

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項  第一款或  第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

美國；2005年12月09日；60/749,152

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

## 九、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明有關於一蛋白酶體抑制劑結合一介白素-6 拮抗劑之用途，其提高一經治療關於如癌症之疾病的患者的治療反應。本發明亦有關於用以治療一患者之癌症的方法，其藉著投以一有效量之一蛋白酶體抑制劑以及一有效數量之介白素-6 拮抗劑予一患者。本發明特別是有關於包括專一於介白素-6(IL-6 亦被知曉為干擾素  $\beta$ 2)蛋白質之特定部分或變異體的抗體。

### 【先前技術】

#### 細胞介素 IL-6

IL-6(介白素 6)是一種早先被公認為單核球-衍生人類 B 細胞生長因子，B-細胞刺激因子 2、BSF-2、干擾素貝他-2，以及融合瘤生長因子的 22-27 kDa 經分泌糖蛋白質，其具有生長刺激性及前發炎性活性(Hirano et al. Nature 324 : 73-76, 1986)

IL-6 屬於顆粒性白血球集落-刺激因子(granulocyte colony-stimulating factor)以及含括白血病抑制因子(LIF)、抑瘤素(oncostatin M,OSM)、睫狀神經滋養因子(ciliary neurotropic factor, CNTF)、嗜心素-1 (cardiotropin-1, CT-1)、IL-1，與 IL-11 之以及骨髓單核細胞生長因子(MGF)家族。IL-6 由一群細胞種類所製造，最著名的為抗原表現細胞，T 細胞與 B 細胞。IL-6 型細胞介素全部經由含有一共通信息

轉導蛋白，gp130(早先為 IL-6Rbeta)受體複合物而作用。然而，雖然 IL-6、IL-11、CT-1 以及 CNTF 首先結合至特定受體蛋白，該受體蛋白隨後地與 gp130 締合，LIF 及 OSM 直接地結合一 LIF-R 以及 gp130 之複合物。該特定 IL-6 受體(IL-6R 或 IL-6 阿伐，gp80，或 CD126)不是以膜連結(membrane bound)就是以可溶型式(sIL-6，一種 55kD 型式)存在，這兩者均可活化 gp130。

許多物質如 IL-1、IL-2、TNFa、IL-4、IFNa、抑瘤素以及脂多醣(LPS)已知為誘發 IL-6 的表現。IL-6 涉及如 B 及 T 細胞活化、造血、破骨活性、角質細胞生長、急性期蛋白質合成、神經細胞生長以及肝細胞活化的多樣化活動(Hirano et al. Int. Rev. Immunol;16(3-4):249-84,1998)。

雖然 IL-6 涉入許多路徑，IL-6 剔除小鼠具有一正常基因型，他們可生長發育且有生殖能力，並顯示略為降低之 T 細胞數目以及降低對組織受傷起反應之急性期蛋白質反應(Kopf M et al. Nature:368:339-42, 1994)。相反地，過度表現腦部 IL-6 的轉殖小鼠發展如神經退化、星狀細胞增生(astrocytosis)、腦血管新生的神經性疾病，且這些小鼠無法發育血腦障壁(Campbell et al. PNAS 90:10061-10065, 1993)。

### IL-6 在癌中的角色

IL-6 透過各種不同機制涉入數種惡性疾病之病理生理學。IL-6 被假設為一個癌症-相關聯罹病率如衰竭(asthenia)/

惡病質(cachexia)與骨質吸收的起因。經腫瘤-誘發之惡病質(Cahlin et al. (2002) Cancer Res;60(19):5488-9)，骨質吸收與相關連高鈣血症在 IL-6 剔除小鼠中被發現到減少(Sandhu et al. 1999)。癌症-相關聯憂鬱，以及次發於腦瘤之腦水腫亦與 IL-6 的高水平相關聯(Musselman et al. Am J Psychiatry.;158(8):1252-7, 2001)。

一些各種不同人類癌症之活體外以及活體內模式的實驗結果已證實 IL-6 是一種用以抑制作用的治療標靶。IL-6 可誘發腫瘤細胞的增生、分化以及存活，促進細胞凋亡(Jee et al. Oncogene 20:198-208,2001)，並且誘發對化學療法之抗性(Conze et al. Cancer Res 61:8851-8858,2001)。

多發性骨髓瘤為惡性的涉及漿細胞。透過涉及惡性細胞凋亡抑制之一自迴分泌或旁分泌機制，IL-6 已知為增強多發性骨髓瘤之惡性漿細胞的增生、分化以及存活。因此，IL-6 的阻斷已被推測為一種有效療法(Anderson et al. Hematology:147-165,2000)。活體外實驗(Tassone, P. et al. Int. J. Oncol. 21(4):867-873,2002)以及臨床試驗兩者已被執行(Bataille et al. (1995) Blood; 86(2):685-91 與 Van Zaanen, et al. (1996) J Clin Invest 98:1441-1448)且結果表示 IL6 阻斷對癌細胞生長具有顯而易見之效果。

### 作為治療標靶之蛋白酶體路徑

近來實驗證據強烈地顯示蛋白酶體抑制劑於特定病理學例癌症、氣喘、腦栓塞，以及自體免疫腦脊髓炎是有利

的。於惡性疾病中，藥物可經由抑制不同細胞週期抑制劑降解或經由抑制抗-細胞凋亡轉錄調控因子 NF- $\kappa$ B 而作用，但它們在神經保護中可經由抑制 NF- $\kappa$ B 的活性[其在此例中表示為發炎反應]而作用。自體免疫疾病中，他們可藉著抑制“自身”肽的存在而作用，但亦透過干擾沿著細胞免疫串級之信息轉導。

雙肽硼酸蛋白酶體抑制劑 PS-341，硼替佐米 (VELCADE®)，是第一個經證實被公認扮演一具有效果且專一之蛋白酶體抑制劑的治療劑。雖然硼替佐米在骨髓瘤治療上是一個重要進展，但僅有 27% 具有重症或復發疾病的病患在使其獲得 FDA 核准的第二期臨床試驗具有局部反應或較佳者 (Richardson PG et al, N Engl J Med 2003, 348:2609-17)。前-臨床研究已確認誘發性化學抗性的重要媒介者 [包括隨著暴露於蛋白酶體抑制劑而被向上調節的抗-細胞凋亡路徑，俾以減弱他們的抗-腫瘤效力] (reviewed in Saleh A et al, Nat Cell Biol 2000, 2:476-83)。

化學抗性對蛋白酶體抑制劑的其中一個機制為一種細胞凋亡之重要抑制劑，HSP-70 的誘發表現。蛋白酶體的抑制造成錯誤摺疊蛋白質的堆積以及熱休克蛋白家族成員經由轉錄因子，HSF-1.5-8 活化 [最著名的為 HSP-70] 急遽向上調節。被假設的是：消除 HSP-70 誘發的治療劑應當可使蛋白酶體抑制劑活性變為可能。其它研究中，HSP-70 表現量透過 siRNA 或反-意義 (anti-sense) 技術向下調節令蛋白酶體抑制劑在其它癌症的前-臨床模式中的原-細胞凋亡活性變

為可能(Robertson JD et al, Biochem J 1999, 344:477-85; Gabai VL et al, Oncogene 2005, 24:3328-38)。

誘發性化學抗性的第二例為 MKP-1 磷酸酶，其透過蛋白酶體抑制劑被轉錄地向上調節(Orlowski RZ et al, J Biol Chem 2002, 277:27864-71)。MKP-1 磷酸酶是一種亦為藉著 c-Jun-N-終端激酶活化而作用的抗-細胞凋亡的壓力反應蛋白。MKP-1 的向下調節已顯示增強蛋白酶體抑制劑的抗-腫瘤效果 (Small GW et al, Mol Pharmacol 2004, 66:1478-90)。

如透過 IL-6 對骨髓微環境內之骨髓細胞作為如一生長以及存活因子功能的能力，並且活化一降低對各種不同化學治療劑敏感度之抗-細胞凋亡程式所證實，IL-6 於骨髓瘤致病機轉中扮演一個中心角色。在多種模式系統中，IL-6 在一些模式系統中已被顯示向上-調節 HSP-70 的表現。其次，STAT-1，一種經由 IL-6 傳訊所活化的重要下游轉錄因子，與 HSF-1 交互作用以促進熱休克反應成員的轉錄。

因此，為了更有效、更低毒性，以及更持久之臨床反應的研究中，證明藥劑組成物有用於治療特定癌症以及相關聯或非關聯肌肉萎縮(muscle wasting)，還有特定神經源或非神經源的發炎或自體免疫疾病是重要的。迄今，IL-6 抑制劑以及蛋白酶體抑制劑之結合細胞介素的有益效果尚未被證實。

### 【發明內容】

本發明有關於用以該一患者的疾病之方法，其藉由投以一有效量之一蛋白酶體抑制劑與一有效數量之一介白素-6拮抗劑予該患者。本發明之方法含有依序地、連續地，  
5 或同時地之一抗-IL-6拮抗劑連同硼替佐米(bortezomib)或相關連之蛋白酶體抑制劑的投藥。在一具體例中，該IL6拮抗劑是一高親和力的抗-IL6抗體。另一具體例中，該IL6拮抗劑為一抗-IL6R抗體。

一適用於本發明方法的疾病包括癌症、衰弱、炎性病  
10 以及神經病變。一具體例中，該疾病為癌性疾病或狀態。

本發明更提供一種方法，用以預測至少一IL-6拮抗劑以及至少一蛋白酶體抑制劑的一組合物的實用性。

### 發明詳細說明

#### 縮寫

Ig 免疫球蛋白，IgG 免疫球蛋白 G，IL 介白素，IL6  
介白素-6，IL-6R 介白素-6受體，sIL-6R 可溶性介白素-6  
受體，HSF-1 熱休克轉錄因子，HSP 熱休克蛋白，MAPK  
細胞分裂素活化蛋白激酶，MPK-1 MAPK 磷酸酶，Mab 單  
20 株抗體，STAT 信息轉導活化。

#### 定義

“抗體”一詞此處以廣義地被使用且只要展現所欲生物活性，專一地含括單株抗體[包括全長單株抗體]、多株

抗體、多專一性抗體[諸如雙專一性抗體]，以及抗體片段。

“抗體片段”包含一全長抗體的一部分，通常為其抗原結合或可變域。抗體片段之例包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>，以及 Fv 片段；雙價抗體 (diabodies)；線型抗體 (linear antibodies)；單鏈抗體分子；以及形成自抗體片段的多專一性抗體。

“嵌合抗體”一詞為那些保留特殊域，通常為來自一個種別的可變域且剩餘部分為另一種別；諸如鼠-人嵌合體。

此處所用“人類抗體”一詞，意欲含括具有衍生自或近乎相等於人類生殖細胞免疫球蛋白序列之可變以及固定區的抗體。本發明之該人類抗體可包括不由人類生殖細胞免疫球蛋白序列所編碼之胺基酸殘基(諸如藉著活體外隨意或定點突變或如人類重鏈之 V、D，及 J 片段的重組期間之藉著活體內體細胞突變)。故此處所用，“人類抗體”之詞指涉基本上蛋白質的每一部分[諸如 CDR、架構、C<sub>L</sub>、C<sub>H</sub> 域(諸如 C<sub>H</sub>1、C<sub>H</sub>2、C<sub>H</sub>3)、樞紐、(V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>)]係基本上類似於那些由人類生殖細胞抗體基因所編碼者。人類抗體已根據胺基酸序列相似性被分類為數群，見諸如 <http://people.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/>。因此，使用一序列相似性研究，一具有相似線性序列的抗體可被選作為一模板以選擇或創造人類或人類化抗體。

如此處所用，關於一抗體之“高親和力”一詞指涉具有一 K<sub>D</sub> 為 10<sup>-8</sup> M 或更低，較佳地 10<sup>-9</sup> M 或更低且更為佳



地  $10^{-10}$ M 或更低的抗體。此處所用 “Kdis” 或 “ $K_D$ ”，或 “Kd” 數詞意欲指涉一特定抗體-抗原交互作用的解離速率。該 “ $K_D$ ” 為解離速率( $k_2$ )，也被稱為 “解離速率(koff)”，相對於結合速率( $k_1$ )或 “結合速率(kon)” 的比例。故，KD 5 等同於  $k_2/k_1$  或  $k_{off}/k_{on}$  且被表示為一莫耳濃度(M)被表示。其遵循 Kd 越小，結合越強。因此  $10^{-6}$ M(或 1 mM)表示相較於  $10^{-9}$ M(或 1 nM)較弱的結合。

如此處所用，該 “泛素-蛋白酶體系統” 為一識別並降解不需要之蛋白質的多-組分系統。該系統包括需用以辨識 10 由於其損害、錯誤折疊或短生命週期細胞特性造成的不需要蛋白質之酵素，其為與不需要之蛋白質的泛素化相關聯，還有含有蛋白酶體結構的降解性酵素，其為一種在細胞核及細胞質中被發現到的多次單位複合體。

如此處所用，“蛋白酶體抑制劑” 一詞意欲含括蛋白酶體之肽酶抑制劑。更特別地，這些蛋白酶體之肽酶抑制劑 15 包括除了硫醇型及絲胺酸蛋白酶以外的胰凝乳酶-類似以及胰蛋白酶-類似蛋白酶抑制劑。

如此處所用，當指涉一癌細胞時，“抗性” 一詞相對於一治療劑代表與治療劑的水平接觸後，相較於正常或無 20 抗性細胞與相同治療劑水平或濃度接觸，細胞已達到對一藥劑效果的抗性，其通常地由一環境水平的暴露或該藥劑阻礙或抑制增生，或極為低度地受到抑制的濃度所造成。對一治療劑變成抗性的特性係一種高度可變者，在不同情況下，相對於一給予的治療劑，各種不同癌細胞展性不同

程度的“抗性”。

該蛋白酶體抑制劑硼替佐米代表多發性骨髓瘤治療的一顯著進展，但其效力受到一些抗性機轉所限制。最重要的其中一者為熱休克蛋白(HSP)以及壓力反應路徑，其經由如 HSP-70 以及細胞分裂素-活化蛋白質激酶(MAPK)磷酸酶(MKP)-1 的成員對抗硼替佐米的原-細胞凋亡活性。因為介白素(IL)-6 傳訊透過信息轉導者與及轉錄活化因子(STAT)-1 及熱休克轉錄因子(HSF)-1 放大熱休克反應，申請人假定介白素(IL)-6 傳訊的向下調節可減緩由硼替佐米的 HSP 誘發，藉此增強其抗-骨髓瘤活性。

以一時間-及濃度-依賴型方式，以硼替佐米與 CNTO 328[一種嵌合體單株型 IL-6 中和抗體]之組合物治療 IL-6 依賴型多發性骨髓瘤細胞株 KAS-6 及 ANBL-6，造成細胞活性的降低較單一藥物為高。這與一細胞凋亡的增強誘發相關聯，在某些情況下，較兩種個別藥劑單獨的總和還高，暗示一協同作用。當使用同型(isotype)對照抗體以及 IL-6-依賴型 RPMI 8226 骨髓瘤細胞株的研究中，類似的發現未見到。當細胞以 CNTO 328 預先處理繼而硼替佐米，或當它們同時地以兩種藥劑被處理時，相較於以硼替佐米的處理繼而 CNTO 328，被觀察到增加的活性。以 CNTO 328 之療法可能抑制 IL-6 媒介下游傳訊路徑，如透過 STAT-3 及 p44/42 MAPK 磷酸化的顯著阻斷被證實。CNTO 328 降低硼替佐米-媒介之 HSP70 誘發以及 MKP-1 表現分別地達 45%與 90%。顯著地，CNTO 328 明顯地降低轉錄活化磷酸

-STAT-1 的水平並減少 HSF-1 的過度磷酸化。其它壓抑熱休克反應[包括藥理學抑制劑 KNK437]的策略，與硼替佐米結合亦產生關於一協同性抗-骨髓瘤效果的證明。KNK437 與硼替佐米的協同活性在正常老鼠胚胎纖維母細胞(MEFs) 5 中重現，但在 HSF-1 剔除 MEFs 中被減弱。總地來說，申請人已證明 IL-6 傳訊的抑制增強硼替佐米的抗-骨髓瘤活性。他們也支持假說：至少一部分，這藉著透過向下調節轉錄活化 STAT-1 及 HSF-1 以減緩熱休克反應的蛋白酶體抑制劑-媒介之誘發而發生。本發明之教示提供關於一種以 10 抗 IL6 抗體接序地、連續地或同時地連同硼替佐米或相關聯之蛋白酶體抑制劑治療有其需要之患者的方法的原理。

### 本發明之 IL6 拮抗劑

只要阻斷經由 IL-6 之信息傳送，並抑制 IL-6 的生物活 15 性，用於本發明之 IL-6 拮抗劑可為任何來源。IL-6 拮抗劑之例包括 IL-6 抗體、IL-6R 抗體、gp130 抗體、IL-6 變異體、反意義寡核苷酸，以及 IL-6 或 IL-6R 的局部肽。用於本發明之 IL-6 變異體係揭露於 Brakenhoff, et al., J. Biol. Chem., 269, 89-93,1994 或 Savino, et al., EMBO J., 13, 20 1357-1367, 1994。該 IL-6 變異體多肽或其片段不具有 IL-6 的信息傳送效果但維持與 IL-6R 的結合活性，且透過以一取代、刪除或插入的型式將一突變導入 IL6 之胺基酸序列中。雖然所用動物種別並無限定，較佳地係使用人類來源的一 IL6。類似地，任何用於本發明之 IL-6 局部肽或 IL-6R

局部肽，只要它們防止 IL6 或 IL6R (gp80)或 gp130 影響信息轉導藉以防止 IL-6 相關聯之生物活性(美國專利第 5,210,075 號；EP 第 617126 號關於 IL-6 局部肽以及 IL-6R 局部肽的細節)。仍另一具體例中，可行 IL6 或 IL6R RNA 5 沉默或反意義技術的寡核苷酸可用於本發明之方法中 (JP5-300338 關於 IL-6R 反意義寡核苷酸的細節)。

### ● 本發明之抗體

用於本發明的抗體包括具有至少一可抑制 IL6 生物功  
10 能的抗原結合區單離嵌合體、經人類化及/或 CDR-移植，  
或人類抗體。本發明抗體之例包括 IL-6 結合抗體、IL-6R  
(gp80)結合抗體、gp130-結合抗體。具有適當抗原結合區的  
IL-6R 抗體之例包括 PM-1 抗體(Hirata, et al., J. Immunol.,  
143, 2900-2906, 1989)，以及 AUK12-20、AUK64-7 或  
15 AUK146-15 抗體 (WO92-19759)。另一具體例中，該抗  
-IL6R 抗體係經再整型抗體，其已知為揭露於美國專利第  
5888510 號與第 6121423 號中的 MRA。

於一具體例中該抗原結合區係衍生自高親和力的  
CLB-8 抗-IL-6 抗體。衍生自 CLB-6 的本發明之一例示抗體  
20 為如申請人共同-審理中申請案[美國序號第 10/280716 號]  
中所述之 CNTO328，其內容作為參考文獻被併入此處。一  
替代具體例中，該抗體為一人類抗體，其如申請人共同-  
審理中臨時申請案[序號第 60/677,319 號]中所述以高親和  
力結合 IL6。本發明的抗體以高親和力專一地中和人類

IL-6。

可用於如根據本發明之方法的一抗-IL-6 抗體包括任何蛋白質或肽分子，其含有衍生自鼠 CLB-8 單株抗體的一重或輕鏈或其一配位子結合部分的至少一互補決定區 (CDR)，結合可被併入本發明之一抗體的一重鏈或輕鏈固定區、一架構區，或其任何部分。本發明的一具體例是有關於一抗-IL-6 嵌合抗體，其含有兩個輕鏈以及兩個重鏈，每一個鏈含有一人類固定區的至少一部分以及一可變區(v)的至少一部分，其衍生自對人類 IL-6 具有專一性的鼠 c-CLB8 單株抗體，該抗體以高親和力結合至一人類 IL-6 的一抑制及/或中和抗原決定區[如該抗體 cCLB-8]。本發明亦包括此一抗體的片段或一衍生物，如該抗體鏈的一個或更多個部分[如該重鏈固定區、樞紐區、多樣或可變區，或該輕鏈固定區、樞紐區或可變區]。

本發明的較佳抗體含括那些嵌合體、經人類化及/或 CDR 移植，或人類抗體，其競爭地抑制活體內人類 IL-6 結合至抗-IL-6 鼠 CLB-8、嵌合抗-IL-6 CLB-8，或一具有基本上相同結合特質，還有其片段及區。

本發明的抗體較佳地以一至少  $10^{-9}$  M、較佳地至少  $10^{-10}$  M 之一親和力( $K_d$ )結合抗-IL6 或抗-IL6R，及/或基本上中和至少一 IL-6 蛋白的一活性。一較佳具體例中，該抗體以一至少  $1 \times 10^{-11}$  M、較佳地  $5 \times 10^{-11}$  M 的親和力中合人類 IL-6。較佳地，該抗體不結合其他 IL-6 超家族成員並阻斷 GP130 的傳訊。

## 蛋白酶體抑制劑

該蛋白酶體為一細胞內結構，其為一高度保守的多催化性蛋白酶。蛋白酶體負責許多涉及重要調節性細胞過程之蛋白質的 ATP-依賴型蛋白水解。因此，該蛋白酶體在細胞生長與分化中為一種調節性要素。人類細胞平均具有約 30,000 個蛋白酶體，其每一者含有一些蛋白質-消化蛋白酶。這些複合物有各式各樣的功能，包括轉錄、細胞週期控制、壓力反應、核糖體生體合成，以及異常蛋白質代謝。故，它們在此類如免疫與發炎反應(WO 95/25533)、病毒性感染、腫瘤形成、神經性與肌肉性退化(美國專利第 5,340,736 號)、抗原處理(WO 94/17816)、DNA 修復，以及細胞分化的過程中扮演一個角色。蛋白酶體活性係極度敏感地受到控制以對經降解蛋白質的速率以及特定型態維持嚴密監控。

許多步驟係經由該蛋白酶體或“泛素-蛋白酶體”路徑被涉入蛋白質降解。最初，一蛋白質以一個小型多肽鏈[已知為泛素]被標識為供摧毀。泛素化指引蛋白質進入蛋白酶體的圍繞蛋白水解腔室中。三種酵素活性，E1、E2 及 E3，係被需要以供泛素化。該 ATP-依賴型 E1 酵素活化泛素並將它連接至泛素-接合酵素，E2。該 E3 酵素，一種泛素接合酶，隨後連結泛素分子至該蛋白質。此步驟被重複直到該被指定的多肽拖曳一長鏈的泛素部分且該蛋白酶體最終地降解該蛋白質為小片段。該泛素-蛋白酶體路徑負責所有細胞內 90%的異常、錯誤摺疊蛋白質以及所有短-壽命、調

節性蛋白質的降解。這些短-壽命蛋白質，其半衰期係低於三小時者，佔了所有細胞蛋白質的約 10%至 20%。此路徑亦分解大多數長-壽命細胞蛋白質。因此，該泛素-蛋白酶體路徑負責降解 80%至 90%的所有細胞內蛋白質。

5 早期報導蛋白酶體抑制劑包括肽醛。這些的初步最佳化暗示白胺酸於該 P1 位置以及一大的恐水性殘基[如萘丙氨酸]於 P2 或 P3 位置的一優先權。由於肽醛亦證實硫醇型蛋白酶[諸如鈣蛋白酶(calpain)、細胞溶解酶(cathepsin)]的有效抑制且因位於阿伐-位置的質子酸性而為非結構性穩定，關於該醛基的取代係被研究。

10 除了本源地分離自放射菌的抗生素抑制劑以外，各種不同的肽醛已被合成，如由 Siman et al (WO91-13904)所述的胰凝乳蛋白酶-類似蛋白酶。該蛋白酶體複合物的各種不同抑制劑已被報導，諸如 Dick, et al., Biochem. 30:2725 (1991)；Goldberg, et al., Nature 357:375(1992)；Goldberg, Eur. J. Biochem. 203:9(1992)；Orlowski, Biochem. 29:10289(1989)；Rivett, et al., Archs. Biochem. Biophys. 218:1(1989)；Rivett, et al., J. Biol. Chem. 264:12, 215 (1989)；Tanaka, et al., New Biol. 4:1(1992)。蛋白酶體抑制劑亦被討論於美國專利第 5,693,617 號，其揭示內容於此處被併入參考文獻中。

20 一較佳的蛋白酶體抑制劑為“PS-341”，其指涉一雙肽硼酸蛋白酶體抑制劑硼替佐米，[(MLN-341、LDP-341以及 PS-341；N-(嗎啉基)羰基)-貝他-(1-萘基)-L-丙胺酸-L-

白胺酸硼酸)以品牌名 VELCADE®，WO96-013266)被販售]。PS-341 抑制轉錄因子 NF- $\kappa$ B 的活化。PS-341 亦向下調節數種細胞凋亡抑制劑的表現、誘發抗藥性多發性骨髓瘤(MM)細胞株與病患細胞的凋亡酶(caspase)-依賴型細胞  
 5 凋亡、抑制 MM 細胞結合至骨髓間質細胞(BMSCs)且抑制 MM 生長的發生以及骨髓環境中的存活因子(survival factors)。

對照抑制蛋白酶體以及半胱胺酸蛋白酶兩者活性的肽  
 10 醛，硼替佐米係一更有效果且更具選擇性的蛋白酶體抑制劑。其對蛋白酶體具有相當高的選擇性性(>500-倍)勝過絲胺酸蛋白酶[包括人類白血球彈性蛋白酶、細胞溶解酶 G、胰凝乳蛋白酶以及凝血酶]。硼替佐米係近來被證實關於治療舊病復發以及難以治療的多發性骨髓瘤。在各種不同腫瘤培養模式中透過硼替佐米抑制腫瘤細胞蛋白酶體係與細胞  
 15 凋亡的誘發相關聯。

專一性蛋白酶體抑制劑藉著與蛋白酶體內活性位蘇胺  
 20 酸反應的藥效團被區分成五類：肽醛[如 CEP1612 及 MG132]、硼酸肽[如硼替佐米]、乙烯砜肽、環氧酮肽以及  $\beta$ -內酯抑制劑[如內酯胱胺酸(lactocystin)]。下列化合物，或其類似物，亦被計畫作為本發明之蛋白酶體抑制劑：  
 PS-519(1R-[1S,4R,5S])-1-(1-羥基-2-甲基丙基)-4-丙基-6-氧雜-2-吡雙環[3.2.1]庚烷-3,7-二酮；裂解-乳糖胱胺酸(clasto-lactacystin)貝他-內酯；乳糖胱胺酸，環氧聚醯胺黴素(epoxomicin)、CVT634(-5-甲氧基-1-二氫茛酮-3-乙醯基-



白胺酸基-D-白胺酸基-1-節胺)、TMC96((3-甲基丁醯基-L-蘇胺酸 N-(1-(2-(羥甲基)-環氧乙烷-2-羰基)-3-甲基丁-3-烯基)醯胺), MG-115、CEP1612 以及 MG132。

除了蛋白酶體蛋白酶抑制劑以外，該泛素-蛋白酶體路徑亦可透過促進酵素泛素-活化酵素(E1)、泛素-結合酵素(E2)，以及泛素-接合酶(E3 酵素)的抑制劑而被阻斷。E1 抑制劑已被發現如海米克酸 A(himeic acid A) (Tsukamoto, et al. 2005, Bioorgan Med Chem Lett 15(1):191-194)]。本技藝中其它已知方法，例 RNA 沉默，亦可被用於降低或減少特定泛素化-相關聯酵素的活性。

### 監測蛋白酶體抑制活性

一種用以監測一蛋白酶體抑制劑於一哺乳動物中的藥物動力學藥物作用的方法係示於美國專利第 6613541 號中被教示，發明人驚訝地發現到在生物樣本中，蛋白酶體活性而非藥物濃度的體外分析，提供一種用於監測蛋白酶體抑制劑之藥物動力學藥物作用的有用方法，且該數據提供用以篩選未來將被投藥之蛋白酶體抑制劑的一將來劑量數量以及劑量頻率的導引。

該方法包含投以該蛋白酶體抑制劑予該哺乳動物；投以該蛋白酶體抑制劑後，於一或更多個特定時間自該哺乳動物取得一個或更多個測試生物樣本；測量測試生物樣本中的蛋白酶體活性；決定該測試生物樣本的蛋白酶體活性量；以及比較測試生物樣本中的蛋白酶體活性量相對於那

些在來自一無蛋白酶體抑制劑被投藥之哺乳動物的一參考生物樣本者。

美國專利第 6613541 號更提供一用以決定關於一蛋白酶體抑制劑的劑量方式的方法、一用於決定一哺乳動物[包括一人類]的基礎蛋白酶體活性的方法，以及提供一種用於測量自一哺乳動物的生物樣本之蛋白酶體活性的套組。美國專利第 6,613,541 號的方法可實施於選自一血液、尿液，以及組織生檢樣本的生物樣本。

## IL6 的測量

IL6 可在使用 IL6 易感型細胞株[見：7TD1；B9；CESS、KPM2、KT-3；M1、MH60-BSF-2、MO7E；Mono Mac 6；NFS-60；PIL-6；SKW6-C14；T1165；XG-1]的生物分析法中被偵測。IL6 亦可藉著其作為一融合瘤生長因子的活性(見：HGF)被分析。敏感度免疫分析以及比色試驗亦為可使用。一替代性偵測方法為細胞介素的 RT-PCR 定量。一 ELISA 分析存在以偵測受體-相關聯 gp130 蛋白(此類試劑係可取自諸如 R&D Systems)。

為偵測結合至 CNTO328 的 IL6，該抗-ID(揭示於申請人共同審理中申請案美國序號第 10/280716 號中的抗-可變區抗體可用以偵測任何如一 ELISA-型分析般的標準免疫分析型式)。

適用於透過本發明方法治療的疾病

IL6 的失控表現可能是涉及一些疾病病理學的主要因素之一。IL6 的過量過度製造(以及其他 B-細胞分化因子)已在各種不同病理學情況如類風濕性關節炎、多發性骨髓瘤、雷納氏症候群(組織細胞性淋巴肉瘤)、凱索曼氏病(Castleman's disease, 具有漿細胞過度浸潤、高伽瑪-蛋白血症、貧血症, 以及急性期蛋白增高濃度的淋巴腺病)、心臟黏液瘤以及肝硬化被發現。透過膠質母細胞瘤的 IL6 基本合成以及 IL6 分泌至腦脊髓液已被觀察到。

關於免疫媒介炎症性疾病(IMIDs), 由於 IL6 的過量濃度已在滑液中被發現, IL6 意味著慢性多發性關節炎的致病機轉(連同 IL1 與 IL8)。在炎症性腸病中, IL6 的升高血漿水平可以是疾病狀態的一種指標。具有腎膈細胞增生型腎炎的病患中, 升高的 IL6 尿水平也是疾病狀態的一種指標。IL6 可能在第 I 型及第 II 型糖尿病的免疫媒介致病機轉中扮演角色。

因此, 本發明亦提供一種用於調節或治療至少一種如該項技藝中所知或如此處所述, 於所有細胞、組織、器官、動物, 或病患中與 IL-6 相關聯疾病的方法, 其使用本發明至少一 IL-6 抗體者[諸如投以一治療有效量的 IL-6 抗體結合一蛋白酶體抑制劑的投藥予細胞、組織、器官、動物或病患, 或令其與細胞、組織、器官、動物或病患接觸]。本發明亦提供一種用調節或治療細胞、組織、器官、動物, 或病患中至少一與 IL-6 相關聯疾病[包括肥胖、一免疫相關聯疾病、一心血管疾病、一感染性疾病、一惡性疾病或一

神經性疾病]的方法。

本發明亦提供一種方法，用以於一細胞、組織、器官、動物，或病患中調節或治療至少一種與 IL-6 相關聯免疫相關疾病，其包括但不限定於下列至少一者：類風濕性關節炎、幼年型類風濕性關節炎、全身性發作幼年型類風濕性關節炎、乾癬性關節炎、僵直性脊椎炎、胃潰瘍、血清陰性關節炎、骨關節炎、骨質溶解、整形外科植入物的無菌性動搖/脫離、發炎性腸疾病、潰瘍性大腸炎、全身性紅斑狼瘡、抗磷脂症、虹膜睫狀體炎/眼色素層/視神經炎、原發性肺纖維化、全身性血管炎/華格納氏肉芽病、類肉瘤病、睪丸炎/輸精管切除逆轉程序、過敏性/特異性疾病、氣喘、過敏性鼻炎、濕疹、過敏性接觸性皮膚炎、過敏性結膜炎、過敏性肺炎、移植物、器官移植排斥、移植物-抗-宿主疾病、全身性發炎反應症候群、敗血病、革蘭氏陽性敗血病、革蘭氏陰性敗血病、培養陰性敗血病、真菌敗血病、中性白血球低下發燒、泌尿道感染敗血症、腦膜炎球菌血症、外傷/出血、燒傷、游離射線暴露、急性胰炎、成人型呼吸性窘迫症候群、類風濕性關節炎、酒精-誘發肝炎、慢性炎症性病理、類肉瘤病、克羅思氏病理學、鐮刀型細胞貧血症、糖尿病、腎病、特異性疾病、過敏反應、過敏性鼻炎、花粉熱、常年性過敏性鼻炎、結膜炎、子宮內膜異位、氣喘、蕁麻疹、全身性過敏性休克、皮炎、惡性貧血、溶血性疾病、血小板減少症、任何器官或組織的移植排斥、腎臟移植排斥、心臟移植排斥、肝臟移植排斥、胰臟移植排

斥、肺臟移植排斥、骨髓移植(BMT)排斥、皮膚同體移植排斥、軟骨移植排斥、骨移植排斥、小腸移植排斥、胎兒胸腺植入排斥、副甲狀腺移植排斥、任何器官或組織的異體移植排斥、同體移植排斥、抗-受體過敏反應、葛瑞夫茲氏病、雷諾氏病、B 型胰島素抗性糖尿病、氣喘、重症肌無力、抗體-媒介細胞毒殺、第Ⅲ型過敏反應、POEMS 症候群(多發性神經病變、臟器腫大、內分泌病變、單株免疫球蛋白增高，以及皮膚改變症候群)、多發性神經病變、臟器腫大、內分泌病、單株免疫球蛋白增高、皮膚改變症候群、抗磷脂症、天疱瘡、硬皮病、混合性結締組織病變、原發性艾迪生氏症、糖尿病、慢性活動性肝炎、原發性膽汁鬱積性肝硬化、白斑病、血管炎、後心肌梗塞-心切開術症候群、第Ⅳ型過敏、接觸性皮膚炎、過敏性肺炎、同體移植排斥、因細胞內生物的肉芽瘤、藥敏、代謝性/原發性、威爾遜病、血色沉著病、阿伐-1-胰蛋白酵素缺乏症、糖尿病視網膜病變、橋本氏甲狀腺炎、骨質疏鬆症、下視丘-腦下垂體-腎上腺軸評估、原發性膽汁鬱積性肝硬化、甲狀腺炎、腦脊髓炎、惡病質、囊腫纖維化、新生兒型慢性肺病、慢性阻塞性肺臟疾病(COPD)、家族性噬血細胞性淋巴組織細胞增生症、皮膚病、牛皮癬、脫髮症、腎病症候群、腎炎、腎小球性腎炎、急性腎衰竭、血液透析、尿毒症、子癩前症、okt3 療法、抗-cd3 療法、細胞介素療法、化學療法、放射線療法(諸如包括但不限於衰弱、貧血、惡病質，以及類似者)、慢性水楊酸中毒，以及類似者。參見諸如 the

Merck Manual, 12th-17th Editions, Merck & Company, Rathway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999)、藥學治療手冊, Wells et al., eds., 第二版, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), 每一者均整體地作為參考文獻被併入。

本發明亦提供一種方法，用以於一細胞、組織、器官、動物，或病患中調節或治療至少一種心血管疾病，其包括但不限定於下列至少一者：心臟頓抑、心肌梗塞、鬱血性心衰竭、中風、缺血性中風、出血、動脈硬化、動脈粥狀硬化、血管再狹窄、糖尿病性動脈硬化症、高血壓、動脈性高血壓、腎血管性高血壓、暈厥、震盪、心血管系統的梅毒、心臟衰竭、肺原性心臟病、原發性肺動脈高血壓、心律不整、心房異位脈衝、心房撲動、心房震顫(持續性或陣發性)、後灌注症候群、心肺繞道術發炎反應、紊亂性或  
多源性心房頻脈、規律性狹窄型 QRS 頻脈、特異性心律不整(arrhythmias)、心室震顫、希氏束心律不整、房室傳導阻滯、束枝傳導阻滯、心肌缺血、冠狀動脈疾病、狹心症、心肌梗塞、心肌症、擴張性充血性心肌症、限制性心肌症、心臟瓣膜疾病、心內膜炎、心包膜疾病、心腫瘤、主動脈(aortic)以及週邊動脈瘤(aneurysms)、主動脈剝離、主動脈發炎、腹大動脈及其分支閉合、周邊血管性病變、閉合性冠狀動脈病、周邊動脈粥狀硬化、閉鎖式動脈炎、功能性周邊動脈病變、雷諾氏現象與疾病、手足發紺、肢端紅痛症、靜脈病變、靜脈血栓、靜脈曲張、動靜脈瘻管、淋巴

水腫、脂性水腫、不穩定型狹心症、再灌注損傷、後幫浦症候群、缺血-再灌注損傷，以及類似者。此一方法可選擇性地含有投以一有效量的組成物或藥學組成物予有此種調節、治療或療法需求的一細胞、組織、器官、動物或病患，該組成物或藥學組成物含有至少一抗-IL-6 抗體。

本發明亦提供一種方法，用以於一細胞、組織、器官、動物，或病患中調節或治療至少一種 IL-6 相關聯感染性疾病，其包括但不限定於下列至少一者：急性或慢性細菌感染、急性與慢性寄生蟲或感染性過程，包括細菌、病毒以及真菌感染、HIV 感染/HIV 神經病變、腦膜炎、肝炎[諸如 A、B 或 C，或類似者]、敗血性關節炎、腹膜炎、會厭炎、e. coli O157:h7、溶血性尿毒症/血栓溶解性血小板減少性紫癍症、瘧疾、登革熱、利什曼原蟲症、癩病、毒性休克症候群、鏈球菌肌炎、氣疽、結核分支桿菌、鳥型胞內結核桿菌、囊胞蟲肺炎、骨盆發炎症、睪丸炎/副睪炎、退伍軍人病、萊姆病、流行感冒病毒 a、epstein-barr 病毒、病毒性-相關聯噬血細胞性症候群、病毒性腦炎/無菌性腦膜炎，以及類似者。

本發明亦提供一種方法，用以於一細胞、組織、器官、動物，或病患中調節或治療至少一種 IL-6 相關聯惡性疾病，其包括但不限定於下列至少一者：白血病、急性白血病、急性淋巴胚細胞白血病(ALL)、急性淋巴球性白血病、B 細胞、T 細胞或 FAB ALL、急性骨髓白血病(AML)、急性骨髓性白血病、chronic 骨髓性白血病(CML)、慢性淋巴

球性白血病(CLL)、髮狀細胞白血病、骨髓發育不良症候群(myelodysplastic syndrome, MDS)、淋巴瘤、霍奇金氏病、惡性淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、巴氏淋巴瘤、多發性骨髓瘤、卡波西氏肉瘤、大腸直腸癌、胰臟癌、鼻咽癌、惡性組織細胞病變、腫瘤伴生症候群/惡性高鈣血症、實性瘤、膽癌、乳癌、大腸直腸腫瘤、子宮內膜癌(endometrial cancer)、頭癌、頸癌、遺傳性息肉癌、霍奇金氏淋巴瘤、肝癌、肺癌、非-小細胞肺癌、卵巢癌、胰臟腫瘤、前列腺癌、腎細胞癌、睪丸癌、腺癌、肉瘤病、惡性黑色素瘤、血管瘤、轉移性病變、癌症相關聯骨質流失、癌症相關連骨痛，以及類似者。

本發明亦提供一種方法，用以於一細胞、組織、器官、動物，或病患中調節或治療至少一種 IL-6 相關聯免疫相關的神經性病變，其包括但不限定於下列至少一者：神經退化性疾病、多發性硬化症、偏頭痛、AIDS 癡呆複合症、髓鞘脫失性疾病[如多發性硬化症與急性橫斷性脊髓炎]；錐體外與小腦病變[如皮質脊髓系統損傷]；基神經節病變；運動機能亢進性疾病[如杭丁頓氏舞蹈病及老年性舞蹈病]；藥物-誘發運動機能疾病[如受那些阻斷 CNS 多巴胺受體的藥物所誘發者]；運動機能低下性疾病[如帕金森氏症]；漸進式超核麻痺(supranucleo Palsy)；小腦結構性損傷；脊髓小腦退化[如脊髓失調症、福來德瑞克氏運動失調症、大腦皮層退化、多重系統退化(Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager 以及 Machado-Joseph)]；全身性疾病(雷弗萊姆



氏病、abetalipoproteinemia(abetalipoproteinemia 脂蛋白尿)、共濟型為血管擴張症候群，以及粒線體多-系統病變)；髓鞘脫失核病變[如多發性硬化症、急性橫斷性脊髓炎]；以及運動元病變如神經肌肉萎縮(前角細胞退化，如肌萎縮性偏側硬化症、嬰兒型脊髓肌肉萎縮症及青年型脊髓肌肉萎縮症)；阿茲海默症；中年唐氏症；泛發性路易體疾病；路易體型老年癡呆；沃尼可-科沙可夫症候群；慢性酒精中毒；庫賈氏症；亞急性硬化腦炎；哈洛登-史貝茲症；拳擊性失智症；神經創傷性損傷(諸如脊髓損傷、腦損傷、震盪、重複性震盪)；疼痛：炎症痛；自閉；憂鬱；中風；認知疾病；癲癇；與類似者。此一方法可選擇性地含有投以一有效量的組成物或藥學組成物予有此種調節、治療或療法需求的一細胞、組織、器官、動物或病患，該組成物或藥學組成物含有至少一 TNF 抗體。見諸如 the Merck Manual, 16<sup>th</sup> Edition, Merck & Company, Rahway, NJ (1992)。

### 投藥方法

本發明之方法含有投以一有效量之一組成物或藥學組成物[其含有至少一抗-IL-6 抗體] 結合含有一蛋白酶體抑制劑之投藥的療法，給予有此調節、治療或療法需要的一細胞、組織、器官、動物或病患。本發明之方法含有治療此類疾病或病症，其中該至少一 IL-6 拮抗劑的投藥是必要的。本發明之方法更含有於至少一蛋白酶體抑制劑之前、同時，及/或之後，該 IL-6 拮抗劑的共同投藥。一特定具體

例中，該 IL6 拮抗劑是一種抗體[如一中和 IL6 抗體或一抗-IL6R 抗體]，其防止或抑制 IL6 的生物功能，且該蛋白酶體抑制劑係選自於下列群組：PS-314(硼替佐米)、PS-519；裂解-乳糖胺酸 貝他-內酯；乳糖胺酸、環氧聚醯胺黴素，CVT634、TMC96、MG-115、CEP1612 以及 MG132。

典型地，病理情況的療法係透過投以一有效量或劑量的一抗-IL-6 抗體組成物而達到效果，其全部，平均來說，病患每次劑量為每公斤自 0.01 至 500 毫克的至少一抗-IL-6 抗體，且較佳地，每單次或多次投藥係自約 0.1 至 100 毫克抗體/病患每公斤，其隨著包含於組合物中之活性劑 (active agent) 專一活性而定。任擇地，每單次或多次投藥，有效血清濃度可含有 0.1-5000 微克/毫升血清濃度。適當劑量對醫學從事者來說是已知的且將，必然，視特定疾病狀態、被投藥之組成物的專一活性，以及歷經治療的特定病患而決定。一些例子中，為達到所欲治療量，提供用以重複投藥[即一經監測或計量之特定劑量的重複獨立投藥]是需要的，直到獨立給藥被重複至所欲每日劑量或效果被達到。

用以注射投藥，該抗體或蛋白酶體抑制劑可被配製成一溶液劑、懸浮液、乳化劑、顆粒、粉劑，或經冷凍乾燥粉末結合，或個別地以藥學上可接受注射載體被提供。此載體之例為水、生理食鹽水、林格氏溶液、葡萄糖溶液，以及 1-10%人類血清白蛋白。脂質體以及非水性載體，如固定油，亦可被使用。該載體或經冷凍乾燥粉末可含有維

持等張性[諸如氯化鈉，甘露醇]以及化學穩定性[諸如緩衝劑或安定劑]的添加劑。該配方係透過已知或適當技術被滅菌。

5 適當的藥學載體係描述於 Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol[此領域中一標準參考文獻]的最近版本內。

### ● 投藥

10 許多已知以及經發展模式可根據本發明被使用以供投以根據本發明之藥學有效量的 IL6 拮抗劑以及蛋白酶體抑制劑。雖然注射投藥是典型的，其它投藥模式可如本發明以適當結果被使用。本發明之組成物可在一載體[如一溶液劑、乳化劑、膠體，或懸浮液]之中被運送，或如一乾燥粉末，使用各種不同適於藉著吸入或此處所述或該技藝中所  
15 知的投藥任一者被運送。

● 投藥的替代路徑包括皮下、肌肉內、靜脈內、關節內、枝氣管內、腹內、囊內、軟骨內、腔內、體腔內、腦室內、結腸內、子宮頸內、胃內、肝內、心肌內、骨內、骨盆內、心包膜內、腹腔內、胸腔內、前列腺內、肺內、直腸內、  
20 腎內、視網膜內、脊髓內、關節內、胸腔內、子宮內、膀胱內、疾病部位內、球劑、陰道、直腸、口頰、舌下、鼻內，或經皮的手段。

**【實施方式】**

根據假設，以嵌合體、單株 IL-6 中和抗體、CNTO328 的 IL-6 抑制透過減緩 HSP-70 硼替佐米-媒介之向上調節，使該蛋白酶體抑制劑，硼替佐米的抗-骨髓瘤活性變得可能，下列研究將被計畫並實施。

5 A. 以單株抗體、CNTO328 抑制 IL-6 傳訊，降低 IL-6-依賴型多發性骨髓瘤細胞株 ANBL-6 以及 KAS-6 的細胞存活 ANBL-6 以及 KAS-6(Dr. Diane Jelinek, Mayo Clinic, Rochester, MN)係以增加 CNTO328 或同型對照抗體[F105] 10 的濃度被培養歷時 24 與 48 小時。關於最後 4 小時，細胞被培養於 WST-1(Roche Applied Science, Indianapolis, IN)的存在中。透過活性細胞 WST-1 還原為一水溶性甲臍(formazan)鹽類係使用一 ELISA 平盤讀取儀於一吸光度 450 nM 被測量。活性係相對於未處理細胞被測量為活性百分比。所有細胞係被處理於含有 10% FBS 以及 1 ng/mL 的 15 IL-6 之 RPMI 1640 培養基中。

結果圖示於第 1 圖內[數值為五重複培養；帶，SEM]。以 CNTO 328 處理 ANBL-6 以及 KAS-6 細胞造成細胞活性的一劑量-與時間-依賴型下降。KAS-6 細胞相較於 ANBL-6 20 細胞，對 IL-6 抑制效果係顯著地更為敏感。

B. CNTO 328 使硼替佐米於 IL-6-依賴型骨髓瘤細胞中的抗-骨髓瘤活性變得可能

ANBL-6、KAS-6，或 IL-6-依賴型 RPMI 8226 骨髓瘤

細胞係以 0.1 mcg/ml(KAS-6)或 10 mcg/ml(ANBL-6 以及 RPMI 8226)的對照抗體[F105]，或 CNTO 328 被預-培養，繼而於 F105 或 CNTO 328 持續存在下以 DMSO 對照組或增加硼替佐米濃度地共-培養另一 24 小時。關於按序實驗，ANBL-6 細胞以 1)F105 或 CNTO 328 處理 24 小時繼而 F105 或 CNTO 328 與 5 nM 硼替佐米歷時另一 24 小時(抗體→硼替佐米)；2)F105 或 CNTO 328 以及 5 nM 硼替佐米同時地歷時 24 小時(抗體+硼替佐米)，或以 5 nM 硼替佐米歷時 12 小時隨後 F105 或 CNTO 328 達 24 小時(硼替佐米→抗體)。細胞活性係如上述被分析並相對於未處理細胞被測量為活性百分比。所有細胞係於含有 10% FBS 以及 1 ng/mL 的 IL-6 的 RPMI 1640 培養基中被處理。柱，五重複培養的平均值；帶，SEM。

ANBL-6 以及 KAS-6 細胞以 CNTO 328 的預-培養使硼替佐米的細胞毒殺變成可能，如透過相對於以對照組抗體 F105 預處理之細胞而言，由細胞活性的一顯著降低被證明(第 12A 及 B 圖)。CNTO 328 並未增強硼替佐米在 IL-6-依賴型骨髓瘤細胞株，RPMI 8226 中的活性(C 區)。當 ANBL-6 細胞以 CNTO 328 預處理隨後為硼替佐米或同時地以 CNTO 328 以及硼替佐米處理，CNTO 328 最為增強硼替佐米的細胞毒殺。另一方面，當細胞以硼替佐米預培養，CNTO 328 其具有低加成效果(D 區)。

C. 以 CNTO328 抑制 IL-6 傳訊的抑制增強了該 IL-6-依賴

型多發性骨髓瘤細胞株，ANBL-6 與 KAS-6 的硼替佐米-媒介細胞凋亡

ANBL-6 與 KAS-6 細胞以 10 mcg/ml(ANBL-6)或以 1 mcg/ml(KAS-6)的 CNTO 328 或對照組抗體[F105]培養歷時 8(ANBL-6)至 12(KAS-6)小時。細胞凋亡係採用一 ELISA-為基礎分析[其測量單-及寡-核小體的存在](Roche Applied Science, Indianapolis, IN)而被決定並以一相對於 DMSO 及 F105-處理對照組於細胞凋亡的倍數增加表示。細胞於含有 10% FBS 與 1 ng/mL IL-6 之 RPMI 1640 培養基中被處理(第 3A 及 B 圖，柱高代表三重複培養的平均；帶，SEM)。

相較於以不論何種藥物單獨地處理的細胞，以 CNTO 328 及硼替佐米處理的 ANBL-6 及 KAS-6 細胞造成細胞凋亡誘發增加。CNTO 328 無法使 IL-6-依賴型骨髓瘤細胞株 RPMI 8226 的細胞凋亡變成可能(數據未示出)。

D. CNTO-328 向下調節介白素-6 傳訊並減緩 ANBL-6 細胞中抗-細胞凋亡 MKP-1 及 HSP-70 的硼替佐米-媒介誘發 ANBL-6 細胞以 10 mcg/ml CNTO 328 或對照組抗體 F105 培養[於有或無硼替佐米的濃度增加]歷時 8 小時。細胞溶出物被製備並經免疫墨點分析。墨點被去除並供 HSC-70 探測以確保載入每一泳道的等量蛋白。密度測定法於 HSP-70 及 MKP-1 免疫墨點上被實施。

以 CNTO 328 處理的 ANBL-6 細胞造成 IL-6 傳訊的下游媒介者的遽量降低，如由磷酸-p42/44 MAPK 及磷酸

-STAT-3 水平降低所證明(第 4 圖)。尤其，硼替佐米的增加劑量也降低磷酸-STAT-3 及磷酸 p42/44 MAPK 之水平。這些數據指出：硼替佐米干擾 IL-6 傳訊(亦被報導於 Hideshima T et al, Oncogene 2003, 22:8386-93)。再者，CNTO 328 干擾 HSP-70 及 MKP-1 的硼替佐米-媒介誘發分別達 45 與 90%，其與轉錄活化磷酸-STAT-1 及過磷酸化 HSF-1 被降低的水平有關。

#### E. KNK437 增強 ANBL-6 及 HSF-1 +/+MEF 細胞的硼替佐米-媒介細胞凋亡

ANBL-6 或 MEF 細胞(對照組以及 HSF-1-/-)係以 DMSO 對照組或增加的硼替佐米與 KNK 437 濃度被培養歷時 12(ANBL-6)至 24(MEFs)小時。細胞凋亡係如上述被決定並以一相對於 DMSO-處理對照組以細胞凋亡的倍數增加表示。ANBL-6 細胞於含有 10% FBS 與 1 ng/mL IL-6 之 RPMI 1640 培養基中被處理(第 5 圖，柱高代表三重複培養的平均；帶，SEM)。

相較於對照組經處理細胞，以 KNK437 處理的 ANBL-6 細胞造成一顯著被增加的硼替佐米媒介細胞凋亡。相對於對照組 MEFs，硼替佐米-媒介細胞凋亡的提昇被減弱(第 6 圖)，暗示組合物被增加的活性是由於熱休克蛋白反應的向下調節。

#### CNTO328 與硼替佐米結合之結果摘要

該 IL-6 中和抗體 CNTO 328 以一劑量-與時間-依賴的方式降低多發性骨髓瘤細胞株 ANBL-6 及 KAS-6 的活性。

如經細胞活性與細胞凋亡的增加所證實，相較於一對照組抗體以及硼替佐米，以組合物 CNTO 328 處理的 ANBL-6 及 KAS-6 治療使硼替佐米的抗-骨髓瘤活性成為可能。當細胞接序地以硼替佐米繼而 CNTO 328 而非反向順序，該 CNTO 328 的抗-骨髓瘤效果或許由於硼替佐米向下調節 IL-6 傳訊的重要下游媒介者，或透過熱休克蛋白反應成員較早的向上調節而被降低。

以 CNTO 328 處理的 ANBL-6 與 KAS-6 細胞如磷酸-STAT-3 與磷酸-p42/44 MAPK 水平的一顯著降低顯示般造成 IL-6 傳訊的向下調節。硼替佐米亦以一濃度-依賴模式向下-調節磷酸-STAT-3 及磷酸-p42/44MAPK 水平。

CNTO 328 與硼替佐尼的組合物之經增加活性與抗-細胞凋亡 HSP-70 與 MKP-1 之被降低的硼替佐米-媒介累積相關。降低的 HSP-70 誘發與磷酸-STAT-3 及過磷酸化 HSF-1 之低水平相關。

以 KNK437 處理的 ANBL-6 與 KAS-6 細胞增強硼替佐米的細胞凋亡活性，部分是因為其干擾熱休克蛋白反應的誘發，如透過 HSF-1-陰性老鼠胚胎纖維母細胞中經增加的細胞凋亡效應係顯著地被減緩的事實所證明。

總括來說，上列數據提供一關於解釋硼替佐米/CNTO 328 組合物至臨床試驗中的原理且構思其它針對用以向下-調節對硼替佐米的抗性[諸如 HSP-70、MKP-1 的抑制劑]之



新穎策略。

### 【圖式簡單說明】

5 第 1 圖為顯示 CNTO328 的增加濃度對於經指定時間處理之多發性骨髓瘤細胞的效果之圖。

第 2A-D 圖為柱狀圖，代表指定細胞以抗體[F105]與不相干對照組 Mab 或 CNTO328 與指定濃度的硼替佐米培養之相對活性比率：A)ANBL-6 多發性骨髓瘤細胞以抗體預-培養且隨後以預定濃度的硼替佐米處理，B)KAS-6 多發性骨髓瘤細胞以抗體預-培養且隨後以預定濃度的硼替佐米處理，C)RPMI8226 IL6 獨立型骨髓瘤細胞，以及 D)ANBL-6 多發性骨髓瘤細胞同時以 CNTO 328 與硼替佐米處理。

15 第 3A-B 圖為柱狀圖，代表 IL6 依賴型細胞株 ANBL-6(A)以及 KAX-6 以抗體及硼替佐米組合物處理而 F105 作為對照組 Mab，所測量到的相對增加倍數。

第 4 圖為一 ANBL-6 細胞樣本經以 CNTO328 或對照組 Mab 處理以及增加濃度之硼替佐米處理後，偵測 HSC-70 與 MKP-1 的一蛋白凝膠西方墨點。

20 第 5 圖為一柱狀圖，代表 ANBL-6 以載體對照組 (DMSO)或兩種濃度的硼替佐米處理，所測量到的細胞凋亡相對增加倍數且提升熱休克蛋白減弱者 KNK437 的濃度。

第 6 圖為一柱狀圖，顯示 HSF-缺乏(-/-)或正常(+/+)

的 MEF 細胞以載體對照組(DMSO)或兩種濃度的硼替佐米處理，所測量到的細胞凋亡相對增加倍數且提升熱休克蛋白減弱者 KNK437 的濃度。

五、中文發明摘要：

5 本發明有關於一種治療一癌性疾病或情況，或一  
IL-6 相關聯疾病或情況的方法，於一有此療法需求的哺  
乳動物中，該方法包含共投藥一蛋白酶體抑制劑結合一  
IL-6 拮抗劑。

10 六、英文發明摘要：

15 The invention is directed to a method of treating a  
cancerous disorder or condition, or an IL-6 related  
disorder or condition, in a mammal in need of such  
treatment, which comprises co-administering a proteasome  
inhibitor in combination with an IL-6 antagonist.

## 十、申請專利範圍：

1. 一種用於治療一有此療法需要之哺乳動物的癌性疾病或情況之藥學組成物，其包含一蛋白酶體抑制劑結合一 IL-6 拮抗劑。
- 5 2. 如申請專利範圍第 1 項之藥學組成物，其中該 IL-6 拮抗劑為一抗體或其一片段。
3. 如申請專利範圍第 2 項之藥學組成物，其中該抗體為一單株抗體。
4. 如申請專利範圍第 2 項之藥學組成物，其中該抗體或片段結合至 IL-6。
- 10 5. 如申請專利範圍第 2 項之藥學組成物，其中該抗體或片段結合至 IL-6 受體。
6. 如申請專利範圍第 3 或 4 項之藥學組成物，其中該抗體片段為一 Fab、Fab'，或 F(ab')<sub>2</sub> 片段或其衍生物。
- 15 7. 如申請專利範圍第 3 項之藥學組成物，其中該單株抗體與單株抗體 cCLB8 競爭以結合人類 IL6。
8. 如申請專利範圍第 3 項之藥學組成物，其中該單株抗體係靜脈內投藥。
- 20 9. 如申請專利範圍第 3 項之藥學組成物，其中該單株抗體係以每公斤體重自 0.01mg/kg 至 12.0mg/kg 之量被投藥。
10. 如申請專利範圍第 3 項之藥學組成物，其中該單株抗體係以一球劑(bolus)劑量繼而該抗體之一輸液被

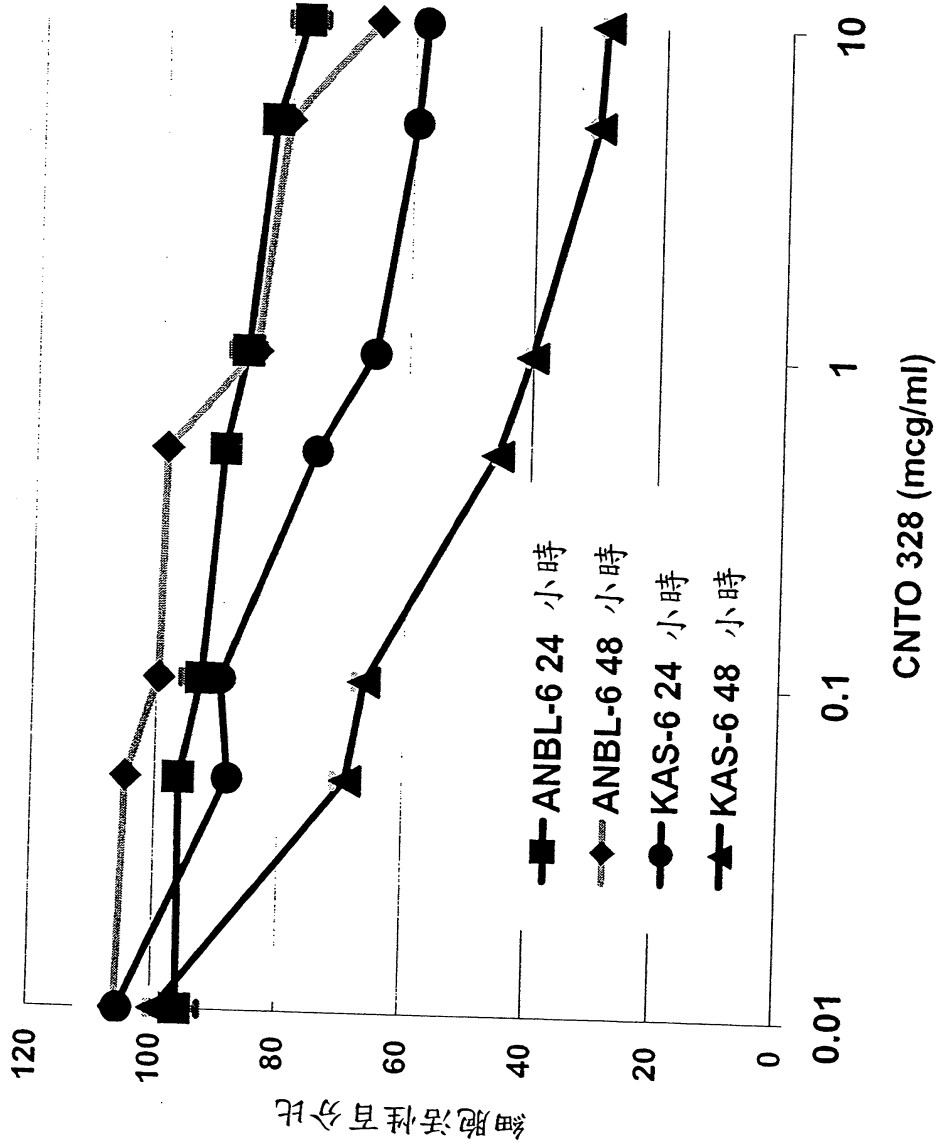
投藥。

11. 如申請專利範圍第 1 項之藥學組成物，其中該哺乳動物為一人類病患。
12. 如申請專利範圍第 1 項之藥學組成物，其中該蛋白酶體抑制劑係選自於下列群組：雙肽硼酸蛋白酶體抑制劑 硼替佐米 (bortezomib)、PS-519(1R-[1S,4R,5S]-1-(1-羥基-2-甲基丙基)-4-丙基-6-氧雜-2-吡雙環[3.2.1]庚烷-3,7-二酮；裂解-乳糖胱胺酸 (clasto-lactacystin) 貝他-內酯；乳糖胱胺酸，環氧聚醯胺黴素(epoxomicin)、CVT634(-5-甲氧基-1-二氫節酮-3-乙醯基-白胺酸基-D-白胺酸基-1-節胺)、TMC96((3-甲基丁醯基-L-蘇胺酸 N-(1-(2-(羥甲基)-環氧乙烷-2-羰基)-3-甲基丁-3-烯基)醯胺)、MG-115、CEP1612 以及 MG132。
13. 如申請專利範圍第 1 項之藥學組成物，其中該蛋白酶體抑制劑為雙肽硼酸蛋白酶體抑制劑 硼替佐米。
14. 如申請專利範圍第 1 項之藥學組成物，其中該癌性疾病或狀態為至少一選自於下列者：白血病、急性白血病、急性淋巴胚細胞白血病(ALL)、B 細胞、T 細胞或 FAB ALL、急性骨髓白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性淋巴球性白血病(CLL)、髮狀細胞白血病、骨髓發育不良症候群(myelodysplastic syndrome, MDS)、淋巴瘤、霍奇金氏病、惡性淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、巴氏淋巴瘤、多發性骨髓

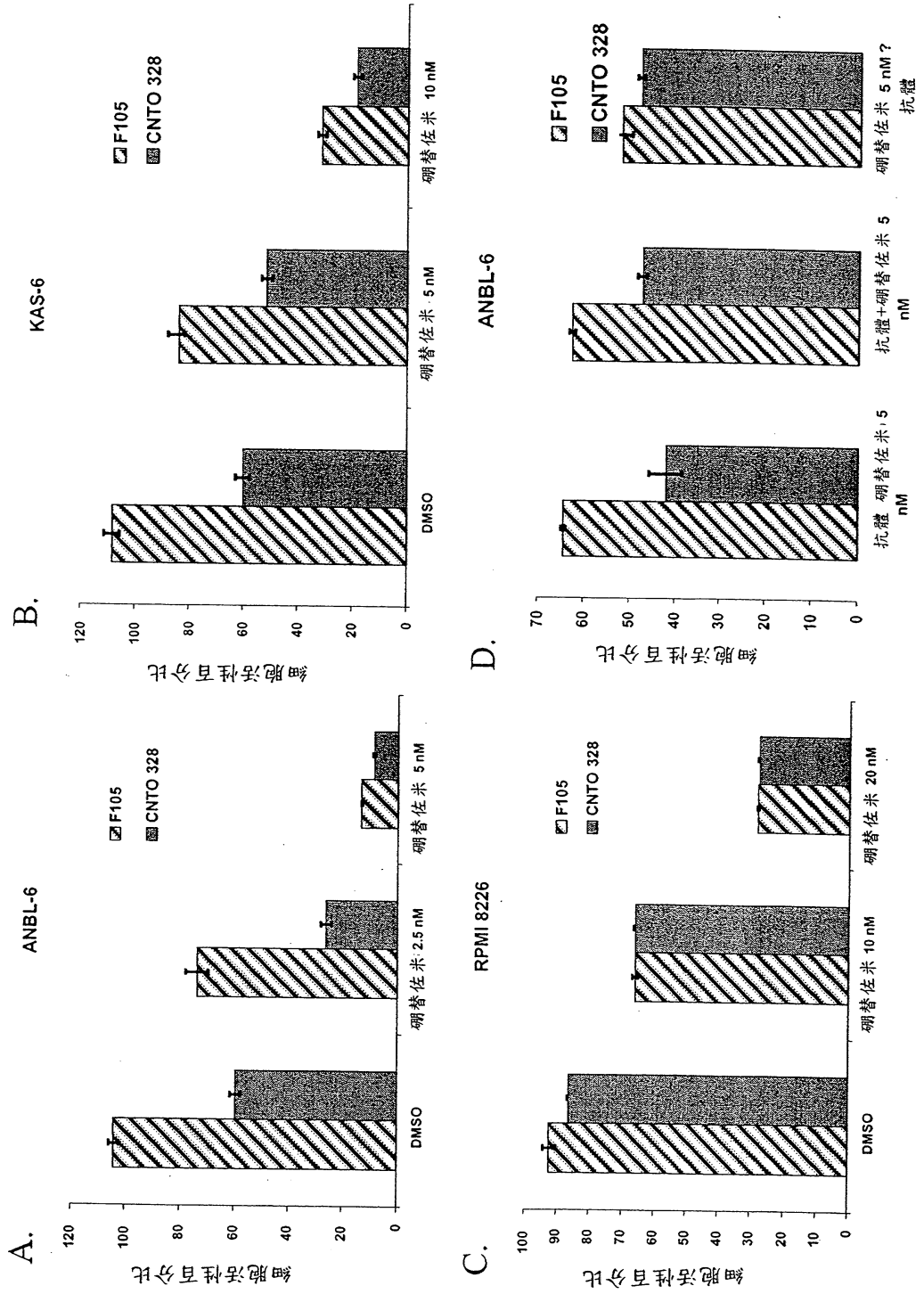
瘤、卡波西氏肉瘤、大腸直腸癌、胰臟癌、腎細胞癌、前列腺癌、鼻咽癌、惡性組織細胞病變、腫瘤伴生症候群/惡性高鈣血症、實性瘤、腺癌、肉瘤病，以及惡性黑色素瘤。

- 5        15. 如申請專利範圍第 1 項之藥學組成物，其中該抗-IL6 拮抗劑係接序地、連續地，或同時地隨著蛋白酶體抑制劑被給藥。
- 10       16. 一種用於抑制有其需要之一哺乳動物的腫瘤生長之藥學組成物，其包含結合一蛋白酶體抑制劑、一單株抗體或其片段，其以一有效於抑制該腫瘤生長之量經由膜結合受體防止 IL6 傳訊活化。
- 15       17. 一種用於防止一哺乳動物的轉移的藥學組成物，其包含結合一蛋白酶體抑制劑、一單株抗體或其一片段，其以一有效於抑制該哺乳動物之轉移之量經由膜結合受體防止 IL6 傳訊活化。
- 20       18. 如申請專利範圍第 3、16 或 17 項任一項的藥學組成物，其中該抗體為 cCLB8 或其一片段。
19. 一種治療一 IL-6 相關聯疾病或情況的藥學組成物，於一有此療法需求的哺乳動物，其包含結合一 IL-6 拮抗劑之蛋白酶體抑制劑。

第 1 圖

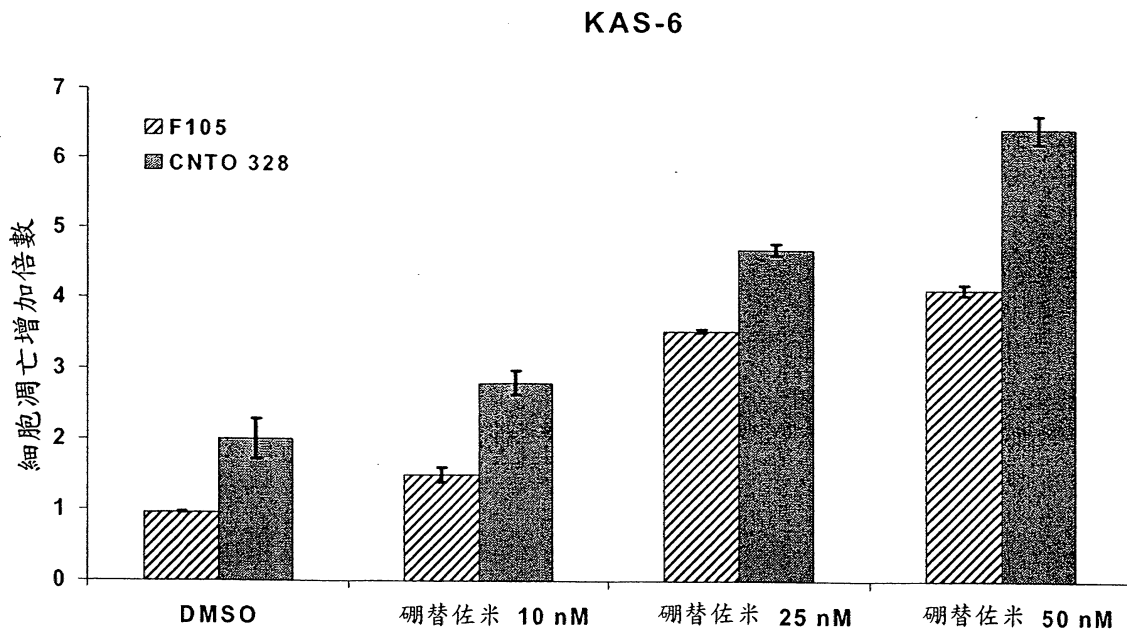
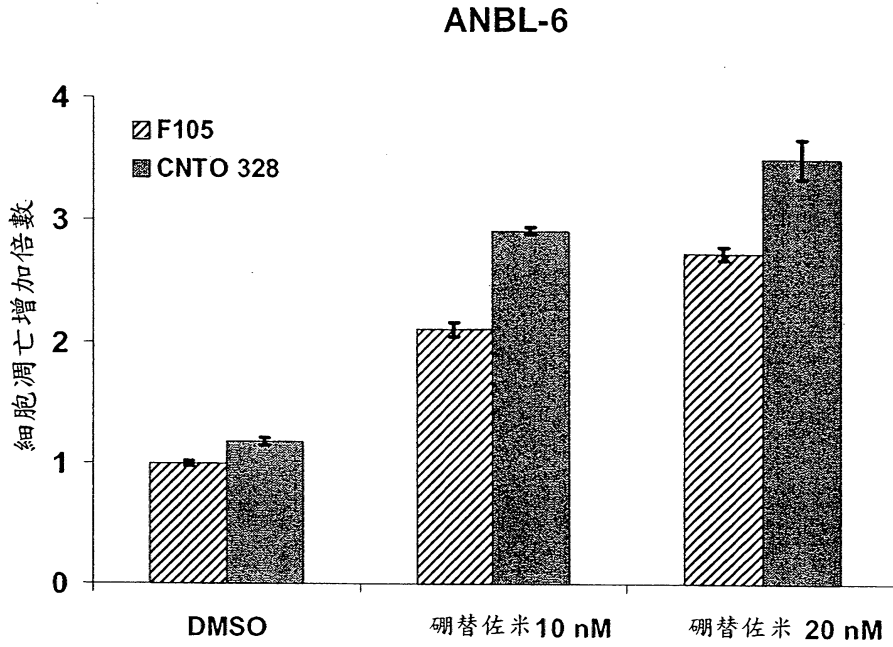


第 2 圖

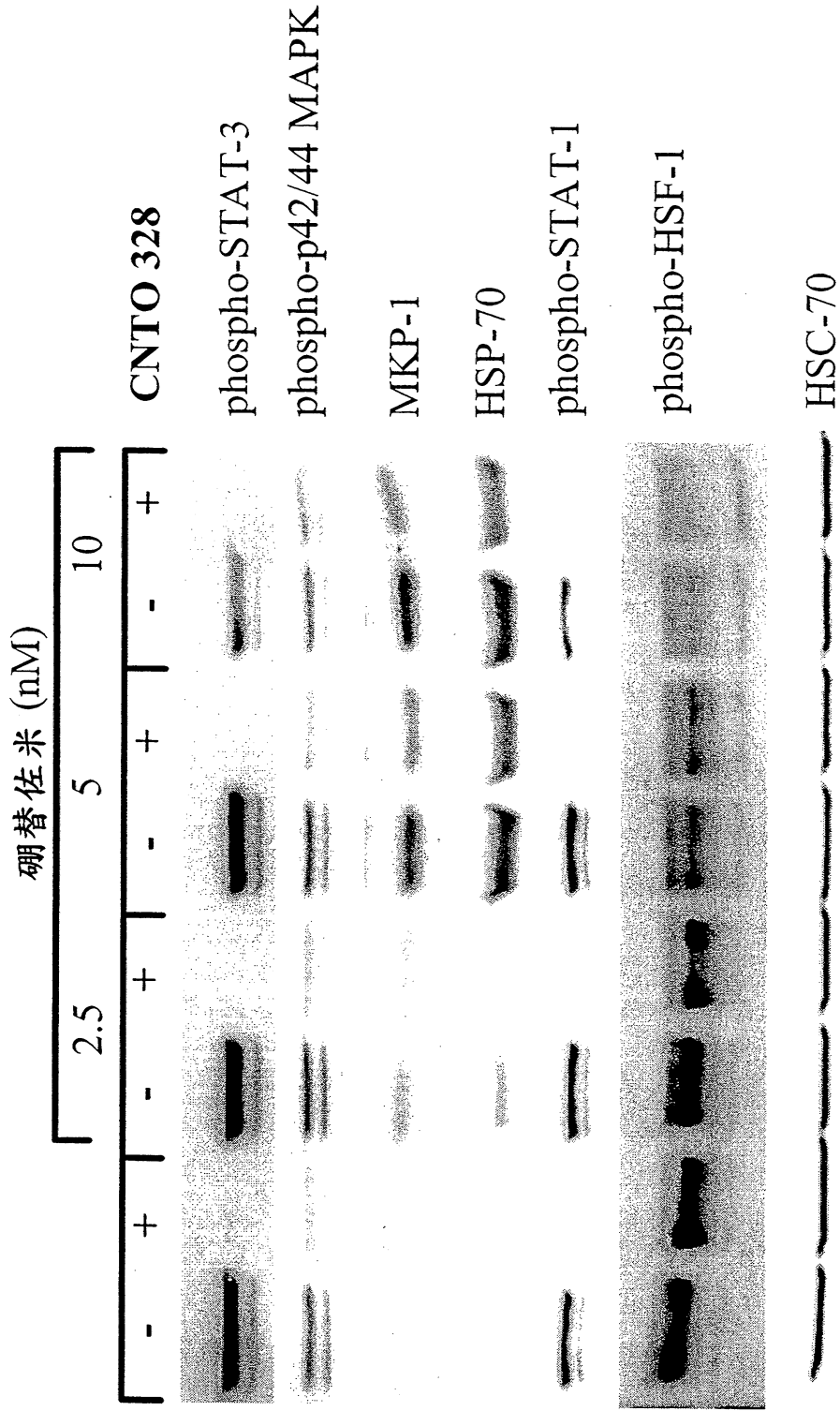




第 3A-B 圖

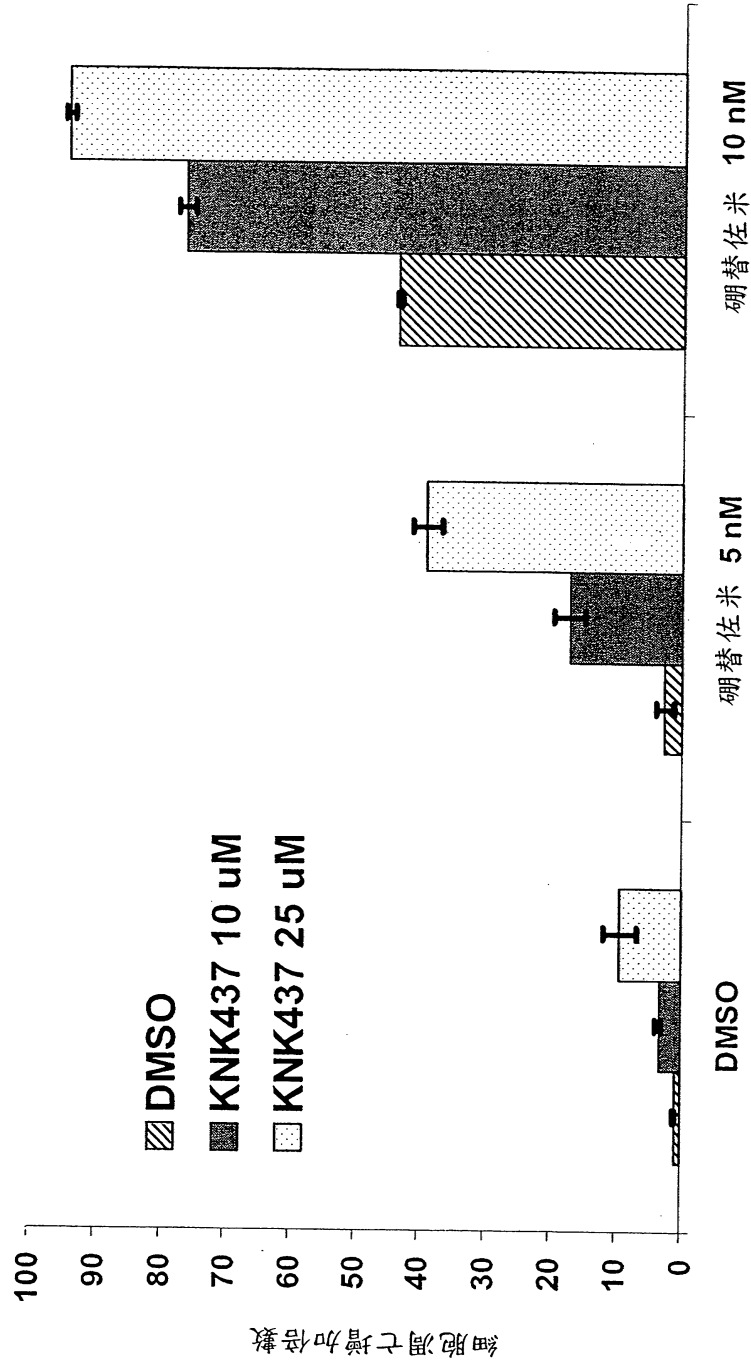


第 4 圖

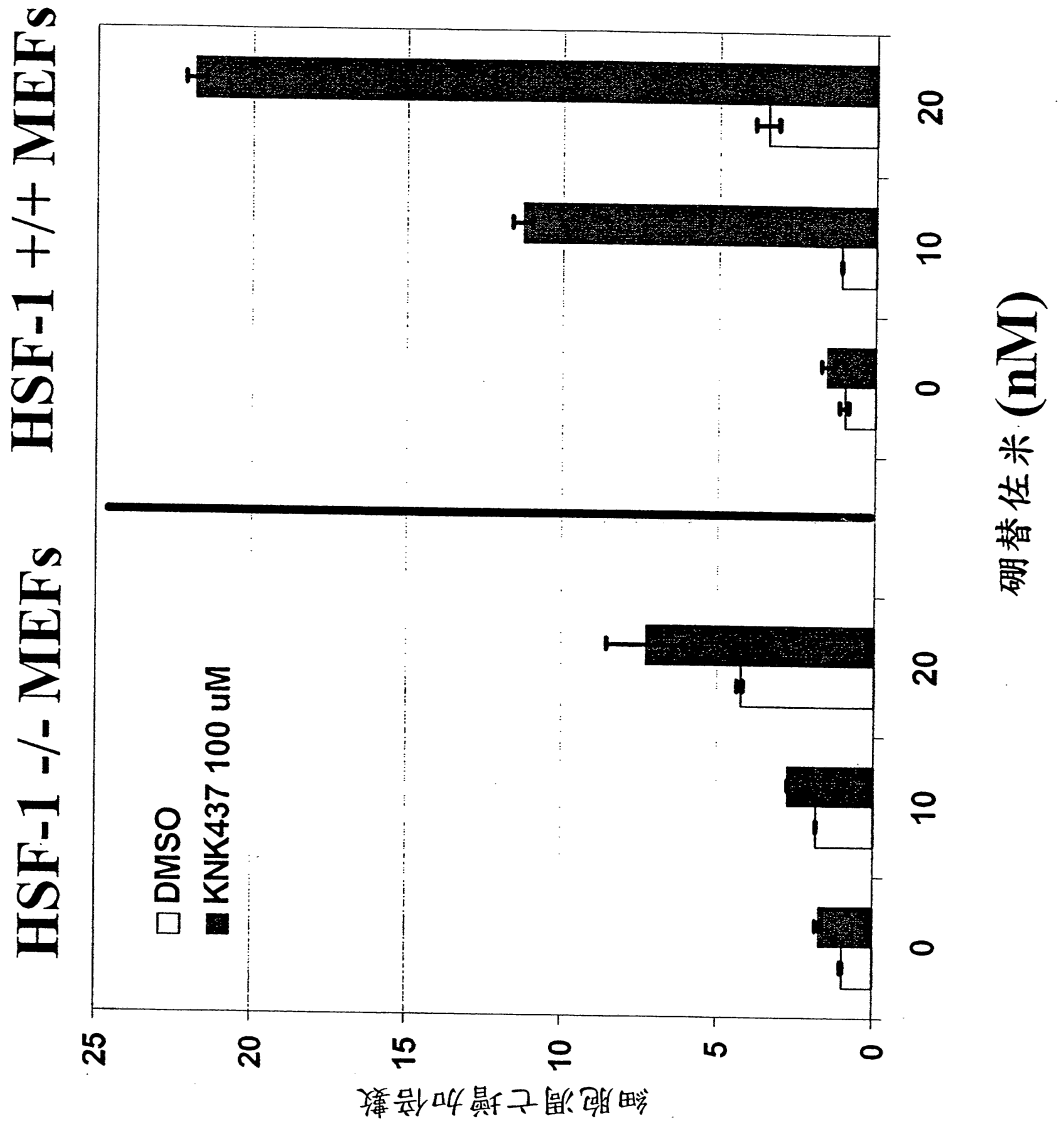


第 5 圖

ANBL-6



第 6 圖



**七、指定代表圖：**

(一)本案指定代表圖為：第 ( 1 ) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

5

**八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：**

無

15

20