腫) をもたらず慢性的炎症が存在する。その炎症反応は、肺泡マクロファージ、好中球および細胞障害Tリンパ球の数が増加しかつ複数の炎症性メディエータ (ケモカイン、サイトカイン、成長因子および脂質) が放出されることで特徴づけられる。酸化応力のレベルが高いことで炎症度合が高くなり得る。また、エラスチン分解度合が高くなりかつ数種のエラスチン分解酵素が関与する証拠も存在する。C O P Dにおける炎症および蛋白分解はタバコの煙に対する正常な炎症反応が高くなることで起こる。喘息とは対照的に、炎症はコルチコステロイドに耐性があると思われる (B a r n e s P . J . 他、2 0 0 3 ) 。

30

#### 【0223】

動物モデルにおいて、細菌のエンドトキシンまたはリポ多糖 (L P S) およびタバコの煙にさらされることによって好中球増加が誘発されかつ気管支肺胞洗浄 (B A L) 液の中に存在するI L - 6産生量が増加する。(U n d e r w o o d D . C . 他、2 0 0 0 A J P L C M P 2 7 9 : L 8 9 5 - 9 0 2 ) 。マウス肺の中でI L - 6の過剰発現が起こると肺気腫が誘発される (K u h n I I I C h . 他、2 0 0 0 A J R C M B 2 2 : 2 8 9 - 2 9 5 ) 。ヒトでは、1秒間努力呼気容量 (F E V 1) とB A Lの中のI L - 6、I L - 8濃度および多核白血球数は逆の関係にある (S o l e r N . 他、1 9 9 9 E u r R e s p i r J 1 4 : 1 0 1 5 - 1 0 2 2 ) 。中程度からひどいC O P Dにかかっている被験体では血漿中のT N F 、I L - 6およびC R P濃度が高い (Y a s u d a N . 他、1 9 9 8 R e s p i r M e d 9 2 : 9 9 3 - 9 9 9 ) 。

40

#### 【0224】

C O P Dの急性増悪期は、患者の状態が安定な状態から正常な日毎の変化を超えて持続

50

的に悪化するとして定義され、それは発症時に急性であることから標準的医療で変化させる必要がある (Burge S. 他、2003 Eur Respir J 21: Suppl. 41, 46s-53s)。肺機能の症状が増大しかつ悪化することが入院 (米国では毎年約500,000人)する共通した原因であるが、基礎を成す細胞および分子的機構は幅広くは調査されておらずかつ理解度も劣っている (Wedzicha, J. A. 2002 Chest 121: 136S-141S)。急性増悪期は長期に渡ることによって生活の質に顕著な影響が生じかつCOPDの進行が加速する可能性がある (Soto F. J. 他、2003 Pulm Med 9: 117-124)。呼吸器感染がCOPD増悪の最も一般的な原因である。そのような感染は大部分が細菌によって引き起こされるが、それらの多くはウイルス感染、特にレトロウイルス感染によるものである (Soto F. J. 他、2003)。また、環境の要因、空気汚染および温度がある役割を果たしている可能性もある。

10

## 【0225】

COPDにかかっている患者では、増悪期中に好中球が増大しかつ唾液の中に存在するIL-6、IL-8、TNF およびLTB4の濃度が増大する。中程度からひどいCOPDにかかっているある患者は頻りに増悪期になる傾向がある (1年当たり3回以上の増悪期)。このような群の患者 (「増悪期の頻度が高い」) では、COPDが安定している時でさえ、IL-6の濃度がより高かつ分泌白血球蛋白分解酵素阻害因子の濃度が低い (Bhowmik A. 他、2000 Thorax 55: 114-120; Gompertz S. 他、2001 Thorax 56: 36-41; Gompertz S. 他、2001 Eur Respir J 17: 1112-1119)。

20

## 【0226】

他の数多くの機構、例えば酸化応力および細菌のコロニー化なども同様にCOPD増悪期の病生理学に関係していると思われる。

## 【実施例1】

## 【0227】

哺乳動物細胞を用いたIL-6抗体のクローン化および発現

典型的な哺乳動物発現ベクターは、mRNAの転写開始、抗体コード配列および転写物の転写およびポリアデニル化の終止に必要なシグナルを調節する少なくとも1つのプロモーター要素を含有する。追加的要素には、エンハンサー、Kozak配列およびRNAスプライシング用ドナーおよびアクセプター部位と隣接している介在配列が含まれる。SV40に由来する早期および後期プロモーター、レトロウイルス、例えばRSV、HTLV I、HIV Iなどに由来する長い末端反復 (LTRS) およびサイトメガロウイルス (CMV) の早期プロモーターを用いて高い効率の転写を達成することができる。しかしながら、また、細胞構成要素 (例えばヒトアクチンプロモーター) を用いることも可能である。本発明を実施する時に用いるに適した発現ベクターには、例えばpIRES1neo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSNまたはpLNCX (Clontech Labs, Palo Alto, CA), pcDNA 3.1 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-) またはpcDNA 3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVLおよびPMSG (Pharmacia, Uppsala, Sweden), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) およびpBC12MI (ATCC 67109) などの如きベクターが含まれる。適切な哺乳動物および他の宿主細胞には、ヒトHeLa、293、H9およびJurkat細胞、マウスNIH3T3およびC127細胞、Cos 1、Cos 7およびCV 1、ウズラQC1-3細胞、マウスL細胞およびチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞が含まれる。別法として、染色体の中に一体化している遺伝子を含有する安定な細胞株を用いて遺伝子を発現させることも可能である。選択可能マーカー、例えばdhfr、gpt、ネオマイシンまたはヒグロマイシンなどを用いた共トランスフェクションを用いて、そのトランスフェクションを受けさせた細胞の同定および単離を行うことができる。

30

40

50

## 【0228】

また、その移入させた遺伝子を増幅させることでコード化抗体を多量に発現させることも可能である。興味を持たれる遺伝子のコピーを数百または数千個さえ持つ細胞株を生じさせようとする時にはDHFR（ジヒドロホレート還元酵素）マーカーが有用である。別の有用な選択マーカーは酵素であるグルタミン合成酵素（GS）（Murphy, 他、Biochem. J. 227: 277 - 279 (1991); Bebbington, 他、Bio/Technology 10: 169 - 175 (1992)）である。そのようなマーカーを用いて哺乳動物の細胞を選択性培地の中で増殖させた後、最も高い耐性を示す細胞を選択する。そのような細胞株は染色体の中に一体化している増幅した遺伝子1種または2種以上を含有する。抗体の産生ではしばしばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）およびNSO細胞が用いられる。

10

## 【0229】

発現ベクターpC1およびpC4はラウス肉腫ウイルスの強力プロモーター（LTR）（Cullen, 他、Mol. Cell. Biol. 5: 438 - 447 (1985)）に加えてCMVエンハンサーのフラグメント（Boshart, 他、Cell 41: 521 - 530 (1985)）を含有する。多数のクローン化部位、例えば制限酵素開裂部位BamHI、XbaIおよびAsp718などを伴う部位を存在させると興味を持たれる遺伝子のクローン化が容易になる。そのようなベクターに3'イントロンに加えてラットプレプロインスリン遺伝子のポリアデニル化および終止シグナルを含有させる。

20

## 【0230】

CHO細胞を用いたクローン化および発現

IL-6抗体を発現させる目的でベクターpC4を用いることができる。プラスミドpC4はプラスミドpSV2-dhfr（ATCCアクセス番号37146）の誘導体である。そのプラスミドは、SV40早期プロモーターの制御下にあるマウスDHFR遺伝子を含有する。そのようなプラスミドを用いたトランスフェクションを受けさせたチャイニーズハムスター卵巣細胞またはジヒドロホレート活性を示さない他の細胞を化学治療薬であるメトトレキサートを補充しておいた選択的培地（例えばアルファマイナスMEM、Life Technologies、Gaithersburg, MD）の中で増殖させることで前記細胞を選択することができる。メトトレキサート（MTX）に耐性を示す細胞の中でDHFR遺伝子を増幅させることは十分に示されている（例えばF. W. 1 Alt, 他、J. Biol. Chem. 253: 1357 - 1370 (1978); J. L. HamlinおよびC. Ma, Biochem. et Biophys. Acta 1097: 107 - 143 (1990); およびM. J. PageおよびM. A. Sydenham, Biotechnology 9: 64 - 68 (1991)）を参照）。MTXの濃度を高くして細胞を増殖させながら標的酵素であるDHFRを過剰に産生させるとDHFR遺伝子が増殖する結果として前記薬剤に対する耐性が生じる。2番目の遺伝子を前記DHFR遺伝子と連結させておくと、それが通常は一緒に増殖しかつ過剰に発現する。そのようなアプローチを用いて増殖した遺伝子1種または2種以上のコピーを1,000個以上担持する細胞株を生じさせることができることが本技術分野で知られている。次に、メトトレキサートを除去した時点で、宿主細胞の1つ以上の染色体と一体化している増幅した遺伝子を含有する細胞株が得られる。

30

40

## 【0231】

また、ラウス肉腫ウイルスの長い末端反復（LTR）の強力なプロモーター以外の高効率プロモーター、例えばヒト - アクチンプロモーター、他のレトロウイルス、例えばHIVおよびHTLV Iなどに由来するSV40早期もしくは後期プロモーターまたは長い末端反復などを発現で用いることも可能である。哺乳動物細胞を用いてIL-6抗体を規則的な様式で発現させようとする時にClontechのTe-OffおよびTet-On遺伝子発現システムおよび同様なシステムを用いることも可能である（M. GossenおよびH. Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547 - 5551 (1992)）mRNAのポリアデニル化では、他のシグナル、例えば

50

ヒト成長ホルモンまたはグロビン遺伝子に由来するシグナルなども同様に使用可能である。また、染色体と一体化している興味の持たれる遺伝子を担持する安定な細胞株を選択可能マーカー、例えば *gpt*、G418 またはヒグロマイシンなどを用いた共トランスフェクションで選択することも可能である。開始時に2種以上の選択可能マーカー、例えばG418とメトトレキセートなどを用いる方が有利であり得る。そのプラスミド pC4 を制限酵素で消化させた後、本技術分野で公知の手順を用いて、ウシ腸ホスファターゼを用いて脱リン酸を起こさせる。次に、そのベクターを1%のアガロースゲルを用いて単離する。

#### 【0232】

完全 IL-6 抗体をコードする DNA 配列、例えば本発明の IL-6 抗体の HC および LC 可変領域に相当する配列識別番号：98 および 96 で示される如き配列をそれぞれ公知方法段階に従って用いる。この構築ではまた安定なヒト定常領域（即ち HC および LC 領域）をコードする単離核酸も用いる。

10

#### 【0233】

次に、その DNA をコードする単離可変と定常領域および脱リン酸ベクターを T4 DNA リガーゼで連結させる。次に、大腸菌 HB101 または XL-1 Blue 細胞に遺伝子導入を受けさせた後、例えば制限酵素分析などを用いて、プラスミド pC4 の中に挿入したフラグメントを含有する細菌を同定する。

#### 【0234】

活性 DHFR 遺伝子を持たないチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞をトランスフェクションで用いる。リポフェクチンを用いて5マイクログラムの発現プラスミド pC4 と 0.5マイクログラムのプラスミド pSV2-neo を一緒に移入させる。そのプラスミド pSV2-neo は主要な選択可能マーカー、即ち G418 を包含する群の抗生物質に耐性を与える酵素をコードする Tn5 に由来する neo 遺伝子を含有する。その細胞を G418 を1マイクログラム/ml 補充しておいたアルファマイナス MEM に種付けする。2日後に細胞をトリプシンで消化させた後、ハイブリドーマクローン化用プレート (Greiner、ドイツ) の中のメトトレキセートを10、25 または 50 ng/ml に加えて G418 を1マイクログラム/ml 補充しておいたアルファマイナス MEM に種付けする。約10-14日後、単一のクローンをトリプシンで消化させた後、メトトレキセートをいろいろな濃度 (50 nM、100 nM、200 nM、400 nM、800 nM) で用いて、6穴ペトリ皿または10ml のフラスコに種付けする。次に、最も高いメトトレキセート濃度の時に増殖するクローンをメトトレキセートを更により高い濃度 (1 mM、2 mM、5 mM、10 mM、20 mM) で入れておいた新しい6穴プレートに移す。同じ手順を100-200 mM の濃度で増殖するクローンが得られるまで繰り返す。所望遺伝子産物の発現を分析、例えば SDS-PAGE およびウエスタンブロットまたは逆相 HPLC 分析などで分析する。

20

30

#### 【実施例2】

#### 【0235】

抗-IL-6 抗体の構築および選別

IL-6 抗体の変異体 (クローン AME-A9) を構築しかつ活性に関して選別した。この実施例および本明細書の他の場所に示す CDR は Kabat が定義した通りであるが、但し Kabat と Chothia の定義の合計である CDRH1 は除く。全体領域を網羅する2つの個別ライブラリーを構築するには CDRH2 の長さにする必要があった。興味の持たれるクローンの配列を決定した後、ELISA および細胞が基になった検定で更に特徴付け、そして速度定数を測定した。

40

#### 【0236】

精製 IgG を用いて実施した ELISA の例を図9に示す。この ELISA では、一般に、ヤギ抗-ヒトカッパ抗体で被覆しておいた Costar 3366 ミクロタイタープレートを用いた。Fab (または IgG) の希釈液を前記被覆を受けさせておいた穴の中に入れて22で1時間インキュベートした。次に、前記穴を PBS (Tween 20 が0.1%) で洗浄した後、ビオチニル化 IL-6 を 200 ng/ml 加えて1時間置い

50

た。洗浄後に NeutrAvidin のアルカリ性ホスファターゼ接合体を加えた後、22 で 1 時間インキュベートした。強力に洗浄した後に比色分析用基質を加えて、結合した IL - 6 を測定した。この ELISA の変法に、ビオチニル化 IL - 6 のインキュベーションを行った後に PBS (BSA が 0.01%) を 37 で用いた洗浄段階をピーカーの中で長時間実施、例えば 18 時間の長時間の洗浄を実施することを含めた。

#### 【0237】

その生じさせた本発明のヒト改変 IL - 6 反応性 IgG モノクローナル抗体の数種が示した親和定数は  $1 \times 10^9$  から  $9 \times 10^{12}$  の範囲である。そのようなヒト改変モノクローナル抗体は高い親和性を示すことから、IL - 6 依存疾患、病気または関連状態における治療用途で用いるに適切である。

10

#### 【0238】

前記抗体が有する CDR 領域の中の 1 つ以上を変えることで多数の異なるヒト改変抗 - IL - 6 抗体変異体を得た。以下の表 3 に、個々の CDR ライブラリーの中に存在していた有益な変異体の要約を示す (アミノ酸の変化は AME - A9 変異体を基準にした変化である)。加うるに、以下の表 13 に、軽および重鎖 CDR のアミノ酸配列を可能性のある置換位置 (「X」の印を付ける) と一緒に示す。

#### 【0239】

個々の CDR ライブラリーの中に存在する最良のクローン (即ち変異体) を基にして「組み合わせ」ライブラリーを構築した。表 4 に、その「組み合わせ」ライブラリーに含めた変異体を示す。その組み合わせライブラリーに選別および特徴付けをこの上に記述したようにして受けさせた。より良好なクローンの中の 6 クローンに見られた変異を以下の表 5A に示す一方で、そのようなクローンの中の CDR の配列識別番号を表 5B に示す。

20

#### 【0240】

##### 細胞が基になった検定を用いた抗 - IL - 6 IgG の検定

キメラ抗 - IL - 6 およびヒト改変抗 - IL - 6 (クローン AME - 19a) 抗体にこれらが IL - 6 依存細胞株の増殖を防止する能力に関する試験を受けさせた。7TD1 細胞を Costar 3610 96 穴プレートに穴 1 個当たり 200 個の細胞になるように入れて平板培養した。抗体を IMDM 培地で希釈して前記穴に加えた後、ヒト IL - 6 を  $500 \text{ pg/ml}$  の最終濃度になるように加えて、プレートを組織培養インキュベーターの中で 64 - 72 時間インキュベートした。その時間が経過した時点で穴の全部に ATPlite キット (Packard Bioscience) の細胞溶解用緩衝液を  $50 \mu\text{l}$  加えた後、そのプレートを 3 分間攪拌した。ATPlite 基質を  $50 \mu\text{l}$  加えた後のプレートに蓋をして、それを 1 分間振とうした。照度計を用いて化学発光を測定した。

30

#### 【0241】

細胞が基になった検定の結果を図 10 に示し、計算した  $EC_{50}$  値を以下の表 6 に示す。キメラ抗 - IL - 6 抗体が示した  $EC_{50}$  値は  $2.7 \times 10^{-11} \text{ M}$  ( $4.09 \text{ ng/ml}$ ) であり、そしてヒト改変抗 - IL - 6 (クローン AME - 19a) 抗体が示したそれは  $2.7 \times 10^{-12} \text{ M}$  ( $0.41 \text{ ng/ml}$ ) であった。そのヒト改変抗体が示した  $EC_{50}$  値は改善度が約 10 倍であることを示していたが、約 10 倍から約 60 倍 (これらの間の値を包含) の  $EC_{50}$  値改善度を得ることも可能であり得る。

40

#### 【実施例 3】

#### 【0242】

##### ヒト改変抗 - ヒト IL - 6 抗体の結合速度

前記宿主細胞から精製した抗体が IL - 6 と濃度依存様式で結合することを ELISA 分析で実証する。このケースでは、前記抗体がこれの同種抗原 (エピトープ) に対して示す親和力を測定する。BIAcore 分析および KinExA 3000 装置を用いて定量的結合定数を得る。その結果は、本ヒト改変モノクローナル抗体の数種は  $1 \times 10^9$  から  $3 \times 10^{14}$  の範囲の  $K_D$  で非常に高い親和性を示すことを示している。

#### 【0243】

抗 - ヒト IL - 6 モノクローナル抗体 (AME - A9、AME - A16、AME - 18

50



a、AME - 20 b、AME - 22 aおよびAME - 23 a)を用いかつ可溶IL - 6受容体であるsIL - 6 Rと結合したIL - 6を検出するための正対照としてCNTO 328を用いる酵素免疫検定(EIA)を実施した。可溶ヒトIL - 6受容体であるsIL - 6 Rおよび組換え型ヒトIL - 6をR&D Systems (Minneapolis、MN)から入手した(それぞれカタログ番号227 - SR - 025および206 - IL - 010)。西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗 - ヒトIgG (H+L鎖)をJackson Immunoresearch (West Grove、PA)から入手した(カタログ番号109 - 035 - 003)。過酸化水素およびOPD錠剤をSigma (St. Louis、MO)から入手した(それぞれカタログ番号H - 1009およびP - 8287)。

10

## 【0244】

sgp80 / IL - 6 / 抗 - IL - 6 mAb複合体生成に関する酵素結合免疫検定

Costar EIAプレート(Corning / Costar、Acton、MA)(カタログ番号9018)にsIL - 6 R(PBS中10  $\mu$ g / ml、100  $\mu$ l / 穴)による被覆を4 で一晩受けさせた。前記プレートをTween 20含有量が0.02% (体積 / 体積)の0.15 M食塩水で洗浄した後、PBS中1% (重量 / 体積)のBSAを200  $\mu$ l / 穴用いて穴を室温で1時間に渡ってブロックした。前記穴を再び洗浄した後、次のフォーマットで、PBS中200 ng / mlのヒトIL - 6 (100  $\mu$ l / 穴)と一緒に室温で1時間インキュベートした。抗体を全ての穴に10  $\mu$ g / mlの出発濃度から10倍の連続希釈で100  $\mu$ l / 穴の量で加えて室温に1時間置いた。前記穴を洗浄した後、HRP結合ヤギ抗 - ヒトIgG (H+L) (PBS中10  $\mu$ g / ml)と一緒にして室温で30分間インキュベートした。前記穴を洗浄した後、クエン酸 - 燐酸塩基質用溶液(クエン酸が0.1 Mで燐酸ナトリウムが0.2 MでH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>が0.01%でOPDが1 mg / ml)を100  $\mu$ l / 穴加えて室温に15分間置いた。4 Nの硫酸を25  $\mu$ l / 穴加えることで反応を停止させた後、自動ELISAプレート読み取り装置(Molecular Devices Spectromax Plus、Sunnyvale、CA)を用いてOD<sub>490</sub>を読み取った。

20

## 【0245】

IL - 6を抗hIL - 6モノクローナル抗体またはCNTO 328と一緒に前以てインキュベートした場合の効果を試験する目的で、10  $\mu$ g / mlの抗体量で出発した10倍の連続的希釈液(100  $\mu$ l)と一緒に200 ng / mlのIL - 6 (100  $\mu$ l)を室温で1時間インキュベートした。次に、その前以てインキュベートしておいた混合物をsIL - 6 Rと一緒にして室温で1時間インキュベートした後、HRP結合ヤギ抗 - ヒトIgG (H+L) (PBS中10  $\mu$ g / ml)を用いてsIL - 6 R / IL - 6 / 抗ヒトIL - 6複合体の検出を室温で30分かけて実施した。その検定条件の残りはこの上のパラグラフに記述した条件と同じであった。

30

## 【0246】

EIA plate internal技術レポートを基にした以前の研究により、被覆しておいたsIL - 6 RがIL - 6を捕捉するとCNTO 328でそれを検出することができることが分かっていた。加うるに、AME - A9、AME - A16、AME - 18 a、AME - 20 b、AME - 22 aおよびAME - 23 aを用いることでもsgp80 (sIL - 6 R)と結合したIL - 6をEIAを用いて用量依存様式で検出することができる。ヒト改変抗 - IL - 6抗体の各々にCNTO 328を基準にした評価を受けさせた。しかしながら、IL - 6と前記抗hIL - 6モノクローナル抗体のいずれかを前以てインキュベートしておくことsIL - 6 RがIL - 6と結合する能力がなくなる。

40

## 【0247】

## 抗 - IL - 6 IgGに関する速度定数の測定

Sapidyneが製造しているKinExA 3000装置を用いて結合速度を測定した。簡単に述べると、ヒトIL - 6をアルザクトンビードと共有結合させた後、このビードと遊離IgGの結合を前記装置を用いて検出した。K<sub>D</sub>を測定する目的で、IgGを

50

0.5、1または5 pMの一定濃度で入れることに加えて連続的に希釈度を高くしたヒトIL-6を入れておいた個々の管をBSAが0.1%のPBS中で20で3-4日間インキュベートした。各 $K_D$ 測定毎に全体で13個の管を用いた。例えば、キメラ抗-IL-6抗体を5 pMの一定濃度で用い、そして個々の管を0-200 pMのIL-6と一緒にインキュベートした。他のIgGに関するインキュベーションも同様な様式で設定した。インキュベーション後に平衡状態のサンプル各々に入っている遊離IgGの測定をKinExA 3000装置をこの製造業者の指示に従って用いることで実施した。KinExA 3000装置を以下により詳細にするようにして用い、KinExA 3000ソフトウェアを用いて $K_D$ 値を決定した。

#### 【0248】

$k_{on}$ を測定する目的で個々のIgGを200 pMの量で100-200 pMのヒトIL-6と混合した後、KinExA 3000装置を用い、アルザクトンビードと共有結合させておいたヒトIL-6との結合を用いることで、結合しなかったIgGを検出した。一連の測定値を経時的に取った。その結果として得たデータを用い、KinExA 3000ソフトウェアを用いることで、 $k_{on}$ を計算した。式 $k_D = k_{off} / k_{on}$ を用いて $k_{off}$ を計算した。抗-IL-6 IgGに関する速度定数の要約を表7に示す。

#### 【実施例4】

#### 【0249】

抗-IL-6抗体のインビトロ特徴付け

抗-IL-6抗体の配列、エピトープ特異性、親和力および生物学的活性を特徴付けるインビトロ試験を実施した。

#### 【0250】

ヒト改変mAb

配列分析を用いて、本発明の抗-IL-6抗体(いろいろな変異体/クローンとして具体化した)が完全にヒトのフレームワークを含有することを立証する。表5aは、本発明の抗-IL-6抗体(本抗体のいろいろな変異体)ではCDR1、2および3の重鎖および軽鎖の両方ともキメラ抗-IL-6抗体(PCT WO 04/039826に記述されている)に比べて全体で10個のアミノ酸残基が変化したことを示している。

#### 【0251】

エピトープ特異性

本発明の抗-IL-6抗体およびキメラ抗-IL-6抗体はヒトIL-6上の同様なエピトープを認識する。これらの抗体はR&D Systems #MAB-206の商業的マウス抗-ヒトIL-6 mAbとは競合せず、このことは、それらは前記R&Dの抗-IL-6 mAbが認識するエピトープとはユニークに異なるエピトープを認識することを示唆している。本発明の抗-IL-6抗体およびキメラ抗-IL-6抗体はR&Dのラット抗-ヒトIL-6 mAbとは競合しない。

#### 【0252】

プレートに結合させておいた抗-IL-6 mAb [マウス抗-ヒトIL-6 mAb、即ちMAB-206(これを単にヒトIL-6を捕捉するプレート結合mAbとして用いた)](10  $\mu$ g/ml)を用いてヒトIL-6(200 ng/ml)を捕捉させた後、前記プレートに本発明の抗-IL-6抗体およびキメラ抗-IL-6抗体の一連の希釈液を加えた(X軸に沿って示すように)。IL-6との結合度合がOD<sub>490</sub>がY軸に沿って高くなるとして測定した。本発明の抗-IL-6抗体およびキメラ抗-IL-6抗体の両方ともがIL-6との結合を用量依存様式で示す。

#### 【0253】

逆に、本発明の抗-IL-6抗体およびキメラ抗-IL-6抗体はヒトIL-6に対して競合的結合を示し、このことは、その2種類の分子がIL-6上の同様な結合エピトープを共有することを示唆している。プレートに結合させておいたMAB-206(10  $\mu$ g/ml)を用いてヒトIL-6(200 ng/ml)を捕捉させた。次に、前記プレートにX軸に沿って示す如き本発明の抗-IL-6抗体の一連の希釈液およびビオチニル化

10

20

30

40

50

キメラ抗 - I L - 6 抗体を 5 0 n g / m l 加えた。ビオチニル化キメラ抗 - I L - 6 抗体と I L - 6 の結合をストレプトアビジン - H R P で検出して、Y 軸に沿った O D <sub>490</sub> 読み取り値として測定した。

【 0 2 5 4 】

その上、本ヒト改変抗体およびキメラ抗体は s I L - 6 / s I L - 6 R 複合体に対する結合に関して同様な特性を示す ( 図 1 )。本発明の抗 - I L - 6 抗体は s I L - 6 / s I L - 6 R 複合体と結合する。前記プレートに可溶 I L - 6 受容体 ( s I L - 6 R ) による被覆を濃度が 1 0 μ g / m l になるように受けさせた。次に、前記プレートにヒト I L - 6 を 2 0 0 n g / m l の濃度で加えた。次に、前記プレートに X 軸に沿って示す如き本発明の抗 - I L - 6 抗体またはキメラ抗 - I L - 6 抗体の一連の希釈液を加えた後、I L - 6 / s I L - 6 R 複合体との結合を H R P - 抗 - ヒト I g G を用いて検出して、Y 軸に沿った O D <sub>490</sub> 読み取り値として測定した。

10

【 0 2 5 5 】

この上で見いだしたことを更に立証する目的で、7 T D 1 ( I L - 6 依存マウスハイブリドーマ細胞株 ) の細胞が基になった増殖検定を用いて、いろいろな種の I F N 刺激 P B M C および L P S を用いて生じさせた I L - 6 含有条件付き上澄み液を用いて異種間反応性試験を実施した。いろいろな霊長類種 ( ヒト、マーモセット、カニクイザル、チンパンジー、赤毛猿、バブーン、ブタオザルおよびコットントップモンキーを包含 ) に由来する 7 T D 1 細胞増殖の刺激で前記条件付き上澄み液が示す活性を本発明のヒト改変抗体が中和することが分かり、かつ前記キメラ抗体と比べて同様な異種反応パターンを示した ( 表 8 )。

20

【 0 2 5 6 】

最後に、トリプシン消化方法を用いてエピトープマッピングを実施した時、本ヒト改変抗体およびキメラ抗体がヒト I L - 6 に対して示す結合エピトープは同じであることを観察し、そしてそれは H e l i x D 貫通アミノ酸残基 1 6 8 - 1 8 4 上に位置する ( 図 3 )。最近の変異分析により、本発明の抗体が I L - 6 と結合するには残基 1 7 9 および 1 8 2 が必須であることが分かった。そのエピトープ ( アミノ酸残基 1 6 8 - 1 8 4 ) はヒト改変抗 - I L - 6 抗体の存在下で重水素を保持する I L - 6 表面であると同定した。

【 0 2 5 7 】

生物学的活性

ヒト改変抗 - I L - 6 抗体が示す I L - 6 中和効力の測定を 7 T D 1 細胞が基になったバイオアッセイで実施した。ヒト改変抗 - I L - 6 抗体が 7 T D 1 細胞増殖検定で示した中和効力はキメラ抗 - I L - 6 抗体が示したそれに比べて 1 0 倍高かった。7 T D 1 細胞に h I L - 6 を 5 0 0 p g / m l 用いた刺激を一連の希釈したヒト改変抗 - I L - 6 抗体またはキメラ抗 - I L - 6 抗体またはアイソタイプ対照 m A b の存在下で 7 2 時間受けさせた。細胞増殖を 1 秒当たりのカウント数として測定し、それは Y 軸に示す如くであった。誤差棒グラフは重複したサンプルの S D を示している。黒丸は I L - 6 を用いなかった細胞を示し、白丸は、h I L - 6 を 5 0 0 p g / m l 用いた刺激を受けさせた細胞を示す。

30

【 0 2 5 8 】

ヒト改変抗 - I L - 6 抗体はまた U 9 3 7 細胞による I L - 6 誘発単球走化性蛋白質 - 1 ( M C P - 1 ) 産生 ( 図 3 ) および H e p G 2 ヒトヘパトーマ細胞による I L - 6 / I L - 1 誘発血清アミロイド A ( S A A ) 産生 ( 図 4 ) も抑制する。図 3 は、ヒト改変抗 - I L - 6 抗体が U 9 3 7 細胞による I L - 6 刺激 M C P - 1 分泌を抑制することを示している。穴 1 個当たり  $5 \times 10^5$  個の細胞に h I L - 6 を 1 n g / m l およびヒト改変抗 - I L - 6 抗体の一連の希釈液を用いた処置を 7 2 時間受けさせた。細胞培養物の上澄み液に E L I S A による分析を M C P - 1 の存在に関して三重に受けさせた。

40

【 0 2 5 9 】

図 4 は、ヒト改変抗 - I L - 6 抗体が H e p G 2 細胞による I L - 6 および I L - 1 刺激 S A A 分泌を抑制することを示している。  $2.25 \times 10^5$  個の細胞に h I L - 6 を

50

100 ng/ml、sIL-6Rを200 ng/mlおよびIL-1を1 ng/ml用いた刺激をヒト改変抗-IL-6抗体の一連の希釈液の存在下で24時間受けさせた。次に、細胞培養物の上澄み液にELISAによる分析をSAAの存在に関して二重に受けさせた。

#### 【0260】

##### IL-6依存Stat3磷酸化

ヒト改変抗-IL-6抗体がIL-6がIL-6Rおよびgp130と結合する結果としてもたらされるシグナル伝達カスケードを阻害する能力を評価する目的で免疫沈澱検定を実施することで、gp130を細胞表面に発現するTHP-1細胞におけるIL-6依存STAT3磷酸化に対する効果を試験した。

10

#### 【0261】

mAbに無菌濾過による濾過殺菌を受けさせた後、PBSに入れて4℃で貯蔵した。R&D Systems (Minneapolis, MN)の組換え型ヒトIL-6(206-IL-010)およびsIL-6R(227-SR-025)を用いた。RPMI培地(11875-085)、熱不活化ウシ胎仔血清(16000-069)、L-グルタミン(25030-81)、非必須アミノ酸(11140-050)およびピルビン酸ナトリウム(11360-070)をInvitrogen (Carlsbad, CA)から入手した。また、TBS(10 mMのTris、pH 7.5、100 mMのNaCl)も用いた。

#### 【0262】

研究細胞銀行から受け取ったTHP-1、即ちヒト急性単球性白血病細胞株に試験を受けさせた結果、マイコプラズマ陰性で細菌も存在していなかった。前記細胞をウシ胎仔血清を10%とグルタミンを2 mMとピルビン酸ナトリウムを1 mM含有させておいたRPMI培地に入れて培養した。培養物が約85%の密集度に到達した時点で細胞を二次培養するか或は収穫した。細胞を常規通り3日毎に1:5に分割した。

20

#### 【0263】

チロシン磷酸化では、細胞をT-225フラスコの中で密集度が80-90%になるまで増殖させた。その培地を除去した後、血清が入っていない新鮮な培地を代わりに入れて、一晚インキュベートした。血清を欠乏させた後の細胞を各フラスコから収穫し、沈澱させた後、各条件毎に最終濃度が $20 \times 10^6$ 個の細胞を血清を含有しない0.5 mlの培地に入れて再懸濁させた。

30

#### 【0264】

RhIL-6(0.1 μg/ml)を下記の反応体と一緒に37℃で15分間予備培養した: 0.5 mlの培養単独、抗-IL-6 Ab(10 μg/ml)およびsIL-6R(0.2 μg/ml)。次に、抗-IL-6 AbおよびsIL-6Rのそれぞれと一緒に予備培養しておいた細胞にsIL-6R(0.2 μg/ml)および抗-IL-6 Ab(10 μg/ml)を加えて37℃で15分間培養した。次に、その細胞を負対照としての培地およびIL-6/Ab/sIL-6R複合体と一緒にした後、37℃で6分間インキュベートした。その細胞を氷冷TBSで2回洗浄した後、細胞沈澱物をセクション5.4に記述する如く処理するか或は-70℃で貯蔵した。

40

#### 【0265】

免疫沈澱では、細胞沈澱物を完全プロテアーゼ阻害剤カクテル錠剤(1697498、Roche、Basel、スイス)を入れておいた1 mlの溶解用緩衝液(50 mM Tris、pH 7.5、300 mM NaCl、0.5% Triton-X-100)(T-9284、Sigma、St. Louis、MO)に入れて溶解させた。その細胞を30秒間渦巻き攪拌した後、-70℃で20-60分間インキュベートした。細胞の屑を13,000 rpmの遠心分離で20分かけて除去した。非特異的背景染色の度を低下させる目的で、そのサンプルを2 μgのウサギIgG(I5006、Sigma、St. Louis、MO)と50 μlの蛋白質Aアガロース(SC-2001、Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA)と一緒にしてオ

50

ービタルミキサー上で4 で1時間インキュベートすることで前以て綺麗にしておいた。そのアガロースビードを2500rpmの遠心分離で5分かけて除去した。その綺麗にした溶解産物をマイクロ遠心分離管に移し、抗-STAT3(2 $\mu$ g/ml)(SC-7179、Santa Cruz Biotechnology)と一緒にしてオービタルミキサー上で4 で一晩インキュベートした後、蛋白質Aアガロースビードを50 $\mu$ 加えて、オービタル振とう機上で4 で2時間インキュベートした。そのアガロースビードを2500rpmの遠心分離で5分かけて集めた後、4 の氷冷TBSで5回洗浄した。次に、そのアガロースビードを40 $\mu$ lのLaemmliサンプル緩衝液とDTT(NP0007-465030、Invitrogen、Carlsbad、CA)に入れて懸濁させた後、95 に5分間加熱した。

10

## 【0266】

そのサンプルを3-8%のNuPage Bis-Trisゲル(EA0375BOX、Invitrogen、Carlsbad、CA)上に置いて緩衝液(NP0002-465026、Invitrogen、Carlsbad、CA)を用いて100Vで1時間流すことで分離させた。トランスファー緩衝液(NP0006-465029、Invitrogen、Carlsbad、CA)を用いて蛋白質をニトロセルロース膜(LC2001、Invitrogen、Carlsbad、CA)に30Vで1時間かけて移した。その膜をTBS-T中10%の無脂肪乾燥乳(Nestle、Glendale、カリフォルニア)に入れて4 で一晩ブロッキングを実施した。室温のTBS-Tを用いた洗浄を数回受けさせた後の膜をマウスモノクローナル抗-p-STAT3 Ab(SC-8059、Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA)(TBS-Tで1:1000に希釈しておいた)と一緒にしてオービタル振とう機上で4 で4時間インキュベートした。次に、洗浄を数回受けさせた後の膜をロバ抗-マウスIgG-HRP(1:1000)(SC-2318、Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA)と一緒にしてオービタルミキサー上で室温で2時間インキュベートした。洗浄を数回受けさせた後のサンプルにECLplus Western Blot Detection Reagentsおよび分析用キット(RPN2108、Amersham Biosciences、 Piscataway、NJ)を製造業者のプロトコルに従って用いることによる検定を受けさせた後、ECLフィルムに暴露させることで可視化した。次に、その膜を100mMのDTT、2%のSDS、62.5mMのTris-HCl(pH6.7)に浸漬して100 で30分間攪拌することでAbを除去した。次に、その膜をTBS-Tで洗浄した後、それに10%の無脂肪乾燥乳を用いたブロッキングを一晩受けさせた。その膜を洗浄した後、抗-STAT3(1:1000)(SC-7179、Santa Cruz Biotechnology)と一緒にTBS-Tに入れて4 で2時間インキュベートし、5回洗浄した後、ヤギ-抗-ウサギIgG-HRP(1:1000)(SC2030、Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA)と一緒にして1時間インキュベートし、そしてECLplusを用いた検出を実施した。あらゆる膜にストリッピングを常規通り受けさせた後、STAT3を用いた再検査を受けさせることでSTAT3蛋白質の存在を立証した。

20

30

40

## 【0267】

この結果により、ヒト改変抗-IL-6抗体がIL-6媒介stat3磷酸化、即ちIL-6シグナル伝達経路の鍵となる成分を阻害することが分かった(図5Aおよび5B)。ヒト改変抗-IL-6抗体ヒト改変抗-IL-6抗体(AME-19A)はIL-6/sIL-6R誘発stat3磷酸化を抑制する。組換え型ヒトIL-6/sIL-6R誘発stat3磷酸化をTHP-1細胞内で検出した(図5B)。ヒト改変抗-IL-6抗体(AME-19A)またはキメラ抗-IL-6抗体を10 $\mu$ g/ml添加するとstat3磷酸化が完全に抑制された(図5B)。図5Aは、いろいろなヒト改変抗-IL-6クローンに相当するあらゆるサンプル中に存在する磷酸化されていないstat3蛋白質の量が同様であることを示している。本明細書で用いる如きCNT0328(または32

50

8) はキメラ、ヒト - マウス抗体 [ また野生型 ( W T ) と呼ぶ ] を表し、150 はクローン A M E - 22 a を表し、143 はクローン A M E - 23 a を表し、140 はクローン A M E - 20 b を表し、136 はクローン A M E - 19 a を表し、130 はクローン A M E - 18 a を表し、106 はクローン A M E - A 16 を表し、104 はクローン A M E - A 9 を表す。

【 0 2 6 8 】

ヒト改変抗 - I L - 6 抗体がインビボで示す効力

ヒト改変抗 - I L - 6 抗体が示す効力を異なる 2 種類のインビボモデルで評価した。1 番目として、ヒト改変およびキメラ抗 - I L - 6 抗体が示す効果をマウスを用いたヒト I L - 6 誘発マトリゲル血管形成検定で試験して比較した。200 ng / ml のヒト I L - 6 をマトリゲルプラグに入れた。2 個のマトリゲルプラグを各ヌードマウスに注入した。マウスが 6 匹のグループにヒト改変もしくはキメラ抗 - I L - 6 抗体を 1、3 または 6 mg / kg i . v . 注射することで与えた。また、対照グループには P B S またはアイソタイプ対照 m A b を投与した。プラグを 7 日目に取り出した後、そのプラグ中のヘモグロビン含有量、微小血管の長さおよび微小血管の数を用いて血管形成を測定した。マトリゲルプラグモデルを用いて 3 パラメーター全部で測定した時の結果はヒト I L - 6 ( P B S グループ ) が血管形成を刺激することを示していた。

【 0 2 6 9 】

ヒト改変抗 - I L - 6 抗体 ( A M E - 19 A ) はマトリゲルプラグ中の微小血管平均数を抑制する。加うるに、ヒト改変抗 - I L - 6 抗体 ( A M E - 19 A ) はマトリゲルプラグ中の微小血管の平均長も抑制する。また、ヒト改変抗 - I L - 6 抗体 ( A M E - 19 A ) はマトリゲルプラグ中のヘモグロビン濃度も抑制する。

【 0 2 7 0 】

加うるに、ヒト改変 ( A M E - 19 A ) およびキメラ抗 - I L - 6 抗体は両方ともヌードマウスにおける I L - 6 媒介血管形成を依存様式で抑制した。最後に、ヒト改変およびキメラ抗 - I L - 6 抗体が試験を実施した最も高い用量である 6 mg / kg の時に I L - 6 誘発血管形成で示した活性は匹敵していた。キメラ抗 - I L - 6 抗体は 3 mg / kg の時に血管長および血管数で測定してヒト I L - 6 誘発血管形成を有意に抑制したが、そのような用量の時には、ヒト改変およびキメラ抗 - I L - 6 抗体の間に検出された差は統計学的に有意ではなかった。

【 0 2 7 1 】

ヒト改変抗 - I L - 6 抗体がヒト I L - 6 誘発急性期反応物質である血清アミロイド蛋白質 A ( S A A ) の産生に対して示す効果を更に評価する目的で B a l b / C マウスを用いた追加的インビボモデルを開発した。マウスにヒト I L - 6 を 5 μ g / kg の量で i . v . 投与する 4 時間前にヒト改変抗 - I L - 6 抗体を 0 . 0 1、0 . 5 または 5 mg / kg の量で i . p . 投与することで与えた ( 図 6 )。P B S およびアイソタイプ対照 m A b を対照として用いた。I L - 6 を注入してから 16 時間後に血清中 S A A 濃度を測定した。ヒト改変およびキメラ抗 - I L - 6 抗体は両方とも B a l b / C マウスにおけるヒト I L - 6 誘発 S A A 産生を 0 . 5 および 5 mg / kg の時に有意に抑制し、かつヒト改変抗 - I L - 6 抗体は最も低い試験用量の時にも S A A 産生を有意に抑制した。しかしながら、この試験した 3 用量全部においてヒト改変およびキメラ抗 - I L - 6 抗体の間に観察した差は統計学的に有意ではなかった ( 図 6 )。

【 0 2 7 2 】

図 6 は、ヒト改変抗 - I L - 6 抗体がヒト I L - 6 誘発 S A A 産生を抑制することを示している。各点は、各動物毎の平均 S A A 値を示し、そして線は各グループの中のあらゆるデータ点の平均を示している。対様式の比較を実施し、そして T u k e y の 9 5 % 同時信頼間隔を用いて全体的第 1 種の過誤を制御した ( \* \* p < 0 . 0 0 1、\* p < 0 . 0 5 )。

【 実施例 5 】

【 0 2 7 3 】

抗 - I L - 6 m A b に関する治療原理

関節リウマチ。抗 - I L - 6 m A b がコラーゲン誘発関節炎 ( C I A ) に対して示す効果 - 関節リウマチの動物モデル

臨床前インビボ病気モデル

いろいろなインビボモデルで I L - 6 を標的にした。ラット抗 - マウス I L - 6 抗体を標準的マウスモデルで用いるか或はヒト化抗 - I L - 6 R ( 8 0 k D a ) m A b ( M R A ; C h u g a i ) を霊長類モデルおよびヒト / マウス S C I D モデルで用いた。マウスコラーゲン誘発関節炎 ( C I A ) において、抗 - I L - 6 を後期時間点ではない早期 ( コラーゲンで免疫性を与えてから 0 または 3 日後 ) に用いると病気の予防に有効であった。ヒト滑膜組織を免疫不全マウスに移植したヒト / マウス S C I D 移植モデルでは、M R A の処置によって組織移植片が収縮しかつ炎症性細胞および破骨細胞が減少した。カニクイザルにおける C I A では、M R A が関節炎の発症を抑制しかつ急性期測定値を改善した。

【 0 2 7 4 】

代理抗 - マウス I L - 6 m A b が病気の発症に対して示す効果を C I A モデルで評価した。その結果は、病気誘発前に抗 - マウス I L - 6 を 1 m g / マウス / 週で i . p . 投与すると病気のひどさが顕著に軽減することで示されるようにコラーゲン誘発関節炎の発症が有意に抑制されたことを示している。1 0 0 μ g のウシ I I 型コラーゲンをフロインド完全アジュバント ( F C A ) に入れて 8 週齢の D B A / 1 L a c J マウスの尾の基部に皮内注入することで関節炎を誘発した。マウスを病気の発症に関して毎日臨床的に監視した。C I A を誘発する 2 日前に抗 - I L - 6 m A b またはアイソタイプ対照 m A b を 1 m g / マウスの量で i . p . 投与した後、毎週投与した。関節の膨れ、紅斑および変形を基にして関節炎スコアを決定した。

【 0 2 7 5 】

組織病理学データを用いて、抗 - マウス I L - 6 m A b を毎週 i . p . 注入するとコラーゲン誘発関節炎のパラメーターが有意に向上すると言った臨床的観察を立証した。マウスを抗 - マウス I L - 6 で処置すると、対照 m A b で処置した動物に比べて、検査した関節炎パラメーター [ 炎症反応 ( 滑膜炎およびパンヌス形成 ) および侵食性変化 ( 侵食および全体的関節構造 ) を包含 ] の全部が有意に改善した。抗 - I L - 6 m A b は組織病理学的レベルで関節炎を抑制した。滑膜炎のスコアを滑膜の厚みを基にして付け、パンヌス形成のスコアを関節空間に対するパンヌスの度合を基にして付け、そして侵食のスコアを軟骨および軟骨下骨への侵食度合を基にして付けた。

【 0 2 7 6 】

マウスを抗 - マウス I L - 6 m A b で処置すると軟骨マトリクス蛋白質損失の度合が有意に低下した。抗 - I L - 6 m A b で処置した動物および対照から試験終了 ( 5 3 日 ) 時に得た代表的な関節部分をトルイジンブルー染色で軟骨マトリクスに関して検査した。

【 0 2 7 7 】

ミクロ - C T 分析により、抗 - マウス I L - 6 治療の効果が個々の関節の中の病気進行のレベルで現れると言った臨床的観察が裏付けされた。典型的な 3 D C T 画像を目で検査した結果、抗 - マウス I L - 6 で処置した動物から得た関節で起こっていた軟組織炎症変化は主に穏やかであることに對比してアイソタイプ対照 m A b で処置したグループでは侵食変化の度合が顕著であることが分かる。これらの実験を対照 m A b で処置した代表的な動物および抗 - マウス I L - 6 m A b で処置した動物に関して実施した。

【 0 2 7 8 】

ループス。抗 - I L - 6 が N Z B / W F 1 マウスで示す効果

臨床前インビボ病気モデル

S L E 用のマウスモデルが存在し、それらはヒト病気と非常に類似している。M R L / 1 p r および N Z B / W F 1 株を用いた試験で B 細胞の過剰増殖、自己抗体の産生および免疫複合体の沈着がヒトの病気に非常に類似していることを立証した。抗 - I L - 6 m A b は N Z B / W F 1 マウスにおける自己抗体産生の抑制、タンパク尿の減少および

10

20

30

40

50

動物生存率の改善に効果があることが分かった。

【0279】

代理抗 - マウス IL - 6 mAb がループス病発症に対して示す効果を NZB / W F 1 マウスを用いて評価した。予備結果は、抗 - マウス IL - 6 mAb を 1 mg / マウス / 週の量で 2 週に渡って i . p . 投与すると抗 - dsDNA 自己抗体、即ちこの病気モデルにおける主要な病原性自己抗体の産生が抑制させることを示していた ( 図 7 )。抗 - IL - 6 mAb で処置した動物の場合の抗 - dsDNA 自己抗体濃度は食塩水で処置した動物および対照 A b で処置した動物の場合のそれに比べて試験全体に渡って一定して低かった。

【0280】

この上で考察したように、図 7 は、NZB / W F 1 マウスにおける抗 - dsDNA 自己抗体の産生を抗 - IL - 6 mAb が抑制することを示している。各サンプル毎の個々の O . D . 値を正対照血清に対して正規化し、それを正対照に対する % として示した。各点は各サンプルが正対照に対して示した % を示しており、そして線は、各グループにおけるデータ点全部の平均を示している。差は \* p < 0 . 0 1 として示されるように有意である。

【0281】

加うるに、小さなサブセットの動物に試験を受けさせた時、抗 - IL - 6 mAb は B 細胞の増殖も抑制しかつ腎臓障害も軽減した。試験終了時における T 細胞増殖にはいろいろな処置群の間に有意な差は存在していなかったが、抗 - IL - 6 mAb で処置した動物では、食塩水で処置したマウスのそれに比べて、抗 - IgG および抗 - CD 4 0 で誘発させた B 細胞増殖が経時的、具体的には 3 4 週後に低くなった。このような結果は、この上に報告したように抗 - dsDNA 自己抗体の産生が減少することと一致しており、自己反応性 B 細胞が抗 - IL - 6 mAb 処置の主要な直接的標的になる可能性があることを示唆している。

【0282】

組織病理学的分析により、この試験を受けさせた動物を 3 つの腎疾患ひどさグループ ( 穏やか、中程度およびひどい ) に分類分けすることができることが分かった ( 表 9 )。NZB / W F 1 マウスにおける腎疾患病理学は、糸球体基底膜の中に混合型リンパ過形成と免疫複合体沈着が存在することを示している。

【0283】

抗 - IL - 6 mAb で処置した動物では、ひどい腎疾患を発症する度合いが低かった。抗 - IL - 6 mAb で処置した動物には血管周囲の混合型リンパ過形成と蛋白質沈着が存在しなかったが、食塩水で処置した動物および対照 A b で処置した動物では、抹消血管周囲の混合型リンパ過形成と蛋白質沈着が中程度およびひどく生じた。その上、糸球体基底膜の中で起こる免疫複合体の沈着も抗 - IL - 6 mAb で処置した動物の方が他の 2 処置グループが示したそれよりも穏やかであった。抗 - IL - 6 mAb が B、T およびマクロファージ細胞の機能に対して示す作用の機構のさらなる詳細な分析を実施した、と言うのは、そのような細胞は SLE の病因で重要な役割を果たすからである。

【0284】

2 型糖尿病

IL - 6 は肥満に関連したインスリン耐性の発症で重要な役割を果たすことが示されている。しかしながら、今日までに得られたインビトロおよびインビボデータは、それがインスリン耐性である役割を果たす可能性の裏付けおよび否定の両方である。

【0285】

インビトロ実験

IL - 6 がインスリンシグナル伝達およびインスリンの生物学的効果および機能、例えば糖吸収、遺伝子調節および関連機構などに対して果たしている可能性のある効果をより良好に理解するための実験をインスリン反応性組織のインビトロモデル ( 脂肪組織に関しては 3 T 3 L 1 細胞、肝細胞に関しては Hep G 2 細胞、骨格筋に関しては C 2 C 1 2

10

20

30

40

50



細胞)およびインスリン耐性およびT2DMのインビボモデル、例えばdb/dbマウスなどを用いて実施した。

【0286】

インビトロデータは、IL-6が肝臓におけるインスリンシグナル伝達に対して主要な効果を及ぼすことを示唆している。HepG2細胞をIL-6で処置するとインスリン誘発Akt磷酸化が抑制される。このようにIL-6がインスリンシグナル伝達に対して示す阻害効果は抗-IL-6抗体によって遮断される。肝臓における糖代謝およびインスリン効果が変化することがインスリン耐性およびT2Dの発症を推進する原因であると思われる。IL-6が3T3-L1細胞(脂肪細胞株)およびC2C12(骨格筋細胞株)におけるインスリンシグナル伝達に対して示す効果を測定することでIL-6がT2Dで示す機構を確認する。

10

【0287】

3T3-L1

3T3-L1マウス脂肪細胞株を用いて実験を実施した。90%分化した3T3-L1細胞を用いて、IL-6がインスリン誘発糖吸収に対して示す効果を評価した。この実験において、TNFを10ng/ml用いた処置を24時間行うとインスリン誘発糖吸収が一定して抑制される一方、IL-6を20ng/ml用いても全く影響がなかった。このようなデータは、IL-6が脂肪組織に対して示す活性は主にIL-6媒介インスリン耐性機構ではなく、むしろ、脂肪組織がIL-6の主要源である可能性があり、それが次に肝臓および筋肉におけるインスリン感受性を妨害していることを示唆している。皮下沈着物に由来する分化した初代ヒト脂肪細胞を用いることでも同じデータが得られた。内蔵脂肪沈着物に由来するヒト初代脂肪細胞を用いてIL-6が糖吸収に対して示す効果を試験した、と言うのは、そのような沈着物はインスリン耐性に関連した肥満に対してより高い関連を示す可能性があるからである。

20

【0288】

HepG2

肝臓組織のインビトロ代表例としてHepG2細胞を選択した。HepG2細胞はヒトヘパトーマ細胞株であり、この細胞株を用いることでIL-6がインスリンシグナル伝達に対して効果があることが以前に分かっていた。この実験では、IL-6を20ng/ml用いるとインスリン誘発Akt磷酸化、インスリンシグナル伝達経路における重要なキナーゼが阻害され、60分間のインキュベーション後に最大の効果が観察され、このことは、科学文献に報告された結果と一致している。

30

【0289】

rh IL-6(20ng/ml)を30、60、90および120分間インキュベーションした後に、10cmの皿に入っている密集未満のHepG2細胞を用いてAkt磷酸化を測定した。最後の5分間のインキュベーション中にインスリンを0.5nM、1nMおよび5nM添加することでAkt磷酸化を誘発した。修飾RIPA溶解用緩衝液を用いて細胞を溶解させた後、Ser-Phospho-Akt ELISAを用いてAkt磷酸化を測定した。pAktおよびAkt ELISAキット(BioSource)を用いて結果を得た。IL-6を用いた処置を生理学的濃度(0.5-1nM)のインスリンの存在下で60分間実施すると、Akt磷酸化が対照グループに比較して~50%抑制された。Pierce BCA蛋白質検定キットを用いて蛋白質の濃度を量化した。

40

【0290】

IL-6抗体の効果

IL-6がインスリン誘発Akt磷酸化に対して示す影響をヒト改変抗-IL-6抗体が抑制する能力を測定した。ヒト改変抗-IL-6抗体を20μg/ml用いるとHepG2細胞におけるIL-6の影響が抑制され得る。図8Aおよび8Bに、IL-6がヒト改変抗-IL-6抗体の存在有り無しでインスリン誘発Akt磷酸化に対して示した影響を示す。

【0291】

50

上部の画像（図8A）におけるデータは平均 $\pm$ SEMを示す[\*（+）インスリン、IL-6と比較した有意さ、 $P = 0.029$ ；\*\*（+）インスリン+IL-6と比較した有意さ、 $P = 0.02$ ]。密集未満のHepG2細胞を20ng/mlのIL-6で60分間処置した。最後の5分間の処置中にインスリンを1nM添加しそして修飾RIPA緩衝液を用いて細胞を溶解させた。サンプルをELISAで分析した結果、AktのSer473の所に磷酸化が検出された。あらゆるデータをELISAで測定した全Aktに対して正規化した。AME-19aによる処置によって正常なAktシグナル伝達を回復させることができた。

#### 【0292】

下部の画像（図8B）に代表的なウエスタンブロットを示す。上部の帯には、IL-6（20ng/ml、60分、1nMのインスリンを用いて5分間）、AME-19a（20ug/ml $\pm$ 20ng/mlのIL-6で60分間、1nMのインスリンを用いて5分間）または緩衝液を用いて処置したサンプルが含まれている。ブロットを抗-ホスホSer/Akt抗体（上方のパネル）（pS473、Biosource）で検査した。下方の帯（同じブロットにストリッピングを受けさせた後、Biosourceの抗-Aktを用いて再び検査した）は、レーン毎に相当する蛋白質が充填されたことを示している。

#### 【0293】

方法：

HepG2細胞を100mmの組織培養皿の中で密集するまで増殖させた。細胞をDMEM-1%BSAに入れて一晩絶食状態にした。AME-19a（20ug/ml）を細胞上でIL-6添加に先立って~30分間インキュベートした。IL-6（20ng/ml） $\pm$ AME-19a（20ug/ml）を細胞に添加する前に~30分間インキュベートした。サンプルを細胞上で37 $^{\circ}$ Cにおいて60分間インキュベートした後、細胞に1nMのインスリン（最終濃度）を加えて室温に5分間置いた。細胞を直ちに氷冷PBSで3回濯ぐことで洗浄した。プレートを溶解まで凍結させておいた。ELISAキット（Biosource and Sigma）を用いてホスホAktおよび全Aktを測定した。文献：JJ Senn、PJ Kover、IA NowakおよびRA Mooney。インターロイキン6は肝細胞における細胞インスリン耐性を誘発する。Diabetes、51：3391-3399、2002。

#### 【0294】

初代ラット肝細胞

初代肝細胞は、IL-6および抗-IL-6抗体（または他のIL-6アンタゴニスト）がインスリンシグナル伝達に対して示す効果およびインスリンが肝臓糖産生に対して示す効果を試験する時に用いるに適したより関連のあるインビトロシステムに相当する。インスリン、IL-6および/またはIL-6 mAbで処置したラット肝細胞におけるPI3キナーゼ（PI3K）活性化を測定する目的で単離細胞にインスリンによる処置を5ng/mlのIL-6の存在有り無しで受けさせた後、ELISA検定およびウエスタンブロット分析を用いて、インスリン受容体であるIRS-1（図12A）およびAkt（図12B）の磷酸化を測定した。加うるに、IL-6がインスリン刺激IRS1/p85結合に対して示す効果も検査した（図11AおよびB）。これらの実験を下記の如く実施した。

#### 【0295】

初代ラット肝細胞（~2カ月齢）をコラーゲンで被覆しておいた6穴プレートに入れ、Hepatocyte培地の中で一晩かけて平衡状態にした。次の日、細胞をDMEM-1%BSA-penn strepに入れて6時間絶食状態にした後、hIL-6（5ng/ml）、抗-IL-6抗体（AME-19a）（20ng/ml）または抗-IL-6抗体（AME-19a）+hIL-6と一緒にして37 $^{\circ}$ Cで90分間インキュベートした。その組み合わせを添加するに先立って予め細胞を抗-IL-6抗体（AME-19a）で1時間処置しておいた。また、その組み合わせを細胞に添加する前にも予備インキュベーションを実施した。5nMのインスリン（Biosourceの）を細胞に加えて

5分間置いた後、細胞を吸引で取り出し、そして直ちにBioSource抽出用緩衝液 + 蛋白分解酵素阻害剤を用いて溶解させた。溶解物を遠心分離にかけた後、その上澄み液を1:10に希釈しそしてELISA (BioSourceの) で試験した。

【0296】

IRS1 / p85 関連:

等しい量の蛋白質 (45  $\mu$ g) を2  $\mu$ gの抗-IRS-1ポリクローナル抗体 (Upstateの品目#06-248) と一緒に一晩インキュベートした。次に、そのサンプルに蛋白質Aビードを用いた免疫沈澱を1時間受けさせた後、SDS-PAGE用3xサンプル緩衝液で溶離させた。次に、そのIPサンプルを4-12%のSDS-Pageゲルの上に置いて流した後、ウエスタンブロット分析用の膜に移した。その膜を(1) IRS-1関連p85、即ち活性PI3Kに関しては希釈率が1:100のp85 mAb (Upstateの品目#05-217) (図11Aに示す如く) および(2) 充填対照としての全IRS-1に関しては希釈率が1:600のIRS-1 mAb (BD Biosciencesの品目#611395) を用いて検査した(図11Bに示す如く)。

10

【0297】

このデータは、IL-6で処置するとIR、IRS-1およびAktのインスリン誘発リン酸化の度が低下することを示している。細胞を抗-IL-6抗体(クローンAME-19a)で前以て処置しておくとそのようなIL-6の効果が無効になった。加うるに、IL-6はインスリンに誘発されるp85 (PI3Kのサブユニット) とIRS-1の関連を抑制した。再び、抗-IL-6抗体で前以て処置しておくとそのようなIL-6の効果が抑制された。

20

【0298】

インビボ実験

IL-6がインスリン感受性に対して示す効果を動物で広範に試験することは成されていない。抗-IL-6治療によってインスリン感受性およびT2DMが改善するか否かを評価する目的で、脂肪量が多い餌を与えておいたdb/dbマウスおよびC57/B16のオスを市販の抗-マウスIL-6抗体(R&D Systemsから得た)で処置した。

【0299】

db/dbマウス

抗IL-6処置の効果をいろいろな年齢のdb/dbマウスを用いて試験した。年齢が8-10週の範囲のマウスは高インスリン血およびインスリン耐性で特徴づけられ、従って、病気の早期段階に相当する一方、年齢が12-14週のマウスは高インスリン血に加えて血糖値が高いことで特徴づけられ、従って、T2DMの段階が進行したことに相当していた。両方の年齢グループのマウスを腹腔内耐糖能試験(ipGTT)で用いることで、抗-IL-6治療によってインスリン感受性および血糖コントロールが改善される可能性を試験した。

30

【0300】

db/dbマウスは、レプチン受容体内に変異を有することでレプチンシグナル伝達の機能を持たない。そのようなマウスはマウスの年齢に伴って肥満、高インスリン血およびインスリン耐性を発症し、そのマウスが6-8週齢になった時点で最初の症状が検出される。8および12週齢の年齢がいろいろなマウスの2グループに抗IL-6 mAbを5mg/kgを用いた処置を受けさせた後、処置してから1日目および7日目に腹腔内耐糖能試験(ipGTT)を実施した。処置計画を図15に示す。

40

【0301】

8週齢の動物では、GTT中に抗IL-6 mAbで処置しても糖クリアランスに対して効果がなかった。抗IL-6 mAbで処置すると12週齢の動物では耐糖能(GT)の改善をもたらされたが、その効果は統計学的には有意でなかった( $p = 0.063$ )。そのようなGTTの改善は処置してから7日目に見られた。加うるに、試験を完了する前および完了した後の血清サンプルにアジポカインおよびアジポネクチンプロファイルに関

50

する分析を受けさせた。IL-6、TNF およびMCP-1の濃度は検出濃度未満であった。このデータをipGTTで得た結果と一緒にすることで下記が示唆され得る：db/db動物は抗IL-6がインスリン耐性に対して示す効果を試験する時の良好なモデルではないこと、そして組織中のIL-6濃度の方がIL-6がインスリン耐性およびT2DMの発症で果たす可能性のある役割により関係があること。

#### 【0302】

##### 食餌誘発肥満(DIO) - 肥満およびインスリン耐性の動物モデル

C57/B1オスマウスに脂肪含有量が60%の食餌を20-35週間与えた。それらは肥満を発症し(平均体重は50.5グラムであった)そして空腹時血糖値が高くなった(FBG>145mg/dl)。加うるに、それらはGTが悪化した。DIO動物にマウス抗-IL-6 Ab(R&D Systems)を10mg/kg用いた処置を受けさせた。全体として、それらに50mg/kgの抗IL-6 mAbを3週間に渡って与えた。最初の2回の投与後(5日目)、4回目の投与後(12日および16日目)および5回目の投与後(23日目)にipGTTを実施した。それと同時に、血液を採取してアジポサイトカインおよびアジポネクチンの測定を実施した。

#### 【0303】

抗IL-6で処置しても5日目および12日目の耐糖能は向上しなかったが、しかしながら、16日および23日目に実施すると、糖クリアランスが改善されるばかりでなく糖エクスカージョンの度合いが改善されることを観察した。このような改善はGTT中の39、60および90分の時に統計学的有意さに到達した。

#### 【0304】

別の組の実験として、DIO動物に10および20mg/kgの抗IL-6 Abおよび20mg/kgのIgGアイソタイプ対照を用いた処置をi.p経路で毎週受けさせた(1番目の週の間には2回投与しそして次の4週の間には毎週1回投与)。HOMA-IR(2、4および6週間の処置後)、ipGTT、ipITTおよびアジポカインプロファイル(6週間処置時)を実施した。

#### 【0305】

##### 抗-IL-6 Abで処置したDIO動物に関するHOMA-IR分析

この検定では、DIO動物を10および20mg/kgのマウス抗-IL-6 Abおよびアイソタイプ対照で処置すると空腹時血糖値およびインスリン濃度が低くなった。動物の採血を実施した後、Trace/DMAグルコース(ox)(thermo Electron Corp)およびUltra Sensitive Rat Insulin Elisa(Crystal Chem)を用いてそれぞれ空腹時血糖値およびインスリン濃度を測定した。それらの値を用いてHOMA-IRを決定した。HOMA-IR指数は、インスリン感受性の状態を示し、これはクランプ検定(clamp study)で確認したと良好に相互に関係している。HOMA-IRの計算を式：(空腹時血糖値(mM) x 空腹時インスリン(mIU/Lit) / 22.5)を用いて実施した(図13A、BおよびC)。

#### 【0306】

処置して2、4および6週間後にHOMA-IRの改善を観察した(図13A-Cに6週間処置後のデータを示す)。検定終了時にipGTTおよびipITTを実施した。両方の試験とも、抗-IL-6処置(20mg/ml)を実施するとアイソタイプで処置した動物に比べて糖エクスカージョンおよびクリアランスの両方が有意に改善された。

#### 【0307】

対照および抗-IL-6処置動物から採取した血清サンプルのアジポカインおよびサイトカインを分析した結果、IL-6中和によって循環しているIL-6およびTNFa濃度が減少することに加えてMCP-1およびレスチン濃度が減少する傾向があることが分かった。別の組のデータとして、抗-IL-6の処置に伴ってアジポネクチン濃度が高くなった。

#### 【0308】

処置グループおよび対照グループから得た肝臓サンプルの組織学的分析を実施した。これらのサンプルにOil Red O染色による染色を受けさせることで肝実質の中の脂質含有量を測定した。マウス抗-IL-6抗体による処置に反応してDIO動物の肝臓脂質含有量が低下した。

#### 【0309】

染色により、媒体で処置した肝臓サンプルの中の34%は未処置動物に関連した脂質でありかつ20mg/kgの抗-IL-6で処置した動物では8%のみであることが分かる(図14A-F)。図14AおよびDに対照グループを示し、図14BおよびEに未処置DIO動物を示し、そして図14CおよびFに抗-IL-6処置動物を示す。肝臓の脂質含有量が増加したことはインスリン耐性および2型糖尿病の発症と関連していた。従って、IL-6の中和によって肝臓脂質の代謝が影響を受けることでインスリン感受性およびT2DMが改善すると思われる。これらのデータが一緒になってIL-6は2型糖尿病の病因で役割を果たしていることとIL-6の中和によってインスリン感受性が改善する可能性があることを強力に示唆している。

10

#### 【0310】

##### 追加的研究

IL-6がヒト改変抗-IL-6抗体の存在有り無しでインスリン刺激IRS1磷酸化、p85/P13Kとの関連、インスリン受容体(IR)磷酸化、グリコーゲン合成およびHepG2細胞におけるSOCS3およびSTATシグナル伝達の改善に対して示す影響を監視する。追加的実験でIL-6が膵島による糖誘発インスリン分泌に対して示す影響を検査した。今日までに公開されたデータには、IL-6がラット膵島によるインスリン分泌に対して阻害ばかりでなく刺激効果の両方を示すことが記述されている。新しく単離したラット膵島(Lieffscannの)にIL-6およびヒト改変抗-IL-6抗体(AME-19a)による処置を糖の存在有り無しで受けさせる。膵島から分泌されるインスリンの濃度をいろいろな処置下で測定する。

20

#### 【0311】

##### C2C12

インスリンが骨格筋に対して示す影響を試験する目的でC2C12細胞を用いる。IRS1およびGlut4発現、インスリン誘発IRS1磷酸化およびIL-6がアジポネクチン作用に対して示す影響を検査する実験を実施する。

30

#### 【0312】

##### 利点:

本発明のIL-6抗体を用いてIL-6の活性を抑制することは有意な治療的進展に相当し得る、と言うのは、それによってインスリン感受性および代謝制御を現存薬剤の副作用無しに改善することができるからである。加うるに、現在の治療を用いてT2DMに関連して糖尿病合併症の基礎となる原因であると考えられている全身性炎症を制御するのはほとんど不可能である。本発明のIL-6抗体の如き治療薬は、インスリン感受性を向上させることに加えて、全身性炎症を抑制しかつ糖尿病合併症の発症を防止すると期待する。

#### 【0313】

T2DMにかかっている患者の数が増えており、2025年までに300百万人になると推定されている。抗IL-6抗体は単治療薬としてか或は既に現存する他のOAD、例えばスルホニル尿素、ピグアニド(例えばMetformin)、チアゾリジンジオン、メグリチニド(例えばレパグリニド)、アルファ-グルコシダーゼ阻害剤(例えばアカルボース)などと組み合わせて使用可能である。加うるに、それをインスリンもしくは他の治療薬、例えばインスリン感受性および血糖コントロールを向上させかつインスリン処置に関連した低血糖イベントを回避する治療薬などと組み合わせて用いることも可能である。また、抗-IL-6治療薬はインスリン感受性およびT2Dおよびメタボリック症候群患者における血糖値調節を改善することに加えてそのような患者にしばしば観察されるCV変化に対して有益な効果を与えるであろうとも期待する。Saltiel, AR, お

40

50

よび Kahn, CR. 2001. Nature 414: 799 - 806; Hansen, BC., 1995. Diabetes Care 18: A2 - A9; Diabetes Prevention Program 研究グループ. 2002. New Engl J Med., 346: 393 - 403; Hansen, BC., 2000, Ann New York Academy of Science, 892: 1 - 24; Hsueh, WA., and Quinones, MJ., 2003, Am. J. Cardiology, 93: 10J - 17J; Resnick, HE および Howard, BV., 2002, Ann. Rev. Med., 53: 245 - 267; Korner, J. and Aronne, L., 2003, J Clin. Invest., 111(5): 565 - 570; Skoog, T., 他、2001. Diabetologia, 44: 654: 655; Fernandez - Real, JM., および Ricart W., 2003, Endocrine Reviews, 24(3): 278 - 301; Fernandez - Real, JM., 他、2001, J Clin Endocrinol Metab., 86: 1154 - 1159; 10a. Fried, S., 他、1998. J Clin Endocrinol Metab., 83: 847 - 850; Senn, JJ., 他、2002, Diabetes, 51: 3391 - 3399; Rotter, V., 他、2003, JBC in press, Manus. #301977200; 12a. Stouthard, JM., 他、1996, BBRC, 220: 241 - 245; Southern, C., 他、1990, Biochem J., 272: 243 - 245; Sandler, S., 他、1990, Endocrinology, 126: 1288 - 1294; Pedersen, BK, 他、2001, J Physiol., 536: 329 - 337; DiCosmo, BF, 他、1994, Int. Immunol., 6: 1829 - 1837; Wallenius, V., 他、2002, Nature Medicine, 8: 75 - 79; Vozarova, B., 他、2003, Human Genetic, 112: 409 - 413; Kubaszek, A., 他、2003, Diabetes, 52: 558 - 461; Tsigos, C., 他、1997, J Clin Endocrinol Metab, 82: 4167 - 4170; Stoutharad, JM., 他、1995, Am J Physiol., 268: E813 - E819; Kern, PA., 他、2001, Am J Physiol Endocrinol Metab., 280: E745 - E751; Bastard, JP., 他、2000, J Clin Endocrinol Metab., 85: 3338 - 3342; および Bastard, JP., 他、2002, J. Clin. Endocrinol. Metab., 87: 2084 - 2089 を参照のこと。

【0314】

本発明をこの上で行った説明および実施例に詳細に記述した様式とは別の様式で実施することも可能であることは明らかであろう。この上で行った教示に照らすことで本発明のいろいろな修飾形および変形が可能になり、従って、それらも添付請求の範囲内である。

【0315】

【表 1】

表1－軽鎖CDR

配列識別番号	CDR名*	クローン	配列
配列識別番号:1	CDRL1	33	SASHSVSYMY
配列識別番号:2	CDRL1	33	AGTGCCAGCCATAGTGTAAGTTACATGTAC
配列識別番号:3	CDRL1	34	SASISVSYMY
配列識別番号:4	CDRL1	34	AGTGCCAGCATTAGTGTAAGTTACATGTAC
配列識別番号:5	CDRL1	35	SARSSVSYMY
配列識別番号:6	CDRL1	35	AGTGCCCGGTCAAGTGTAAGTTACATGTAC
配列識別番号:7	CDRL1	36	SASYSVSYMY
配列識別番号:8	CDRL1	36	AGTGCCAGCTATAGTGTAAGTTACATGTAC
配列識別番号:9	CDRL1	37	SASSSVFYMY
配列識別番号:10	CDRL1	37	AGTGCCAGCTCAAGTGTAATTTTACATGTAC
配列識別番号:11	CDRL1	39	SGSSVSYMY
配列識別番号:12	CDRL1	39	AGTGGCAGCTCATATGTAAGTTACATGTAC
配列識別番号:13	CDRL1	40	SALSSVSYMY
配列識別番号:14	CDRL1	40	AGTGCCCTGTCAAGTGTAAGTTACATGTAC
配列識別番号:15	CDRL1	A9	SASSSVSYMY
配列識別番号:16	CDRL1	A9	AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTAC
配列識別番号:17	CDRL2	41	DFSNLAS
配列識別番号:18	CDRL2	41	GACTTTTCCAACCTGGCTTCT

10

20

30

40

【 0 3 1 6 】

【表 2】

配列識別番号	CDR名*	クローン	配列	
配列識別番号:19	CDRL2	43	DLSNLAS	
配列識別番号:20	CDRL2	43	GACCTGTCCAACCTGGCTTCT	
配列識別番号:21	CDRL2	44	DMSNLAS	10
配列識別番号:22	CDRL2	44	GACATGTCCAACCTGGCTTCT	
配列識別番号:23	CDRL2	46	DTSNLTS	
配列識別番号:24	CDRL2	46	GACACATCCAACCTGACGTCT	
配列識別番号:25	CDRL2	48	DTSELAS	
配列識別番号:26	CDRL2	48	GACACATCCGAGCTGGCTTCT	20
配列識別番号:27	CDRL2	A9	DTSNLAS	
配列識別番号:28	CDRL2	A9	GACACATCCAACCTGGCTTCT	
配列識別番号:29	CDRL3	49	MQWSGYPYT	
配列識別番号:30	CDRL3	49	ATGCAGTGGAGTGGTTACCCATACACG	30
配列識別番号:31	CDRL3	50	CQWSGYPYT	
配列識別番号:32	CDRL3	50	TGTCAGTGGAGTGGTTACCCATACACG	
配列識別番号:33	CDRL3	52	SCWSGYPYT	
配列識別番号:34	CDRL3	52	TCTGTGTGGAGTGGTTACCCATACACG	
配列識別番号:35	CDRL3	A9	SQWSGYPYT	40
配列識別番号:36	CDRL3	A9	TCTCAGTGGAGTGGTTACCCATACACG	

【 0 3 1 7 】



【表 3】

配列識別番号	CDR名*	クローン	配列
配列識別番号:138	CDRL3	Alt.	QQWSGYPYT

\*CDRはKabatが定義した通りであるが、但しKabatとChochia定義の合計であるCDRH1は除く

10

【 0 3 1 8 】

【表4】

表2-重鎖CDR

配列識別番号	CDR名*	クローン	配列
配列識別番号:37	CDRH1	4	GFTFSSFALS
配列識別番号:38	CDRH1	4	GGATTCACCTTTAGTAGCTTTGCCCTTTCT
配列識別番号:39	CDRH1	5	GFTFSPFAMS
配列識別番号:40	CDRH1	5	GGATTCACCTTTAGTCCTTTTGCCATGTCT
配列識別番号:41	CDRH1	6	GFQFSSFAMS
配列識別番号:42	CDRH1	6	GGATTCCAGTTTAGTAGCTTTGCCATGTCT
配列識別番号:43	CDRH1	8	GFTTSSFAMS
配列識別番号:44	CDRH1	8	GGATTCACCACTAGTAGCTTTGCCATGTCT
配列識別番号:45	CDRH1	Q + P	GFQFSPFAMS
配列識別番号:46	CDRH1	Q + P	GGATTCCAGTTTAGTCCTTTTGCCATGTCT
配列識別番号:47	CDRH1	A9	GFTFSSFAMS
配列識別番号:48	CDRH1	A9	GGATTCACCTTTAGTAGCTTTGCCATGTCT
配列識別番号:49	CDRH2	10	KASSGGSYTYPDVTG
配列識別番号:50	CDRH2	10	AAAGCGAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGA CACTGTGACGGGC
配列識別番号:51	CDRH2	11	KISSGGSYEYPDVTG
配列識別番号:52	CDRH2	11	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACGAGTACTATCCTGAC ACTGTGACGGGC

10

20

30

40

【 0 3 1 9 】

【表5】

配列識別番号	CDR名*	クローン	配列
配列識別番号:53	CDRH2	12	KISSGGSYYYPDTVGTG
配列識別番号:54	CDRH2	12	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACTATTACTATCCTGAC ACTGTGACGGGC
配列識別番号:55	CDRH2	14	KISSGGSWTYYPDTVGTG
配列識別番号:56	CDRH2	14	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTGGACCTACTATCCTGA CACTGTGACGGGC
配列識別番号:57	CDRH2	16	KISPGGSYTYYPDTVGTG
配列識別番号:58	CDRH2	16	AAAATTAGTCCGGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGA CACTGTGACGGGC
配列識別番号:59	CDRH2	P + W + S (18a, 19a)	KISPGGSWTYYSDTVGTG
配列識別番号:60	CDRH2	P + W + S (18a, 19a)	AAAATTAGTCCGGGTGGGAGTTGGACCTACTATTCTGA CACTGTGACGGGC
配列識別番号:61	CDRH2	A9	KISSGGSYTYYPDTVGTG
配列識別番号:62	CDRH2	A9	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGAC ACTGTGACGGGC
配列識別番号:113	CDRH2	Alt.	EISSGGSYTYYPDTVGTG
配列識別番号:63	CDRH2	17	KISSGGSYTYFPDTVGTG
配列識別番号:64	CDRH2	17	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTTTCTGAC ACTGTGACGGGC
配列識別番号:65	CDRH2	19	KISSGGSYTYYPDTVAG
配列識別番号:66	CDRH2	19	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGAC ACTGTGGCTGGC

10

20

30

40

【表6】

配列識別番号	CDR名*	クローン	配列
配列識別番号:67	CDRH2	20	KISSGGSYTYDDTVTG
配列識別番号:68	CDRH2	20	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATGATGAC ACTGTGACGGGC
配列識別番号:69	CDRH2	21	KISSGGSYTYSDTVTG
配列識別番号:70	CDRH2	21	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATTCTGAC ACTGTGACGGGC
配列識別番号:71	CDRH2	22	KISSGGSYTYYPDTVTP
配列識別番号:72	CDRH2	22	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGAC ACTGTGACGCCG
配列識別番号:73	CDRH2	23	KISSGGSYTYYPDTDTG
配列識別番号:74	CDRH2	23	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGAC ACTGATACGGGC
配列識別番号:75	CDRH2	P + S (20b, 23a)	KISPGGSYTYSDTVTG
配列識別番号:76	CDRH2	P + S (20b, 23a)	AAAATTAGTCCGGGTGGGAGTTACACCTACTATTCTGAC ACTGTGACGGGC
配列識別番号:77	CDRH2	P + W + D (22a)	KISPGGSWTYDDTVTG
配列識別番号:78	CDRH2	P + W + D (22a)	AAAATTAGTCCGGGTGGGAGTTGGACCTACTATGATGA CACTGTGACGGGC
配列識別番号:79	CDRH3	25	QLWGSYALDY
配列識別番号:80	CDRH3	25	CAGTTATGGGGTTCGTATGCTCTTGACTAC
配列識別番号:81	CDRH3	26	QLWGYALDT

10

20

30

40

【表 7】

配列識別番号	CDR名*	クローン	配列	
配列識別番号:82	CDRH3	26	CAGTTATGGGGGTACTATGCTCTTGACACG	
配列識別番号:83	CDRH3	29	QLWGTALDY	
配列識別番号:84	CDRH3	29	CAGTTATGGGGGACTTATGCTCTTGACTAC	10
配列識別番号:85	CDRH3	30	QLWGNALDY	
配列識別番号:86	CDRH3	30	CAGTTATGGGGGAATTATGCTCTTGACTAC	
配列識別番号:87	CDRH3	31	QLWGYYALDF	
配列識別番号:88	CDRH3	31	CAGTTATGGGGGTACTATGCTCTTGACTTT	20
配列識別番号:89	CDRH3	32	QLWGYYALDI	
配列識別番号:90	CDRH3	32	CAGTTATGGGGGTACTATGCTCTTGACATT	
配列識別番号:91	CDRH3	A9	QLWGYYALDY	
配列識別番号:92	CDRH3	A9	CAGTTATGGGGGTACTATGCTCTTGACTAC	
配列識別番号:114	CDRH3	Alt.	GLWGYYALDY	30

\*CDRはKabatが定義した通りであるが、但しKabatとChochia定義の合計であるCDRH1は除く

【 0 3 2 2 】

【表 8】

表3—個々のCDRライブラリーから得た変異体

クローン	CDRH1		クローン	CDRL1
4	M34L		33	S27H
5	S31P		34	S27I
6	T28Q		35	S26R
8	F29T		36	S27Y
			37	S30F
クローン	CDRH2		クローン	CDRL2
10	I51A		39	A25G,S28Y
11	T57E		40	S26L
12	T57Y			
14	Y56W		クローン	CDRL2
16	S52aP		41	T51F
17	Y59F		43	T51L
19	T64A		44	T51M
20	P60D		46	A55T
21	P60S		47	T51L
22	G65P		48	N53E
23	V63D			
			クローン	CDRL3

10

20

30

40

【 0 3 2 3 】

【表 9】

クローン	CDRH3		49	Q89M
25	Y99S		50	Q89C
26	Y102T		52	Q90C
27	Y99S			
29	Y99T			
30	Y99N			
31	Y102F			
32	Y102I			

10

20

【 0 3 2 4 】

【表 1 0】

表4ー組み合わせライブラリーに入っている変異体

CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
T28Q	S52aP	Y102F	S27I	T51F	Q89M
S31P	Y56W	Y102I	S27Y	T51M	
	P60S				
	V63D				

30

【 0 3 2 5 】

【表 1 1】

表5A  
正ライブラリークローン

CDR→	軽			重								
	L1	L2	L3	H1		H2		H3				
WT→ CNT0328	S	T	Q	T	S	E	S	Y	P	V	G	Y
クローン	27	51	89	28	31	50	52a	56	60	63	95	102
AME-A9			S			K					Q	
AME-16			S			K	P				Q	
AME-18a	F		M	Q	P	K	P	W	S		Q	I
AME-19a	I	M	M		P	K	P	W	S		Q	I
AME-20b	I	M	M	Q		K	P		S		Q	I
AME-22a	Y	F	M	Q	P	K	P	W	D		Q	F
AME-23a	Y	M	M	Q		K	P		S		Q	F

10

20

【 0 3 2 6 】

【表 1 2】

表5B-ヒト改変抗-IL-6抗体クローンおよび相当するCDRs

CDR→	L1	L2	L3	H1	H2	H3
AME-A9	配列識別:15	配列識別:27	配列識別:35	配列識別:47	配列識別:61	配列識別:91
AME-16	配列識別:15	配列識別:27	配列識別:35	配列識別:47	配列識別:57	配列識別:91
AME-18a	配列識別:15	配列識別:17	配列識別:29	配列識別:45	配列識別:59	配列識別:89
AME-19a	配列識別:3	配列識別:21	配列識別:29	配列識別:39	配列識別:59	配列識別:89
AME-20b	配列識別:3	配列識別:21	配列識別:29	配列識別:41	配列識別:75	配列識別:89
AME-22a	配列識別:7	配列識別:17	配列識別:29	配列識別:45	配列識別:77	配列識別:87
AME-23a	配列識別:7	配列識別:21	配列識別:29	配列識別:41	配列識別:75	配列識別:87

30

40

【 0 3 2 7 】

50



【表 1 3】

表6-EC<sub>50</sub> 値

クローン	EC50 値
CNTO328	$2.7 \times 10^{-11}$ M
AME-19a	$2.7 \times 10^{-12}$ M (10倍の改善)

10

【 0 3 2 8 】

【表 1 4】

表7-抗-IL-6IgGが示した速度定数

クローン	抗体濃度(pM)	K <sub>D</sub> (pM)	改善比(キメラ abと比較した)	k <sub>on</sub> (M <sup>-1</sup> 秒 <sup>-1</sup> )	改善比	k <sub>off</sub> (秒 <sup>-1</sup> ) (計算値)	改善比
キメラ抗体	5	3	1	$4.4 \times 10^6$	1	$1.3 \times 10^{-5}$	1
AME-16	1	0.83	3.6	$1 \times 10^6$	0.22	$8.3 \times 10^{-7}$	15.7
AME-18a	0.5	0.12	25	$2 \times 10^7$	4.4	$2.4 \times 10^{-6}$	5.4
AME-19a	0.5	0.037	81.1	$5.5 \times 10^6$	1.2	$2 \times 10^{-7}$	65
AME-20b	1	0.78	3.8	$4.7 \times 10^6$	1	$3.7 \times 10^{-6}$	3.5
AME-22a	1	0.18	16.7	$6 \times 10^6$	1.3	$1.1 \times 10^{-6}$	11.8
AME-23a	1	0.006	500	$7.4 \times 10^6$	1.6	$4.4 \times 10^{-8}$	295

20

30

【 0 3 2 9 】

【表 15】

表8ーヒト改変およびキメラ抗体の異種間反応性

	種	阻害(キメラおよびヒト改変)
異種間反応性	ヒト	+
	マーモセット	+
	カニクイザル	+
	チンパンジー	+
	アカゲザル	+
	バブーン	+
	ブタオザル	+
	コットントップ	+
未知	ウサギ	N/D
非反応性	イヌ	-
	マウス	-
	ラット	-
	モルモット	-
	ユカタンミニピッグ	-

ヒト改変およびキメラ抗体の異種間反応性。ヒト改変およびキメラ抗体は、ヒト、マーモセット、カニクイザル、チンパンジー、アカゲザル、バブーン、ブタオザルおよびコットントップモンキーのPBMCから得た条件付け上澄み液を用いた刺激を受けさせた7TD1細胞の増殖を中和し得る。「+」は中和検定が陽性であり、「-」は中和検定が陰性であり、N/Dは測定せずである。

【 0 3 3 0 】

## 【表 16】

## 表9ー抗ーILー6 mAbによる処置がNZB/W F1マウスにおける腎病に対して示す影響

\* ひどいー血管周囲混合型リンパ過形成、メサンギウム過形成、蛋白沈着、糸球体基底膜免疫複合体沈着

中程度ー中程度の血管周囲混合型リンパ過形成、中程度のメサンギウム過形成、糸球体基底膜免疫複合体沈着、蛋白沈着無し

穏やかー穏やかなメサンギウム過形成、穏やかな糸球体基底膜免疫複合体沈着、血管周囲混合型リンパ過形成無し、蛋白沈着無し

10

処置グループ	ひどい*	中程度*	穏やか*
食塩水 (n=10)	60% または 6/10	20% または 2/10	20% または 2/10
ラット IgG (n=10)	70% または 7/10	30% または 3/10	0 または 0/10
R&D抗ーマウス IL-6 (n=10)	10% または 1/10	30% または 3/10	60% または 6/10

20

## 【 0 3 3 1 】

【表 17】

表10—クローンの可変領域配列

配列識別 番号	クローン	重(H)ま たは軽 (L)鎖V 領域	配列
93	A9	L鎖AA	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVS YMYWYQQKPGQAPRLLIYDTSNLAGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCSQW SGYPYTFGGGTKVEIK
94		L鎖ヌクレ オチド	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGAAGTTACATGTACT GGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGACACA TCCAACCTGGCTTCTGGCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGG GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAG TTTATTACTGTTCTCAGTGGAGTGGTTACCCATACACGTTCCGGCGGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA
95		H鎖AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SFAMSWWRQAPGKGLEWVAKISSGGSYTY PDTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARQLWGYYALDYWGQGTITVTVSS
96		H鎖ヌクレ オチド	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCTTTGCCA TGTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAA ATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGACACTGTGACGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACAGTTA TGGGGTACTATGCTCTTGACTACTGGGGCCAAGGACCACGGTCACCGT CTCCTCA

10

20

30

40

【 0 3 3 2 】

【表 18】

97	19A	L鎖AA	EVLTTQSPATLSLSPGERATLSCSASISVS YMYWYQQKPGQAPRLLIYDMSNLASGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCMQW SGYPYTFGGGKVEIK	
98		L鎖ヌクレ オチド	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA AAGAGCCACCCTCTCTGCAGTGCCAGCATTAGTGAAGTTACATGTA GGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGACATG TCCAACCTGGCTTCTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGCTGG GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTGACAG TTTATTACTGTATGCAGTGGAGTGGTTACCCATACACGTTCCGGCGGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA	10
99		H鎖AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS PFAMSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYY SDTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARQLWGYYALDIWGQGTITVTVSS	20
100		H鎖ヌクレ オチド	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTCCTTTTGCCA TGTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGTGGCCAAA ATTAGTCCGGTGGGAGTTGGACCTACTATTCTGACACTGTGACGGGCGG ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCCGAGACAGTTA TGGGGTACTATGCTCTTGACATTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGT CTCCTCA	30
101	23A	L鎖AA	EVLTTQSPATLSLSPGERATLSCSASYSVS YMYWYQQKPGQAPRLLIYDMSNLASGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCMQW SGYPYTFGGGKVEIK	40

【表 19】

102		L鎖ヌクレオチド	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGCCAGCTATAGTGAAGTTACATGTA GGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGACATG TCCAACCTGGCTTCTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCTGG GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAG TTTATTACTGTATGCAGTGGAGTGGTTACCCATACACGTTCCGCGGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAA	10
103		H鎖AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFS SFAMSWVRQAPGKLEWVAKISPGGSYTY SDTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARQLWGYALDFWGGTITVSS	
104		H鎖ヌクレオチド	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCAGTTTAGTAGCTTTGCCA TGTCTTGGGTCGCGCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAA ATTAGTCCGGGTGGGAGTTACACCTACTATTCTGACACTGTGACGGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACAGTTA TGGGGTACTATGCTCTTGACTTTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGT CTCCTCA	20
116	AME-16	L鎖AA	EVLTSQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVS YMYWYQQKPGQAPRLLIYDTSNLAGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCSQW SGYPYTFGGGTKVEIK	30
117		L鎖ヌクレオチド	ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGA TACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGAAGT TACATGTAAGTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT CTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAA GATTTTGCAGTTTATTACTGTTCTCAGTGGAGTGGTTACCCATACAGTT CGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA	40



【表 2 1】

123		H鎖ヌクレオチド	ATGGAGTTTGGCCTGAGCTGGGTTTTCTTGTGCTATTTTAGAAGGTGT CCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCAGTTTAGTCCC TTTGCCATGTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGT GGCCAAAATTAGTCCCGTGGGAGTTGGACCTACTATAGCGACACTGTGA CGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAG ACAGTTATGGGGTACTATGCTCTTGACATTTGGGGCCAAGGGACCACGG TCACCGTCTCCTCA	10
124	AME-20b	L鎖AA	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASISVS YMYWYQQKPGQAPRLLIYDMSNLAGIPAR FSGSGSGTDFLTISSEPEDFAVYYCMQW SGYPYTFGGGTKVEIK	20
125		L鎖ヌクレオチド	ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGTCCCAGA TACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGCCAGCATTAGTGAAGT TACATGTAAGTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT CTATGACATGTCCAACCTGGCTTCTGGCATCCCAGCCAGTTTCAAGTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAA GATTTTGCAGTTTATTACTGTATGCAGTGGAGTGGTTACCCATACACGTT CGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA	30
126		H鎖AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFS SFAMSWVRQAPGKLEWVAKISPGGSYTY SDTIVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARQLWGYYALDIWGQGTITVTVSS	

【 0 3 3 6 】



【表 2 2】

127		H鎖ヌクレ オチド	ATGGAGTTTGGCCTGAGCTGGGTTTTCTTGTTGCTATTTTAGAAGGTGT CCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCAGTTTAGTAGC TTTGCCATGTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGT GGCCAAAATTAGTCCCGTGGGAGTTACACCTACTATAGCGACACTGTGA CGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAG ACAGTTATGGGGTACTATGCTCTTGACATTTGGGGCCAAGGGACCACGG TCACCGTCTCCTCA	10
128	AME-22a	L鎖AA	EVLTVQSPATLSLSPGERATLSCSASYSVS YMYWYQKPGQAPRLLIYDFSNLASGIPAR FSGSGSGTDFLTITISLEPEDFAVYYCMQW SGYPYTFGGGTKVEIK	20
129		L鎖ヌクレ オチド	ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCAGA TACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGCCAGCTACAGTGAAGT TACATGTAAGTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT CTATGACTTCTCCAACCTGGCTTCTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAA GATTTTGCAGTTTATTACTGTATGCAGTGGAGTGGTTACCCATACACGTT CGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA	30
130		H鎖AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFS PFAMSWVRQAPGKLEWVAKISPGGSWTYY PDTDTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARQLWGYYALDFWGQGTITVTVSS	

【 0 3 3 7 】



## 【表 2 6】

表13—CDR配列

配列識別番号:	CDR	AA配列*
132	CDRL1	SX <sub>1</sub> X <sub>2</sub> X <sub>3</sub> X <sub>4</sub> VX <sub>5</sub> YMY
133	CDRL2	DX <sub>6</sub> SX <sub>7</sub> LX <sub>8</sub> S
134	CDRL3	X <sub>9</sub> X <sub>10</sub> WSGYPYT
135	CDRH1	GFX <sub>11</sub> X <sub>12</sub> SX <sub>13</sub> FAX <sub>14</sub> S
136	CDRH2	KX <sub>15</sub> SX <sub>16</sub> GGSX <sub>17</sub> X <sub>18</sub> YX <sub>19</sub> X <sub>20</sub> DTX <sub>21</sub> X <sub>22</sub> X <sub>23</sub>
137	CDRH3	QLWGX <sub>24</sub> YALDX <sub>25</sub>

10

\*Xは、表1および2および表3、4、5Aおよび8の配列識別番号: 1-92に開示した配列に示す典型的な非限定アミノ酸置換を伴う適切なアミノ酸のいずれかを示す。加うるに、Xは下記の値も持ち得る:

20

X<sub>1</sub> = A または GX<sub>2</sub> = S または RX<sub>3</sub> = H, I, S, または YX<sub>4</sub> = S または YX<sub>5</sub> = S または FX<sub>6</sub> = F, L, M, または TX<sub>7</sub> = N または EX<sub>8</sub> = A または TX<sub>9</sub> = M, C, または SX<sub>10</sub> = Q または CX<sub>11</sub> = T または QX<sub>12</sub> = F, S, または TX<sub>13</sub> = S または PX<sub>14</sub> = L または MX<sub>15</sub> = A または IX<sub>16</sub> = S または PX<sub>17</sub> = Y または WX<sub>18</sub> = T, E, または Y

30

40

## 【 0 3 4 1 】

## 【表 27】

$X_{19}$  = Y または F  
 $X_{20}$  = P, S, D, または F  
 $X_{21}$  = V または D  
 $X_{22}$  = T または A  
 $X_{23}$  = G または P  
 $X_{24}$  = S, Y, T, または N  
 $X_{25}$  = Y, T, F, または I

10

## 配列識別番号: 115-IL-6蛋白質のアミノ酸配列

MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQIRYILDGI  
 SALRKETCNKSNMCESSKEALAENLNLPKMAEKDGCQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEY  
 LQNRFESEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMT  
 THLILRSFKEFLQSSLRALRQM

## 【図面の簡単な説明】

20

## 【0342】

【図1】図1に、ヒト改変およびキメラ抗-IL-6抗体とIL-6/IL-6R複合体の結合を示す。

【図2】図2に、本発明のヒト改変抗-IL-6抗体の結合エピトープを示す。

【図3】図3に、ELISAで測定した時にヒト改変抗-IL-6抗体がU937細胞によるIL-6刺激MCP-1分泌を抑制することを示す。

【図4】図4に、ELISAで測定した時にヒト改変抗-IL-6抗体がHepG2細胞によるIL-6およびIL-1刺激SAA分泌を抑制することを示す。

【図5A-5B】図5Aおよび5Bに、ゲル電気泳動法で示すウエスタンブロット分析で測定した時にヒト改変抗-IL-6抗体がIL-6媒介stat3磷酸化を阻害することを示す。

30

【図6】図6に、ヒト改変およびキメラ抗-IL-6抗体がBalb/CマウスにおけるヒトIL-6誘発SAA産生を抑制することを示す。

【図7】図7に、抗-IL-6 mAbがNZB/W F1マウスにおける抗-dsDNA自己抗体産生を抑制することを示す。

【図8A】図8Aに、IL-6がヒト改変抗-IL-6抗体の存在有り無しでインスリン誘発Akt磷酸化に対して示した影響を示す。

【図8B】図8Bに、IL-6がヒト改変抗-IL-6抗体の存在有り無しでインスリン誘発Akt磷酸化に対して示した影響のウエスタンブロット分析を示す。

【図9】図9に、実施例3に記述したELISA結合検定の結果を示す。

40

【図10】図10に、実施例3に記述したIL-6依存細胞株を用いた抗増殖検定の結果を示す。

【図11A】図11Aに、インスリン、IL-6蛋白質および抗-IL-6抗体で処置したラット肝細胞におけるPI3キナーゼ活性化を示す。

【図11B】図11Bに、ラット肝細胞におけるPI3キナーゼ活性化に関する制御を示す。

【図12A】図12Aに、IRのインスリン誘発磷酸化に関してラット肝細胞におけるシグナル伝達に対してIL-6が示した影響を示す。

【図12B】図12Bに、Aktのインスリン誘発磷酸化に関してラット肝細胞におけるシグナル伝達に対してIL-6が示した影響を示す。

50

【図13A】図13Aに、抗-IL-6抗体で処置した後のDIOマウスにおける血糖値を示す。

【図13B】図13Bに、抗-IL-6抗体で処置した後のDIOマウスにおけるインスリン濃度を示す。

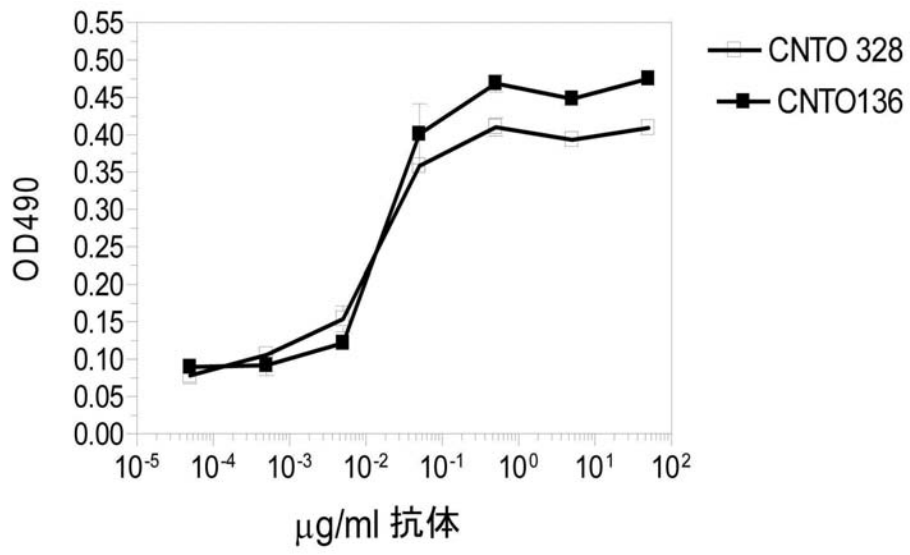
【図13C】図13Cに、抗-IL-6抗体で処置した後のDIOマウスにおける恒常性モデル評価(HOMA)指数を示す。

【図14A-14F】図14A-Fに、抗-IL-6抗体で処置する前および後の脂質値を示す。

【図15】図15に、腹腔内耐糖能試験(ipGTT)で抗IL-6 mAbを用いてマウスを処置する計画を示す。

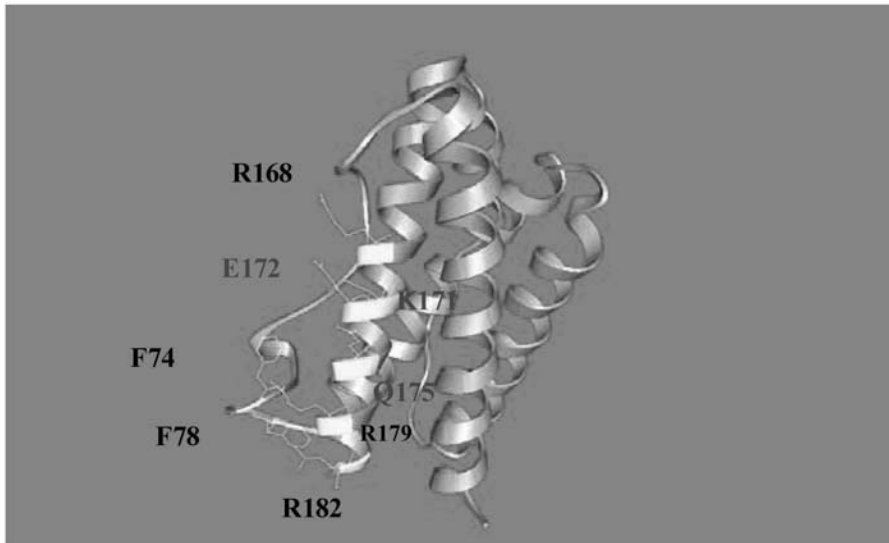
【 図 1 】

図. 1



【 図 2 】

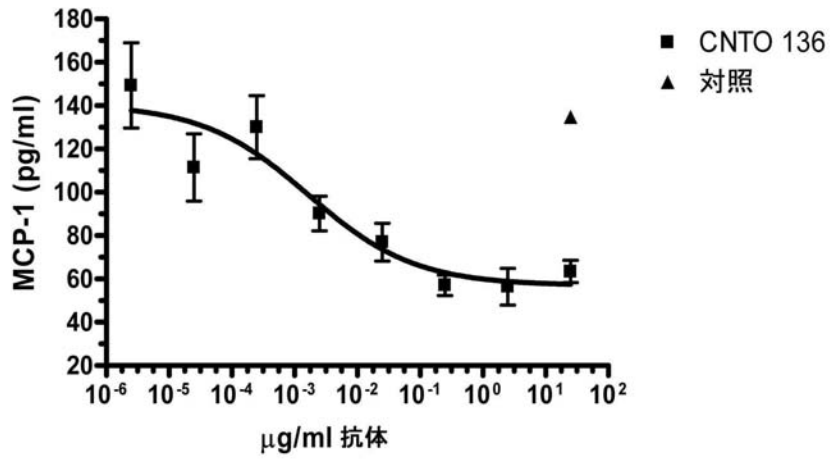
図 2



<sup>168</sup>RSFKEFLQSSLRALRQM<sub>184</sub>

【 图 3 】

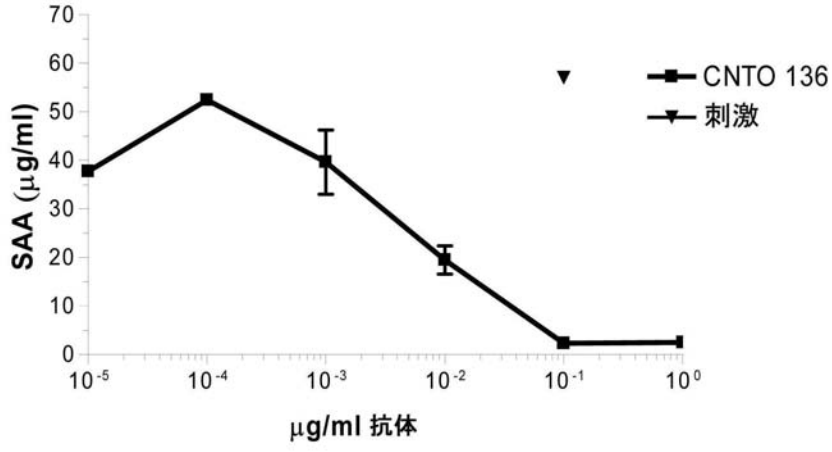
图. 3





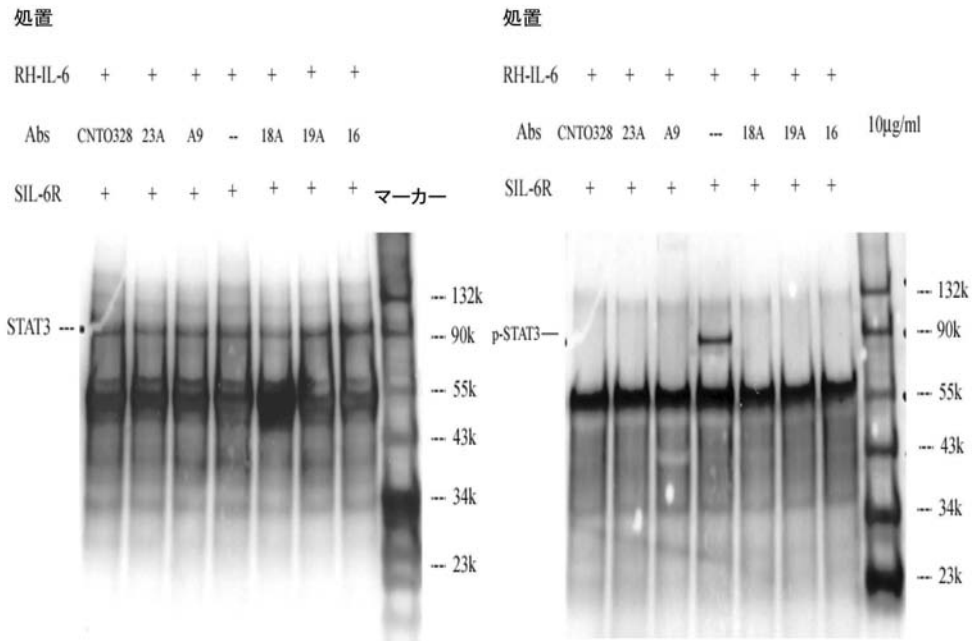
【 图 4 】

图. 4



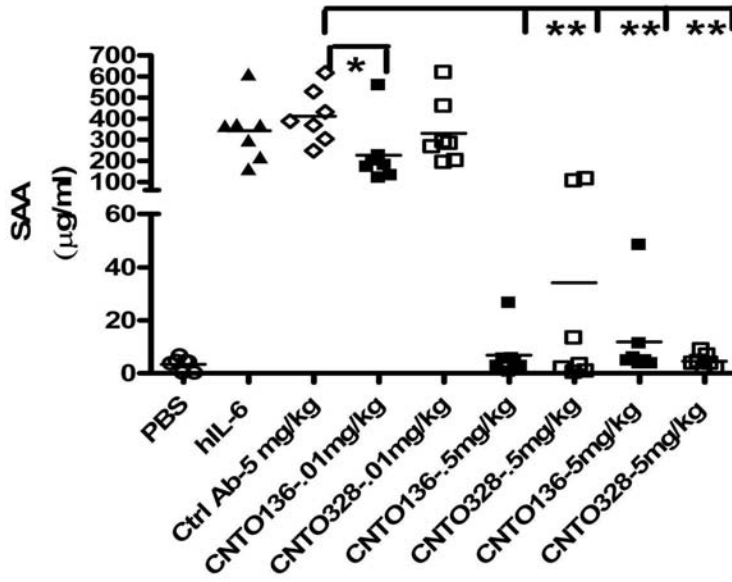
【 図 5 】

図. 5



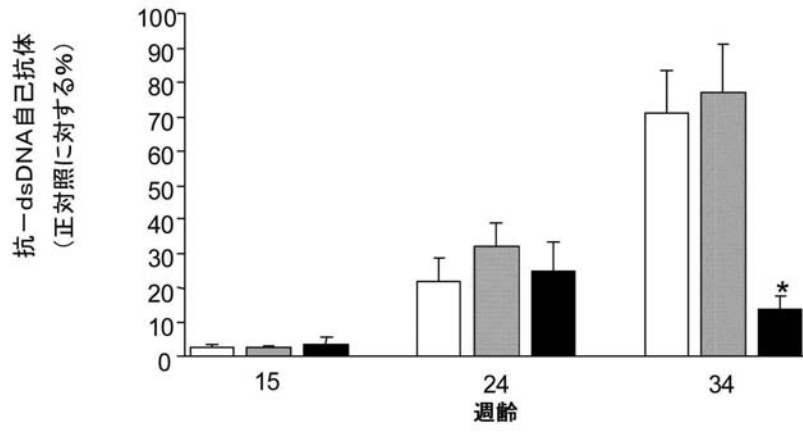
【 図 6 】

図. 6



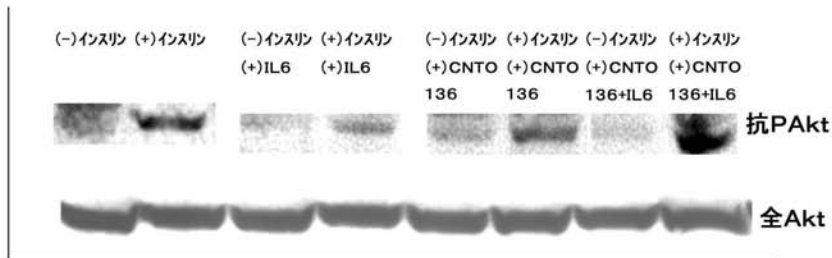
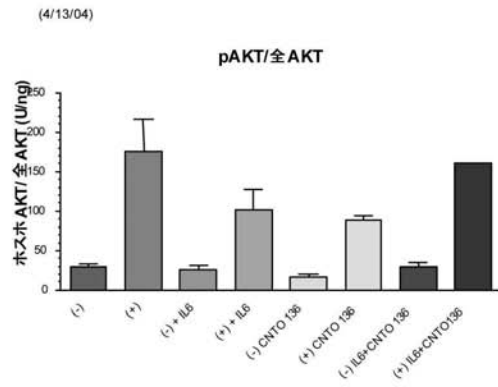
【 図 7 】

図. 7



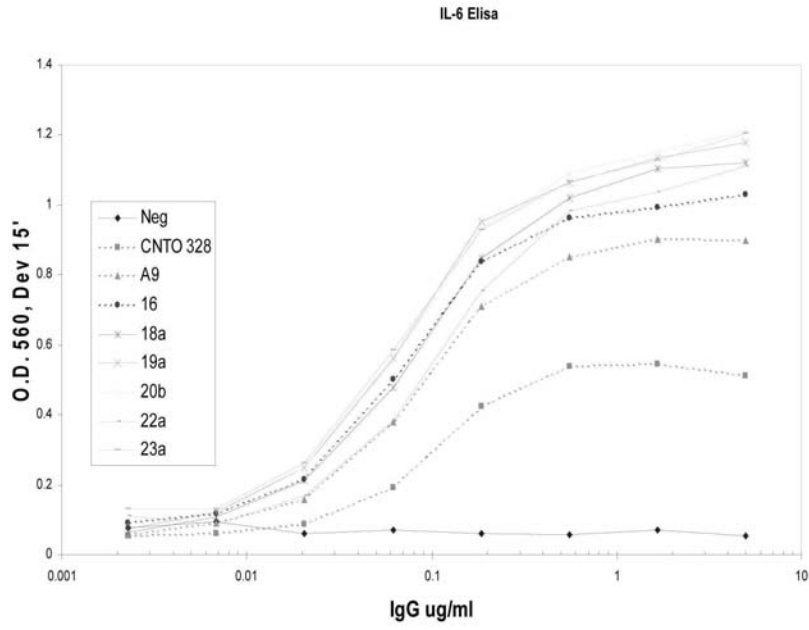
【 図 8 】

図. 8



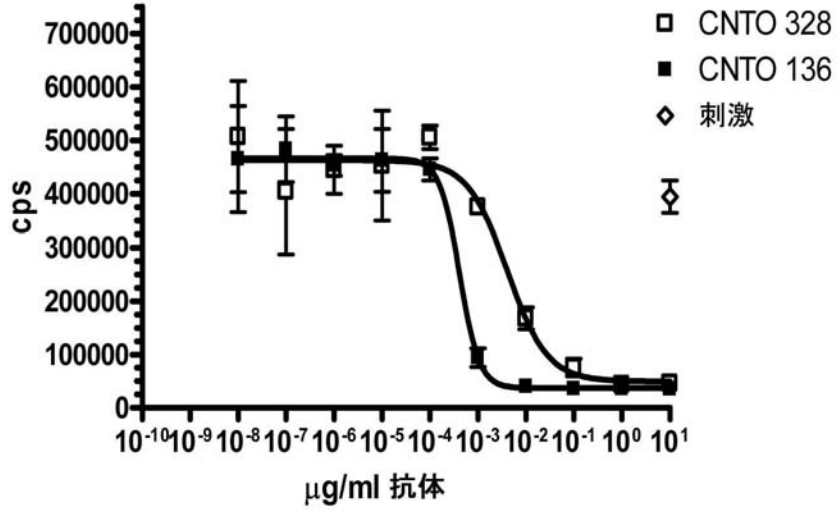
【 図 9 】

図. 9



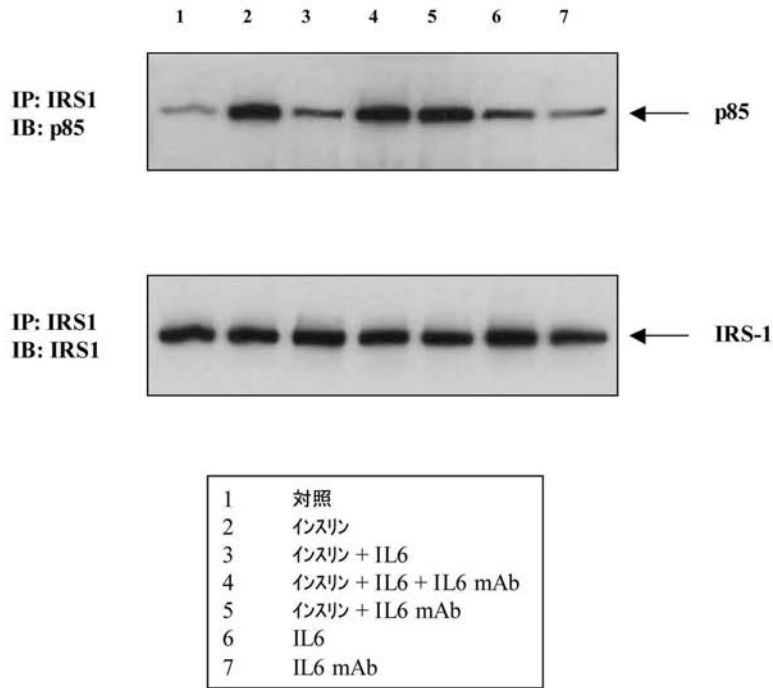
【 图 10 】

图. 10



【 図 1 1 】

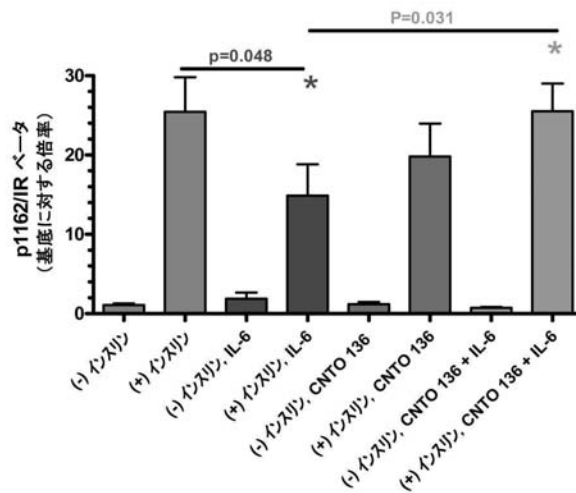
図. 11



【 図 1 2 A 】

IL-6がIR磷酸化に対して示す影響

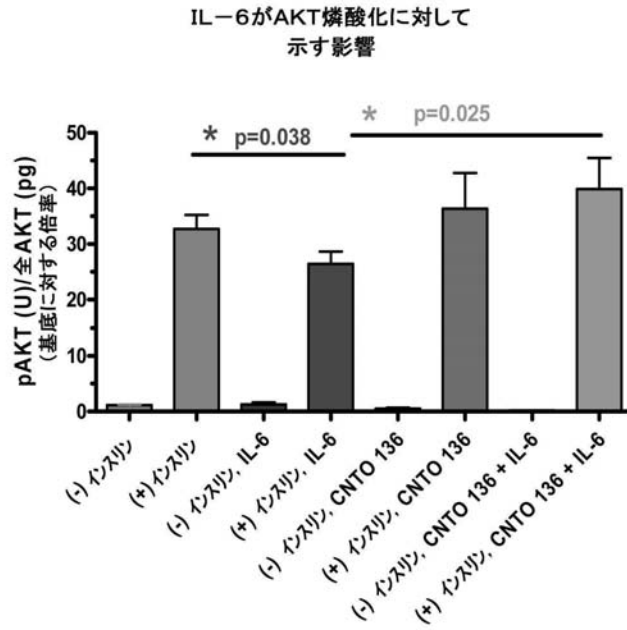
図. 12A



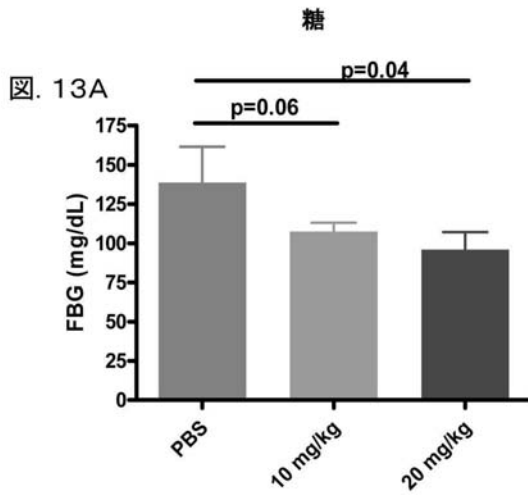


【 図 1 2 B 】

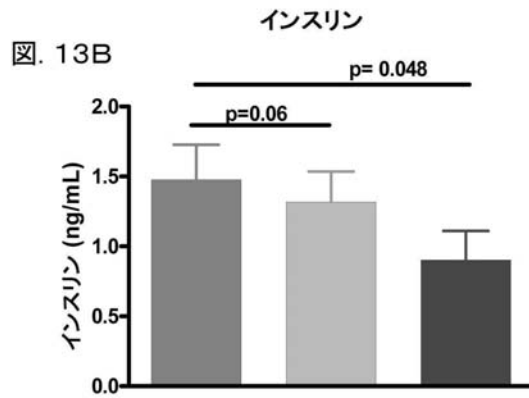
図. 12B



【 図 1 3 A 】

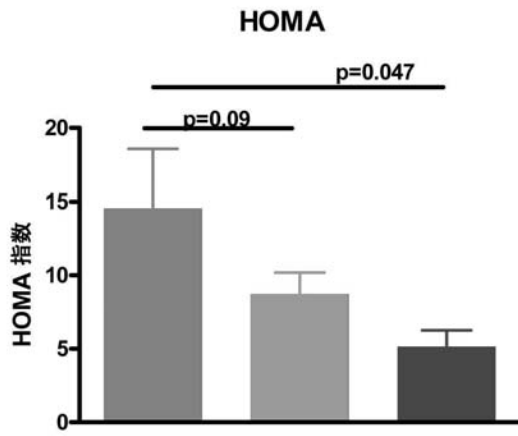


【 図 1 3 B 】



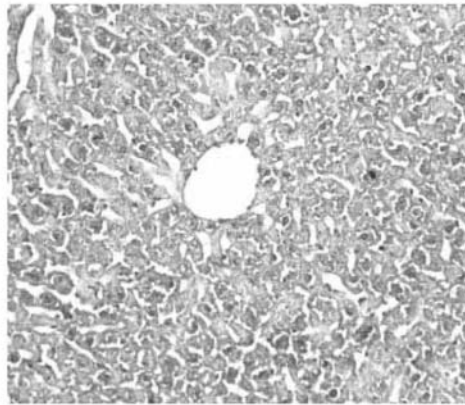
【 图 1 3 C 】

图. 13C



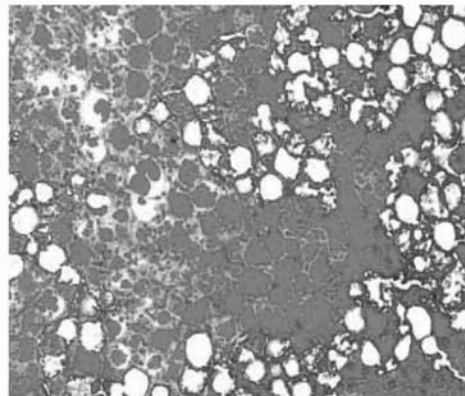
【 图 1 4 A 】


图. 14A




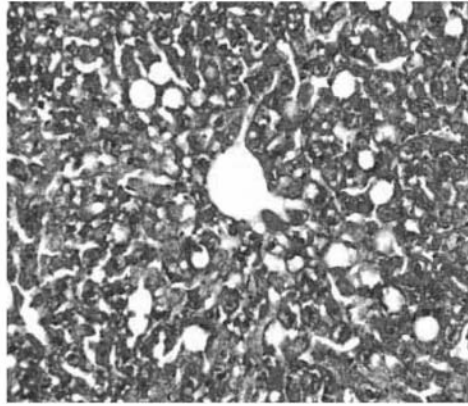
【 图 1 4 B 】


图. 14B



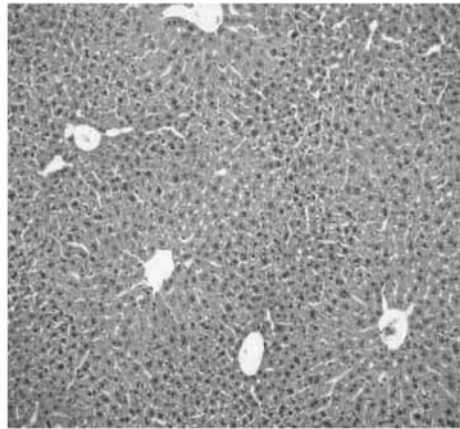
【 14C】


. 14C



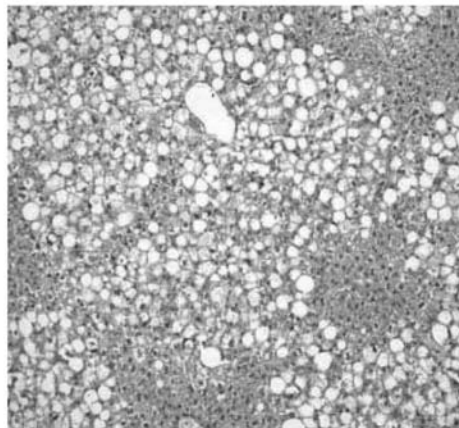
【 14D】

. 14D



【 14E】

. 14E





## フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	
A 6 1 P 9/10	(2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 19/08	(2006.01)	A 6 1 P 19/08	
A 6 1 P 35/00	(2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	C 1 2 P 21/08	

- (72)発明者 チエン, ヤン  
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19087ウエイン・チエスウオールドコート306
- (72)発明者 ガードナー, デブラ  
アメリカ合衆国デラウェア州19701ベア・ターウツドコート4
- (72)発明者 ナイト, デイビッド・エム  
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19312バーウイン・ホワイトハウスロード2430
- (72)発明者 ラーク, マイケル・ダブリュー  
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19333デボン・ティンバーレーン523
- (72)発明者 リアング, バイリン  
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19525ギルバーツビル・マリエツタウエイ2868
- (72)発明者 シーリー, デイビッド・ジエイ  
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19335ダウニングタウン・ペンスリツジブレイス1351
- (72)発明者 ソング, シアオ・ユー・アール  
アメリカ合衆国ニュージャージー州08807ブリツジウオーター・スラツクコート7
- (72)発明者 ストジャノビク - ススリク, ベドラナ  
アメリカ合衆国ニュージャージー州08550プリンストンジャンクシヨン・ノーチエスタードライブ26
- (72)発明者 スウィート, レイモンド・ダブリュー  
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19010プリンマウア・オークスプリングロード700
- (72)発明者 タム, スーザン・エイチ  
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19061ブースウイン・ブルツククラフトレーン3781
- (72)発明者 ウー, シエング - ジウン  
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19008ブルーモール・キャンドルウツドロード317
- (72)発明者 ヤング, ジング  
アメリカ合衆国ペンシルベニア州19008アンブラー・クリスタルバリードライブ1409
- (72)発明者 マークイス, デイビッド・マシユー  
アメリカ合衆国カリフォルニア州92024エンシニタス・メドグリーンコート2106
- (72)発明者 スミス, エリク・マイケル  
アメリカ合衆国カリフォルニア州92131サンデイエゴ・チャーボノテラス10782
- (72)発明者 バセロツト, アライン・フィリップ  
アメリカ合衆国カリフォルニア州92009カールスパド・ラパロマストリート6421

審査官 北村 悠美子

(56)参考文献 国際公開第04/039826(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

CA/REGISTRY(STN)

UniProt/GeneSeq