

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680024037.1

[51] Int. Cl.

G12N 5/10 (2006.01)

G12N 15/12 (2006.01)

G12N 15/13 (2006.01)

G12N 15/63 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 4 月 22 日

[11] 公开号 CN 101415819A

[51] Int. Cl. (续)

G01N 33/567 (2006.01)

[22] 申请日 2006.4.28

[21] 申请号 200680024037.1

[30] 优先权

[32] 2005. 4. 29 [33] US [31] 60/676,498

[32] 2005. 5. 3 [33] US [31] 60/677,319

[86] 国际申请 PCT/US2006/016457 2006.4.28

[87] 国际公布 WO2006/119115 英 2006.11.9

[85] 进入国家阶段日期 2007.12.29

[71] 申请人 森托科尔公司

地址 美国宾夕法尼亚州

共同申请人 应用分子发展公司

[72] 发明人 Y·陈 D·加德纳

D·M·克赖特 M·W·拉克

B·梁 D·J·希利

X·-Y·R·宋

V·斯托贾诺韦-苏苏里

R·W·斯威特 S·H·谭

S·-J·吴 J·杨

D·M·马奎斯 E·M·史密斯

A·P·瓦塞罗特

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭文洁 梁 谋

权利要求书 13 页 说明书 114 页 序列表 28 页
附图 18 页

[54] 发明名称

抗 IL-6 抗体、组合物、方法及应用

[57] 摘要

一种抗 IL-6 抗体、包括编码至少一种抗 IL-6 抗体的分离的核酸、载体、宿主细胞、转基因动物或植物, 及其具有应用于诊断和/或治疗组合物、方法和装置的制备和使用的方法。

1.一种包含至少一个具有选自 SEQ ID NOS: 132-137 的氨基酸序列的互补性决定区的分离的 IL-6 抗体, 其中所述抗体与人 IL-6 或其片段结合。

2. 权利要求 1 的分离的抗体, 其中 X_1 为 A 或 G, X_2 为 S 或 R, X_3 为 H、I、S 或 Y, X_4 为 S 或 Y, X_5 为 S 或 F, X_6 为 F、L、M 或 T, X_7 为 N 或 E, X_8 为 A 或 T, X_9 为 M、C、S 或 Q, X_{10} 为 Q 或 C, X_{11} 为 T 或 Q, X_{12} 为 F、S 或 T, X_{13} 为 S 或 P, X_{14} 为 L 或 M, X_{15} 为 A 或 I, X_{16} 为 S 或 P, X_{17} 为 Y 或 W, X_{18} 为 T、E 或 Y, X_{19} 为 Y 或 F, X_{20} 为 P、S、D 或 Y, X_{21} 为 V 或 D, X_{22} 为 T 或 A, X_{23} 为 G 或 P, X_{24} 为 S、Y、T 或 N, 和 X_{25} 为 Y、T、F 或 I。

3. 一种包含至少一个互补性决定区的分离的人工程抗体, 其中所述抗体与人 IL-6 或其片段结合。

4. 一种分离的 IL-6 抗体, 包含至少一个具有选自 SEQ ID NOS: 95、99、103、118、122、126 和 130 的氨基酸序列的重链可变区和/或至少一个具有选自 SEQ ID NOS: 93、97、101、116、120、124 和 128 的氨基酸序列的轻链可变区。

5. 一种包含至少一个轻链可变区的分离的 IL-6 抗体, 所述轻链可变区包含至少一个选自如下的成员:

(a) 选自 SEQ ID NOS: 1、3、5、7、9、11、13 和 15 的轻链互补性决定区 1(CDRL1)氨基酸序列;

(b) 选自 SEQ ID NOS: 17、19、21、23、25 和 27 的 CDRL2 氨基酸序列; 和

(c) 选自 SEQ ID NOS: 29、31、33、35 和 138 的 CDRL3 氨基酸序列。

6. 一种包含至少一个重链可变区的分离的 IL-6 抗体, 所述重链可变区包含至少一个选自如下的成员:

(a) 选自 SEQ ID NOS: 37、39、41、43、45 和 47 的重链互补性决定区 1(CDRH1)氨基酸序列;

(b) 选自 SEQ ID NOS: 49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77 和 113 的 CDRH2 氨基酸序列; 和

(c) 选自 SEQ ID NOS: 79、81、83、85、87、89、91 和 114 的

CDRH3 氨基酸序列。

7. 一种包含权利要求 5 的轻链可变区和权利要求 6 的重链可变区的分离的 IL-6 抗体。

8. 权利要求 7 的分离的 IL-6 抗体, 进一步包含邻接于至少一个互补性决定区的至少一个人构架区。

9. 权利要求 8 的分离的 IL-6 抗体, 其中至少一个人构架区选自 SEQ ID NOS: 105-112。

10. 权利要求 5 的包含至少一个轻链可变区的分离的 IL-6 抗体, 所述轻链可变区包含:

(a) 选自 SEQ ID NOS: 1、3、5、7、9、11、13 和 15 的轻链互补性决定区 1(CDRL1)氨基酸序列;

(b) 选自 SEQ ID NOS: 17、19、21、23、25 和 27 的 CDRL2 氨基酸序列; 和(c) 选自 SEQ ID NOS: 29、31、33、35 和 138 的 CDRL3 氨基酸序列。

11. 权利要求 6 的包含至少一个重链可变区的分离的 IL-6 抗体, 所述重链可变区包含:

(a) 选自 SEQ ID NOS: 37、39、41、43、45 和 47 的重链互补性决定区 1(CDRH1)氨基酸序列;

(b) 选自 SEQ ID NOS: 49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77 和 113 的 CDRH2 氨基酸序列; 和

(c) 选自 SEQ ID NOS: 79、81、83、85、87、89、91 和 114 的 CDRH3 氨基酸序列。

12. 一种包含权利要求 10 的轻链可变区和权利要求 11 的重链可变区的分离的 IL-6 抗体。

13. 权利要求 12 的分离的抗体, 进一步包含在互补性决定区之间交错分布的 SEQ ID NO: 105 所示的人轻链构架区 1(FRL1)、SEQ ID NO: 106 所示的 FRL2、SEQ ID NO: 107 所示的 FRL3、SEQ ID NO: 108 所示的 FRL4, SEQ ID NO: 109 所示的人重链构架区 1(FRH1)、SEQ ID NO: 110 所示的 FRH2、SEQ ID NO: 111 所示的 FRH3 和 SEQ ID NO: 112 所示的 FRH4。

14. 权利要求 12 的分离的抗体, 其中轻链可变区包含:

(a) 选自 SEQ ID NOS: 1、3、5、7、9、11、13 和 15 的 CDRL1

氨基酸序列;

(b) 选自 SEQ ID NOS: 17、19、21、23、25 和 27 的 CDRL2 氨基酸序列; 和

(c) SEQ ID NO: 29 所示的 CDRL3 氨基酸序列。

15. 权利要求 12 的分离的抗体, 其中轻链可变区包含:

(a) 选自 SEQ ID NOS: 1、3、5、7、9、11、13 和 15 的 CDRL1 氨基酸序列;

(b) 选自 SEQ ID NOS: 17、19、21、23、25 和 27 的 CDRL2 氨基酸序列; 和

(c) SEQ ID NO: 35 所示的 CDRL3 氨基酸序列。

16. 权利要求 14 或 15 的分离的抗体, 进一步包含在 CDRLs 之间交错分布的 SEQ ID NO: 105 所示的人轻链构架区 1(FRL1)、SEQ ID NO: 106 所示的 FRL2、SEQ ID NO: 107 所示的 FRL3 和 SEQ ID NO: 108 所示的 FRL4。

17. 权利要求 12 的分离的抗体, 其中重链可变区包含:

(a) 选自 SEQ ID NOS: 37、39、41、43、45 和 47 的 CDRH1 氨基酸序列;

(b) 选自 SEQ ID NOS: 49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77 和 113 的 CDRH2 氨基酸序列; 和

(c) SEQ ID NO: 87 所示的 CDRH3 氨基酸序列。

18. 权利要求 12 的分离的抗体, 其中重链可变区包含:

(a) 选自 SEQ ID NOS: 37、39、41、43、45 和 47 的 CDRH1 氨基酸序列;

(b) 选自 SEQ ID NOS: 49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77 和 113 的 CDRH2 氨基酸序列; 和

(c) SEQ ID NO: 89 所示的 CDRH3 氨基酸序列。

19. 权利要求 12 的分离的抗体, 其中重链可变区包含:

(a) 选自 SEQ ID NOS: 37、39、41、43、45 和 47 的 CDRH1 氨基酸序列;

(b) 选自 SEQ ID NOS: 49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77 和 113 的 CDRH2 氨基酸序列; 和

(c) SEQ ID NO: 91 所示的 CDRH3 氨基酸序列。

20. 权利要求 12 的分离的抗体, 其中重链可变区包含:

(a) 选自 SEQ ID NOS:37、39、41、43、45 和 47 的 CDRH1 氨基酸序列;

(b) 选自 SEQ ID NOS:49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77 和 113 的 CDRH2 氨基酸序列; 和

(c) SEQ ID NO:114 所示的 CDRH3 氨基酸序列。

21. 根据权利要求 17-20 任一项的分离的抗体, 进一步包含在 CDRHs 之间交错分布的 SEQ ID NO: 109 所示的人重链构架区 1(FRH1)、SEQ ID NO: 110 所示的 FRH2、SEQ ID NO: 111 所示的 FRH3 和 SEQ ID NO: 112 所示的 FRH4。

22. 权利要求 12 的分离的抗体, 其中 CDRL1 包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列, CDRL2 包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列, CDRL3 包含 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列, CDRH1 包含 SEQ ID NO: 41 的氨基酸序列, CDRH2 包含 SEQ ID NO: 75 的氨基酸序列以及 CDRH3 包含 SEQ ID NO: 87 的氨基酸序列。

23. 权利要求 12 的分离的抗体, 其中 CDRL1 包含 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列, CDRL2 包含 SEQ ID NO: 21 的氨基酸序列, CDRL3 包含 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列, CDRH1 包含 SEQ ID NO: 41 的氨基酸序列, CDRH2 包含 SEQ ID NO: 75 的氨基酸序列以及 CDRH3 包含 SEQ ID NO: 89 的氨基酸序列。

24. 权利要求 12 的分离的抗体, 其中 CDRL1 包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列, CDRL2 包含 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列, CDRL3 包含 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列, CDRH1 包含 SEQ ID NO: 47 的氨基酸序列, CDRH2 包含 SEQ ID NO: 61 的氨基酸序列以及 CDRH3 包含 SEQ ID NO: 91 的氨基酸序列。

25. 权利要求 12 的分离的抗体, 其中 CDRL1 包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列, CDRL2 包含 SEQ ID NO: 27 的氨基酸序列, CDRL3 包含 SEQ ID NO: 35 的氨基酸序列, CDRH1 包含 SEQ ID NO: 47 的氨基酸序列, CDRH2 包含 SEQ ID NO: 57 的氨基酸序列以及 CDRH3 包含 SEQ ID NO: 91 的氨基酸序列。

26. 权利要求 12 的分离的抗体, 其中 CDRL1 包含 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列, CDRL2 包含 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列, CDRL3

包含 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列, CDRH1 包含 SEQ ID NO: 45 的氨基酸序列, CDRH2 包含 SEQ ID NO: 59 的氨基酸序列以及 CDRH3 包含 SEQ ID NO: 89 的氨基酸序列。

27. 权利要求 12 的分离的抗体, 其中 CDRL1 包含 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列, CDRL2 包含 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列, CDRL3 包含 SEQ ID NO: 29 的氨基酸序列, CDRH1 包含 SEQ ID NO: 45 的氨基酸序列, CDRH2 包含 SEQ ID NO: 77 的氨基酸序列以及 CDRH3 包含 SEQ ID NO: 87 的氨基酸序列。

28. 一种分离的 IL-6 抗体, 包含 SEQ ID NO: 3 所示的轻链互补性决定区 1(CDRL1)氨基酸序列, SEQ ID NO: 21 所示的 CDRL2 氨基酸序列, SEQ ID NO: 29 所示的 CDRL3 氨基酸序列, SEQ ID NO: 39 所示的重链互补性决定区 1(CDRH1)氨基酸序列, SEQ ID NO: 59 所示的 CDRH2 氨基酸序列和 SEQ ID NO: 89 所示的 CDRH3 氨基酸序列。

29. 一种包含至少一个轻链可变区的分离的 IL-6 抗体, 所述轻链可变区包含:

(a) SEQ ID NO: 132 所示的轻链互补性决定区 1(CDRL1)氨基酸序列;

(b) SEQ ID NO: 133 所示的 CDRL2 氨基酸序列; 和

(c) 选自 SEQ ID NO: 134 所示的 CDRL3 氨基酸序列, 其中 X_1 为 A 或 G, X_2 为 S 或 R, X_3 为 H、I、S 或 Y, X_4 为 S 或 Y, X_5 为 S 或 F, X_6 为 F、L、M 或 T, X_7 为 N 或 E, X_8 为 A 或 T, X_9 为 M、C、S 或 Q 和 X_{10} 为 Q 或 C。

30. 一种包含至少一个重链可变区的分离的 IL-6 抗体, 所述重链可变区包含:

(a) SEQ ID NO: 135 所示的重链互补性决定区 1(CDRH1)氨基酸序列;

(b) SEQ ID NO: 136 所示的 CDRH2 氨基酸序列; 和

(c) SEQ ID NO: 137 所示的 CDRH3 氨基酸序列, 其中 X_{11} 为 T 或 Q, X_{12} 为 F、S 或 T, X_{13} 为 S 或 P, X_{14} 为 L 或 M, X_{15} 为 A 或 I, X_{16} 为 S 或 P, X_{17} 为 Y 或 W, X_{18} 为 T、E 或 Y, X_{19} 为 Y 或 F, X_{20} 为 P、S、D 或 Y, X_{21} 为 V 或 D, X_{22} 为 T 或 A, X_{23} 为 G 或 P, X_{24} 为 S、Y、T 或 N 和 X_{25} 为 Y、T、F 或 I。

31. 一种包含权利要求 29 的轻链可变区和权利要求 30 的重链可变区的分离的 IL-6 抗体。

32. 根据权利要求 22-28 和 31 任一项的分离的 IL-6 抗体, 进一步包含在互补性决定区之间交错分布的 SEQ ID NO: 105 所示的人轻链构架区 1(FRL1)、SEQ ID NO: 106 所示的 FRL2、SEQ ID NO: 107 所示的 FRL3、SEQ ID NO: 108 所示的 FRL4、SEQ ID NO: 109 所示的人重链构架区 1(FRH1)、SEQ ID NO: 110 所示的 FRH2、SEQ ID NO: 111 所示的 FRH3 和 SEQ ID NO: 112 所示的 FRH4。

33. 一种包含至少一个轻链可变区的分离的 IL-6 抗体, 所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 105 所示的人轻链构架区 1(FRL1)、SEQ ID NO: 106 所示的 FRL2、SEQ ID NO: 107 所示的 FRL3 和 SEQ ID NO: 108 所示的 FRL4, 以及交错分布的 CDR 区, 该 CDR 区包含:

(a) 选自 SEQ ID NOS: 1、3、5、7、9、11、13 和 15 的 CDRL1 氨基酸序列;

(b) 选自 SEQ ID NOS: 17、19、21、23、25 和 27 的 CDRL2 氨基酸序列; 和

(c) 选自 SEQ ID NOS: 29、31、33、35 和 138 的 CDRL3 氨基酸序列。

34. 一种包含至少一个重链可变区的分离的 IL-6 抗体, 所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 109 所示的人重链构架区 1(FRH1)、SEQ ID NO: 110 所示的 FRH2、SEQ ID NO: 111 所示的 FRH3 和 SEQ ID NO: 112 所示的 FRH4, 以及交错分布的 CDR 区, 该 CDR 区包含:

(a) 选自 SEQ ID NOS: 37、39、41、43、45 和 47 的 CDRH1 氨基酸序列;

(b) 选自 SEQ ID NOS: 49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77 和 113 的 CDRH2 氨基酸序列; 和

(c) 选自 SEQ ID NOS: 79、81、83、85、87、89、91 和 114 的 CDRH3 氨基酸序列。

35. 一种包含权利要求 33 的轻链可变区和权利要求 34 的重链可变区的分离的 IL-6 抗体。

36. 一种与包含至少一个轻链可变区和至少一个重链可变区的至少一种分离的 IL-6 抗体竞争性结合 IL-6 的分离的人或人工程抗体,

所述分离的 IL-6 抗体包含选自 SEQ ID NOS: 93 和 95、SEQ ID NOS: 97 和 99、SEQ ID NOS: 101 和 103、SEQ ID NOS: 116 和 118、SEQ ID NOS: 120 和 122、SEQ ID NOS: 124 和 126 以及 SEQ ID NOS: 128 和 130 的轻链和重链可变区。

37. 一种与根据权利要求 12 的分离的 IL-6 抗体竞争性结合 IL-6 的分离的人或人工程抗体。

38. 一种竞争性结合包含 SEQ ID NO: 115 的第 168-184 位氨基酸的区域的分离的人或人工程抗体。

39. 权利要求 36-38 任一项的抗体，其中抗体为人工程化的。

40. 一种根据权利要求 1-39 任一项的 IL-6 抗体，其中所述抗体结合 IL-6，具有选自通过表面等离子共振或 Kinexa 法所测定的至少 10^{-9} M、至少 10^{-10} M、至少 10^{-11} M 和至少 10^{-12} M、至少 10^{-13} M、至少 10^{-14} M 以及至少 10^{-15} M 的至少一种亲和力。

41. 根据权利要求 1-40 任一项的 IL-6 抗体，其中所述抗体实质上调节至少一种 IL-6 多肽的至少一种活性。

42. 一种编码至少一种根据权利要求 1-40 任一项的分离的 IL-6 抗体的分离的核酸分子。

43. 一种包含根据权利要求 42 的分离的核酸分子的分离的核酸载体。

44. 一种包含根据权利要求 42 的分离的核酸分子的原核或真核宿主细胞。

45. 根据权利要求 44 的宿主细胞，其中所述宿主细胞为选自 COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、Hep G2、653、SP2/0、293、HeLa、骨髓瘤或淋巴瘤细胞或它们的任何衍生物、无限增殖化或转化细胞的至少一种。

46. 一种用于产生至少一种 IL-6 抗体的方法，包括在体外、体内或原位条件下翻译根据权利要求 42 的核酸分子，使得 IL-6 抗体以可检测或可回收的量表达。

47. 一种包含至少一种根据权利要求 1-40 任一项的分离的 IL-6 抗体和至少一种药学上可接受的载体或稀释剂的组合物。

48. 根据权利要求 47 的组合物，进一步包含选自可检测的标记或报道分子、TNF 拮抗剂、抗感染药、心血管(CV)系统药、中枢神经系

统(CNS)药、植物性神经系统(ANS)药、呼吸道药、胃肠(GI)道药、激素药、用于水或电解质平衡的药物、血液学药物、抗肿瘤剂、免疫调节药、眼药、耳药或鼻药、局部用药物、营养药、细胞因子和细胞因子拮抗剂的至少一种化合物或多肽。

49. 一种特异性结合至少一种根据权利要求 1-40 任一项的 IL-6 抗体的抗独特型抗体或片段。

50. 一种用于诊断或治疗细胞、组织、器官或动物中 IL-6 有关病症的方法,包括将包含有效量的至少一种根据权利要求 1-40 任一项的抗体的组合物与所述细胞、组织、器官或动物接触或施用于所述细胞、组织、器官或动物。

51. 根据权利要求 50 的方法,其中 IL-6 有关的病症选自类风湿性关节炎、骨关节炎、骨质溶解、整形外科植入物无菌性松动、全身性红斑狼疮、皮肤红斑狼疮、狼疮肾炎、II 型糖尿病、慢性阻塞性肺病和肾细胞癌。

52. 根据权利要求 50 的方法,其中所述有效量为约 0.001-50 mg/kg 所述细胞、组织、器官或动物。

53. 根据权利要求 50 的方法,其中通过选自肠胃外、皮下、肌肉、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸腔内、子宫内、膀胱内、损害部位内、推注、阴道、直肠、口腔含服、舌下、鼻内和经皮的至少一种方式进行所述接触或所述施用。

54. 根据权利要求 50 的方法,进一步包含在所述接触或施用之前、同时或之后施用至少一种包含有效量的至少一种化合物或多肽的组合物,所述至少一种化合物或多肽选自可检测的标记或报道分子、抗感染药、心血管(CV)系统药、中枢神经系统(CNS)药、植物性神经系统(ANS)药、呼吸道药、胃肠(GI)道药、激素药、用于水或电解质平衡的药物、血液学药物、抗肿瘤剂、免疫调节药、眼药、耳药或鼻药、局部用药物、营养药、细胞因子和细胞因子拮抗剂。

55. 一种包含根据权利要求 1-40 任一项的 IL-6 抗体的医疗装置,其中所述装置适合于通过选自肠胃外、皮下、肌肉、静脉内、关节内、

支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸腔内、子宫内、膀胱内、损害部位内、推注、阴道、直肠、口腔含服、舌下、鼻内和经皮的至少一种方式接触或施用所述 IL-6 抗体。

56. 一种用于人药物或诊断应用的产品，包含包装材料和含有溶液或冻干形式的根据权利要求 1-40 任一项的 IL-6 抗体的容器。

57. 权利要求 56 的产品，其中所述容器是肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸腔内、子宫内、膀胱内、损害部位内、推注、阴道、直肠、口腔含服、舌下、鼻内或经皮递药装置或系统的组成部分。

58. 一种产生根据权利要求 1-40 任一项的分离的 IL-6 抗体的方法，包括提供能以可回收量表达所述抗体的宿主细胞或转基因动物或转基因植物或植物细胞。

59. 一种根据权利要求 58 的方法产生的 IL-6 抗体。

60. 一种编码 IL-6 抗体的分离的核酸分子，包含至少一个轻链可变区，所述轻链可变区包含选自以下的至少一个成员：

(a) 选自 SEQ ED NOS: 2、4、6、8、10、12、14 和 16 的轻链互补性决定区 1(CDRL1)核苷酸序列；

(b) 选自 SEQ ID NOS: 18、20、22、24、26 和 28 的 CDRL2 核苷酸序列；和

(c) 选自 SEQ TD NOS: 30、32、34 和 36 的 CDRL3 核苷酸序列。

61. 一种编码 IL-6 抗体的分离的核酸分子，包含至少一个重链可变区，所述重链可变区包含选自以下的至少一个成员：

(a) 选自 SEQ ID NOS: 38、40、42、44、46 和 48 的重链互补性决定区 1(CDRH1)核苷酸序列；

(b) 选自 SEQ ID NOS: 50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76 和 78 的 CDRH2 核苷酸序列；和

(c) 选自 SEQ ID NOS: 80、82、84、86、88、90 和 92 的 CDRH3 核苷酸序列。

62. 一种编码包含权利要求 60 的轻链可变区核苷酸序列和权利要求 61 的重链可变区核苷酸序列的 IL-6 抗体的分离的核酸分子。

63. 一种编码 IL-6 抗体的分离的核酸分子，包含至少一个轻链可变区，所述轻链可变区包含至少一个选自如下的成员：

(a) 选自 SEQ ID NOS: 2、4、6、8、10、12、14 和 16 的轻链互补性决定区 1 (CDRL1)核苷酸序列；

(b) 选自 SEQ ID NOS: 18、20、22、24、26 和 28 的 CDRL2 核苷酸序列；和

(c) 选自 SEQ ID NOS: 30、32、34 和 36 的 CDRL3 核苷酸序列。

64. 一种编码 IL-6 抗体的分离的核酸分子，包含至少一个重链可变区，所述重链可变区包含：

(a) 选自 SEQ ID NOS: 38、40、42、44、46 和 48 的重链互补性决定区 1(CDRH1)核苷酸序列；

(b) 选自 SEQ ID NOS: 50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76 和 78 的 CDRH2 核苷酸序列；和

(c) 选自 SEQ ID NOS: 80、82、84、86、88、90 和 92 的 CDRH3 核苷酸序列。

65. 一种包含权利要求 63 的轻链可变区核苷酸序列和权利要求 64 的重链可变区核苷酸序列的编码 IL-6 抗体的分离的核酸分子。

66. 权利要求 65 的分离的核酸分子，进一步包含在互补性决定区核苷酸序列之间交错分布的编码 SEQ ID NO: 105 所示的人轻链构架区 1(FRL1)、SEQ ID NO: 106 所示的 FRL2、SEQ ID NO: 107 所示的 FRL3、SEQ ID NO: 108 所示的 FRL4、SEQ ID NO: 109 所示的人重链构架区 1(FRH1)、SEQ ID NO: 110 所示的 FRH2、SEQ ID NO: 111 所示的 FRH3 和 SEQ ID NO: 112 所示的 FRH4 的核苷酸序列。

67. 权利要求 63 的分离的核酸分子，其中轻链可变区包含：

(a) 选自 SEQ ID NOS: 2、4、6、8、10、12、14 和 16 的 CDRL1 核苷酸序列；

(b) 选自 SEQ ID NOS: 18、20、22、24、26 和 28 的 CDRL2 核苷酸序列；和

(c) SEQ ID NO:30 所示的 CDRL3 核苷酸序列。

68. 权利要求 63 的分离的核酸分子, 其中轻链可变区包含:

(a) 选自 SEQ ID NOS: 2、4、6、8、10、12、14 和 16 的 CDRL1 核苷酸序列;

(b) 选自 SEQ ID NOS: 18、20、22、24、26 和 28 的 CDRL2 核苷酸序列; 和

(c) SEQ ID NO:36 所示的 CDRL3 核苷酸序列。

69. 权利要求 64 的分离的核酸分子, 其中重链可变区包含:

(a) 选自 SEQ ID NOS: 38、40、42、44、46 和 48 的 CDRH1 核苷酸序列;

(b) 选自 SEQ ID NOS: 50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76 和 78 的 CDRH2 核苷酸序列; 和

(c) SEQ ID NO: 86 所示的 CDRH3 核苷酸序列。

70. 权利要求 64 的分离的核酸分子, 其中重链可变区包含:

(a) 选自 SEQ ID NOS: 38、40、42、44、46 和 48 的 CDRH1 核苷酸序列;

(b) 选自 SEQ ID NOS: 50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76 和 78 的 CDRH2 核苷酸序列; 和

(c) SEQ ID NO:88 所示的 CDRH3 核苷酸序列。

71. 权利要求 64 的分离的核酸分子, 其中重链可变区包含:

(a) 选自 SEQ ID NOS: 38、40、42、44、46 和 48 的 CDRH1 核苷酸序列;

(b) 选自 SEQ ID NOS: 50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76 和 78 的 CDRH2 核苷酸序列; 和

(c) SEQ ID NO: 90 所示的 CDRH3 核苷酸序列。

72. 权利要求 64 的分离的核酸分子, 其中重链可变区包含:

(a) 选自 SEQ ID NOS: 38、40、42、44、46 和 48 的 CDRH1 核苷酸序列;

(b) 选自 SEQ ID NOS: 50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76 和 78 的 CDRH2 核苷酸序列; 和

(c) SEQ ID NO: 92 所示的 CDRH3 核苷酸序列。

73. 权利要求 65 的分离的核酸分子, 包含 SEQ ID NO: 8 所示的

CDRL1 核苷酸序列, SEQ ID NO: 22 所示的 CDRL2 核苷酸序列, SEQ ID NO: 30 所示的 CDRL3 核苷酸序列, SEQ ID NO: 42 所示的 CDRH1 核苷酸序列, SEQ ID NO: 76 所示的 CDRH2 核苷酸序列和 SEQ ID NO: 88 所示的 CDRH3 核苷酸序列。

74. 权利要求 65 的分离的核酸分子, 包含 SEQ ID NO: 4 所示的 CDRL1 核苷酸序列, SEQ ID NO: 22 所示的 CDRL2 核苷酸序列, SEQ ID NO: 30 所示的 CDRL3 核苷酸序列, SEQ ID NO: 40 所示的 CDRH1 核苷酸序列, SEQ ID NO: 60 所示的 CDRH2 核苷酸序列和 SEQ ID NO: 90 所示的 CDRH3 核苷酸序列。

75. 权利要求 65 的分离的核酸分子, 包含 SEQ ID NO: 4 所示的 CDRL1 核苷酸序列, SEQ ID NO: 22 所示的 CDRL2 核苷酸序列, SEQ ID NO: 30 所示的 CDRL3 核苷酸序列, SEQ ID NO: 42 所示的 CDRH1 核苷酸序列, SEQ ID NO: 76 所示的 CDRH2 核苷酸序列和 SEQ ID NO: 90 所示的 CDRH3 核苷酸序列。

76. 权利要求 65 的分离的核酸分子, 包含 SEQ ID NO: 16 所示的 CDRL1 核苷酸序列, SEQ ID NO: 28 所示的 CDRL2 核苷酸序列, SEQ ID NO: 36 所示的 CDRL3 核苷酸序列, SEQ ID NO: 48 所示的 CDRH1 核苷酸序列, SEQ ID NO: 62 所示的 CDRH2 核苷酸序列和 SEQ ID NO: 92 所示的 CDRH3 核苷酸序列。

77. 权利要求 65 的分离的核酸分子, 包含 SEQ ID NO: 16 所示的 CDRL1 核苷酸序列, SEQ ID NO: 28 所示的 CDRL2 核苷酸序列, SEQ ID NO: 36 所示的 CDRL3 核苷酸序列, SEQ ID NO: 48 的 CDRH1 核苷酸序列, SEQ ID NO: 58 所示的 CDRH2 核苷酸序列和 SEQ ID NO: 92 所示的 CDRH3 核苷酸序列。

78. 权利要求 65 的分离的核酸分子, 包含 SEQ ID NO: 16 所示的 CDRL1 核苷酸序列, SEQ ID NO: 18 所示的 CDRL2 核苷酸序列, SEQ ID NO: 30 所示的 CDRL3 核苷酸序列, SEQ ID NO: 46 所示的 CDRH1 核苷酸序列, SEQ ID NO: 60 所示的 CDRH2 核苷酸序列和 SEQ ID NO: 90 所示的 CDRH3 核苷酸序列。

79. 权利要求 65 的分离的核酸分子, 包含 SEQ ID NO: 8 所示的 CDRL1 核苷酸序列, SEQ ID NO: 18 所示的 CDRL2 核苷酸序列, SEQ ID NO: 30 所示的 CDRL3 核苷酸序列, SEQ ID NO: 46 所示的 CDRH1

核苷酸序列, SEQ ID NO: 78 所示的 CDRH2 核苷酸序列和 SEQ ID NO: 88 所示的 CDRH3 核苷酸序列。

80. 一种根据权利要求 1-39 任一项的 IL-6 抗体, 其中所述抗体具有约 2.7×10^{-11} M 或更小的 EC_{50} 值。

81. 根据权利要求 80 的抗体, 其中 EC_{50} 值为约 2.7×10^{-12} 或更小。

82. 一种分离的 IL-6 抗体, 包含 SEQ ID NO:93 的轻链可变区氨基酸序列和 SEQ ID NO:95 的重链可变区氨基酸序列。

83. 一种分离的 IL-6 抗体, 包含 SEQ ID NO:97 的轻链可变区氨基酸序列和 SEQ ID NO:99 的重链可变区氨基酸序列。

84. 一种分离的 IL-6 抗体, 包含 SEQ ID NO:101 的轻链可变区氨基酸序列和 SEQ ID NO:103 的重链可变区氨基酸序列。

85. 一种分离的 IL-6 抗体, 包含 SEQ ID NO:116 的轻链可变区氨基酸序列和 SEQ ID NO:118 的重链可变区氨基酸序列。

86. 一种分离的 IL-6 抗体, 包含 SEQ ID NO:120 的轻链可变区氨基酸序列和 SEQ ID NO:122 的重链可变区氨基酸序列。

87. 一种分离的 IL-6 抗体, 包含 SEQ ID NO:124 的轻链可变区氨基酸序列和 SEQ ID NO:126 的重链可变区氨基酸序列。

88. 一种分离的 IL-6 抗体, 包含 SEQ ID NO:128 的轻链可变区氨基酸序列和 SEQ ID NO:130 的重链可变区氨基酸序列。

89. 一种分离的 IL-6 抗体, 包含为 SEQ ID NOS: 94、98、102、117、121、125 和 129 的核苷酸序列之一所编码的轻链可变区氨基酸序列和为 SEQ ID NOS: 96、100、104、119、123、127 和 131 的核苷酸序列之一所编码的重链可变区氨基酸序列。

90. 本申请所描述的任何发明。

抗 IL-6 抗体、组合物、方法及应用

发明领域

本发明涉及特异于至少一种 IL-6 蛋白或其片段的包括特定部分或变体的抗体，以及抗独特型抗体，和编码上述抗 IL-6 抗体的核酸，互补核酸，载体，宿主细胞，及其制备和使用方法，包括治疗配方、给药和装置。

发明背景

IL-6 是一种由多种细胞类型产生和分泌的多效性促炎症细胞因子，最值得注意的是抗原呈递细胞、T 和 B 细胞。IL-6 涉及不同活性，例如 B 细胞生长和分化、T 细胞活化、红细胞生成作用、破骨细胞活化、角质形成细胞生长、神经元生长以及肝细胞活化。IL-6 结合跨膜或可溶性 IL-6R 并通过为一些其他细胞因子所共有的 gp130 传导信号。

如在全身性红斑狼疮、多发性骨髓瘤以及淋巴增生性障碍中所显示的，IL-6 在 B 细胞异常中起重要作用。类似地，IL-6 还涉及诸如类风湿性关节炎和骨关节炎的自身免疫性和炎症疾病的发病机理。近来，间接证据暗示 IL-6 与慢性阻塞性肺病以及 II 型糖尿病中的胰岛素抵抗力有关。在免疫系统中 IL-6 具有促炎症反应和抗炎作用，表明该细胞因子可能在调节对疾病的生理反应中起主要作用。因此，在多种疾病领域靶向 IL-6 可潜在地提供治疗益处。

已在多种疾病中观察到 IL-6 产生的增加，包括：阿尔茨海默氏病、诸如类风湿性关节炎的自身免疫性疾病、炎症、心肌梗塞、佩吉特氏病、骨质疏松、实体瘤(肾细胞癌)、前列腺癌和膀胱癌、神经系统癌症以及 B-细胞恶性肿瘤(如 Castleman 氏病、某些淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病以及多发性骨髓瘤)。研究表明 IL-6 与许多种这些疾病的发病机理相关，特别是与癌症的发病机理相关，因此阻断 IL-6 应会转化为临床益处。

已开发了鼠、嵌合以及其他非人抗 IL-6 抗体；然而，它们可能受限于其效力、有效性，经常可能触发而不能接受的免疫应答(即免疫原

性)和/或需要高剂量(参见 Trikha 等, Clin. Can. Res. 9, 4653-4665, Oct. 2003, 在此并入作为参考)。例如, 含有非人部分的抗体常常在人中产生免疫应答。因此, 重复施用抗体并不适合作为治疗, 而且免疫复合物介导的从循环中清除抗体会减少抗体的效力/有效性。血清病和过敏反应是两种由于重复施用具有非人部分的抗体所引起的代表性病症。在这点上, 需要具有较小免疫原性可能性的, 即人更可容忍的, 更确切地说是更有效的抗 IL-6 抗体, 使得与先前所使用的抗 IL-6 抗体相比, 所需要的剂量更小。

发明概述

本发明提供了分离的人工程化抗 IL-6 抗体(也称为 IL-6 抗体)、免疫球蛋白、其片段、切割产物和其他特定部分和变体, 以及抗 IL-6 抗体组合物, IL-6 抗独特型抗体, 编码核酸或互补核酸、载体、宿主细胞、组合物、配方、装置、转基因动物、转基因植物以及制备和使用它们的方法。

在一方面, 本发明提供了包含与编码特定抗 IL-6 抗体或抗独特型抗体的多核苷酸互补或杂交的分离的核酸分子, 所述抗体包含至少一种其特定序列、结构域、部分或变体。本发明进一步提供了包含所述抗 IL-6 抗体核酸分子的重组载体、含有上述核酸和/或重组载体的宿主细胞, 以及制备和/或利用上述抗体、核酸、载体和/或宿主细胞的方法。

本发明还提供了至少一种用于在宿主细胞中表达至少一种抗 IL-6 抗体或 IL-6 抗独特型抗体的方法, 包括在其中至少一种抗 IL-6 抗体以可检测和/或可回收的量表达的条件下培养在此所述的宿主细胞。

本发明还提供了至少一种组合物, 包含(a) 分离的抗 IL-6 抗体编码核酸和/或在此所述的抗体; (b) 适合的和/或药学上可接受的载体或稀释剂。

本发明进一步提供了至少一种在细胞、组织、器官、动物或患者中和/或在本领域已知的和/或在此所述的有关病症之前、之后或期间, 用于施用治疗有效量以调节或治疗至少一种与 IL-6 有关的病症的抗 IL-6 抗体方法或组合物。

本发明还提供了至少一种递送治疗或预防有效量的根据本发明

的至少一种抗 IL-6 抗体的组合物、装置和/或方法。

本发明进一步提供了至少一种在细胞、组织、器官、动物或患者中和/或在本领域已知的和/或在此所述的有关病症之前、之后或期间，用于诊断至少一种与 IL-6 有关的病症的抗 IL-6 抗体方法或组合物。

本发明还提供了至少一种用于根据本发明的至少一种抗 IL-6 抗体诊断的递送组合物、装置和/或方法。

还提供了一种医疗装置，包含至少一种本发明的分离的哺乳动物抗 IL-6 抗体，其中该装置适合于接触或施用至少一种抗 IL-6 抗体、IL-6 抗独特型抗体、核酸分子、化合物、蛋白和/或组合物。

还提供的是一种用于人类药物或诊断应用的产品，包含包装材料和含有溶液或冻干形式的至少一种本发明的分离的抗 IL-6 抗体的容器。该产品可任选地具有作为递送装置或系统组成部分的容器。

本发明进一步提供了所有在此描述的发明。

附图简述

图 1 显示了人工程和嵌合抗 IL-6 抗体与 IL-6/IL-6R 复合物的结合。

图 2 显示了本发明的人工程化抗 IL-6 抗体的结合表位。

图 3 显示了通过 ELISA 所测定的人工程化抗 IL-6 抗体抑制 IL-6 刺激的 U937 细胞的 MCP-1 分泌。

图 4 显示了通过 ELISA 所测定的人工程化抗 IL-6 抗体抑制 IL-6 和 IL-1 β 刺激的 HepG2 细胞的 SAA 分泌。

图 5A 和 5B 显示了通过经由凝胶电泳所示的蛋白质印迹分析所测定的人工程化抗 IL-6 抗体阻断 IL-6 介导的 stat3 磷酸化。

图 6 显示了人工程和嵌合抗 IL-6 抗体抑制 Balb/C 小鼠中人 IL-6 诱导的 SAA 产生。

图 7 显示了在 NZB/W F1 小鼠中抗 IL-6 mAb 抑制抗 dsDNA 自身抗体产生。

图 8A 显示了在存在或不存在人工程化抗 IL-6 抗体下，IL-6 对胰岛素诱导的 Akt 磷酸化的影响。

图 8B 显示了在存在或不存在人工程化抗 IL-6 抗体下，IL-6 对胰

胰岛素诱导的 Akt 磷酸化的影响的蛋白质印迹分析。

图 9 显示了实施例 3 中所述的 ELISA 结合测定结果。

图 10 显示了实施例 3 中所述的使用 IL-6 依赖细胞系的抗增殖测定结果。

图 11A 显示了在用胰岛素、IL-6 蛋白和抗 IL-6 抗体处理的大鼠肝细胞中 PI3 激酶活化。

图 11B 显示了在大鼠肝细胞中用于研究 PI3 激酶活化的对照。

图 12A 显示了 IL-6 对与胰岛素诱导的 IR 磷酸化有关的大鼠肝细胞中信号传导的影响。

图 12B 显示了 IL-6 对与胰岛素诱导的 Akt 磷酸化有关的大鼠肝细胞中信号传导的影响。

图 13A 显示了在用抗 IL-6 抗体处理后 DIO 小鼠中的葡萄糖水平。

图 13B 显示了在用抗 IL-6 抗体处理后 DIO 小鼠中的胰岛素水平。

图 13C 显示了在用抗 IL-6 抗体处理后 DIO 小鼠中的稳态模型评价(HOMA)指数。

图 14A-F 显示了在用抗 IL-6 抗体处理前后的脂质水平。

图 15 显示了对于腹膜内葡萄糖耐量试验(ipGTT)，用抗 IL-6 mAb 处理小鼠的时间表。

发明详述

本发明提供了分离的、重组的和/或合成的抗 IL-6 人工程抗体和针对其的 IL-6 抗独特型抗体，以及组合物和包含至少一种编码至少一种抗 IL-6 抗体或抗独特型抗体的多核苷酸的编码核酸分子。本发明进一步包括，但不限于制备和使用上述核酸和抗体以及抗独特型抗体的方法，包括诊断和治疗组合物、方法和装置。

在此使用的“抗 IL-6 抗体”、“IL-6 抗体”、“抗 IL-6 抗体部分”或“抗 IL-6 抗体片段”和/或“抗 IL-6 抗体变体”等包括任何含有包含至少一部分的免疫球蛋白分子的分子的蛋白或肽，例如但不限于重链或轻链的至少一个互补性决定区(CDR)或其配体结合部分、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、构架区、或其任何部分、或 IL-6 受体或结合蛋白的至少一部分，其可掺入本发明的抗体中。这样的抗

体任选地进一步影响特异性配体，例如但不限于这样的抗体在体外、原位和/或体内调节、减少、增加、对抗、激动、减轻、缓解、阻断、抑制、消除和/或干扰至少一种 IL-6 活性或结合、或 IL-6 受体活性或结合的情况。作为非限制性的例子，本发明适合的抗 IL-6 抗体、特定部分或变体可结合至少一种 IL-6 分子或其特定部分、变体或结构域。适合的抗 IL-6 抗体、特定部分或变体还可任选地影响至少一种 IL-6 活性或功能，例如但不限于 RNA、DNA 或蛋白合成，IL-6 释放，IL-6 受体信号传导，膜 IL-6 切割，IL-6 活性，IL-6 产生和/或合成。

术语“抗体”进一步意在包括抗体、消化片段、特定部分及其变体，包括抗体模拟物或包含模拟抗体或其特定片段或部分的结构和/或功能的抗体部分，包括单链抗体及其片段。功能性片段包括结合哺乳动物 IL-6 的抗原结合片段。例如，能结合 IL-6 或其部分的抗体片段包括但不限于为本发明所涵盖的 Fab(如通过木瓜蛋白酶消化的)、Fab'(如通过胃蛋白酶消化并部分还原的)和 F(ab')₂(如通过胃蛋白酶消化的)、facb(如通过纤溶酶消化的)、pFc'(如通过胃蛋白酶或纤溶酶消化的)、Fd(如通过胃蛋白酶消化、部分还原及重聚合的)、Fv 或 scFv(如通过分子生物学技术产生的)片段(参见如 Colligan, Immunology, 同上)。

可利用本领域已知的和/或在此所述的酶切割、合成或重组技术产生上述片段。还可利用其中已将一个或多个终止密码子导入天然终止位点上游的抗体基因产生多种截短形式的抗体。例如，可设计编码 F(ab')₂ 重链部分的组合基因以包括编码 CH₁ 区和/或重链铰链区的 DNA 序列。可通过常规技术化学交联不同的抗体部分，或可利用基因工程技术将不同的抗体部分制备为邻接的蛋白。

在此使用的术语“人工程抗体”是一种具有至少完整的人构架区和恒定区(C_L、C_H 区(如 C_{H1}、C_{H2}、C_{H3})和铰链区)以及来源于抗原结合抗体的 CDRs 的抗体。完整的人构架区包含相应于人种系序列以及具有体细胞突变的序列的构架区。CDRs 可来源于一种或多种在上下文任何抗体构架区中结合 IL-6 的 CDRs。例如，本发明的人工程抗体的 CDRs 可来源于在上下文小鼠抗体构架区中结合 IL-6 的 CDRs，接着被工程化以在上下文完整的人构架区中结合 IL-6。通常，人工程抗体在人中是基本上无免疫原性的。

类似地，命名为灵长类动物(猴、狒狒、黑猩猩等)、啮齿动物(小鼠、大鼠、兔、豚鼠、仓鼠等)以及其他哺乳动物的抗体指上述种、亚属、属、亚科和科特异性抗体。此外，嵌合抗体可包括任何上述的组合。相对于未修饰的抗体，这样的改变或变化任选地且优选地保留或减少人或物种中的免疫原性。因此，人工程抗体不同于嵌合或人源化抗体。

要指出的是可通过能表达功能重排的人或人工程免疫球蛋白(如重链和/或轻链)基因的非人动物或原核或真核细胞产生人工程抗体。此外，当人工程抗体为单链抗体时，其可包含天然人抗体中不存在的连接肽。例如，Fv 可包含连接肽，如连接重链可变区和轻链可变区的2个-约8个甘氨酸或其他氨基酸残基。这样的连接肽被认为是人来源的。

还可使用单克隆、优选人、人工程或人源化抗体的双特异性、异种特异性、异种偶联(heteroconjugate)或类似的抗体，这些抗体具有针对至少两种不同抗原的结合特异性的抗体。此际，一种结合特异性针对至少一种 IL-6 蛋白，而另一种结合特异性则针对任何其他抗原。用于制备双特异性抗体的方法是本领域已知的。传统上，基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达重组产生双特异性抗体，其中两条重链具有不同特异性(Milstein 和 Cuello, Nature 305:537 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机组合，这些杂交瘤(细胞杂交瘤(quadromas))产生可能的 10 种不同抗体分子的混合物，仅有一种混合物具有正确的双特异性结构。通常通过亲和层析步骤进行正确分子的纯化。类似的方法披露于如 WO 93/08829, US 专利号 6210668、6193967、6132992、6106833、6060285、6037453、6010902、5989530、5959084、5959083、5932448、5833985、5821333、5807706、5643759、5601819、5582996、5496549、4676980, WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Traunecker 等, EMBO J. 10:3655 (1991), Suresh 等, Methods in Enzymology 121:210 (1986)中，各自在此完全并入作为参考。

用于本发明方法和组合物中的抗 IL-6 抗体可任选地具有与 IL-6 高亲和力结合以及，任选并优选地具有低毒性的特性。特别是，其中单个组分例如可变区、恒定区和构架区，单独地和/或共同地、任选并优选地具有低免疫原性的本发明的抗体、特定片段或变体在本发明中

是有用的。可用于本发明中的抗体任选地具有持续治疗患者一段时间有着可测量的症状缓解以及低和/或可接受的毒性的能力的特性。低或可接受的免疫原性和/或高亲和力以及其他适合的特性,可有助于所获得的治疗结果。在此“低免疫原性”定义为在用抗 IL-6 抗体治疗的患者中,对于抗 IL-6 抗体,可滴定水平的抗体的发生率存在于少于 25% 的在治疗期间对于推荐的病程使用推荐的剂量治疗的患者中,优选地存在于少于 10% 的患者中。

本发明分离的核酸可用于产生至少一种抗 IL-6 抗体或其特定变体,所述至少一种抗 IL-6 抗体或其特定变体能用于在细胞、组织、器官或动物(包括哺乳动物和人)中度量或起作用以对至少一种 IL-6 病症,选自但不限于至少一种免疫病症或疾病,心血管病症或疾病,传染性、恶性和/或神经病症或疾病,或其他已知的或特定的 IL-6 有关病症起诊断、监测、调节、治疗、缓解、帮助预防发病率或减轻症状。

这样的方法可包括施用有效量的包含至少一种抗 IL-6 抗体的组合物或药物组合物于在症状、效应或机制中需要这样的调节、治疗、缓解、预防或减轻细胞、组织、器官、动物或患者。有效量可包括约 0.001-500 mg/kg/单次(如推注)、多次或连续施用的量,或达到 0.01-5000 $\mu\text{g/ml}$ 血清浓度/单次、多次或连续施用的血清浓度,或当使用已知方法施用并测定时,其中任何有效范围或值,所述方法为在此所述的或相关领域已知的方法。

本发明的抗体—产生和形成

可任选地通过本领域众所周知的细胞系、混合的细胞系、无限增殖化细胞或无限增殖化细胞的克隆种群产生至少一种本发明的抗 IL-6 抗体。参见如 Ausubel, 等, 编,

Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow 和 Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, 等, 编, Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan 等, Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001)。

可产生针对适当的免疫原性抗原例如分离的 IL-6 蛋白和/或其部分(包括合成分子, 例如合成肽)的特异于人 IL-6 蛋白或其片段的人工

程抗体。可类似地产生其他特异的或一般的哺乳动物抗体。可利用任何适合的技术制备免疫原性抗原以及产生单克隆抗体。

在一种方法中, 通过将适合的无限增殖化细胞系(如骨髓瘤细胞系, 例如但不限于 Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, L243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MA1, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHL, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMALWA, NEURO 2A 等, 或杂合骨髓瘤(heteromyelomas), 其融合产物, 或任何衍生于其中的细胞或融合细胞, 或本领域已知的任何其他适合的细胞系)(参见如 www.atcc.org, www.lifetech.com 等)与抗体产生细胞融合制备杂交瘤, 所述抗体产生细胞例如但不限于分离的或克隆的脾、外周血、淋巴、扁桃体细胞或其他免疫细胞或含有 B 细胞的细胞, 或任何其他作为内源或异源核酸表达重链或轻链恒定区或可变区或构架区或 CDR 序列的细胞, 所述内源或异源核酸如重组或内源的病毒、细菌、藻类、原核生物、两栖动物、昆虫、爬行动物、鱼类、哺乳动物、啮齿动物、马、羊(ovine)、山羊、绵羊(sheep)、灵长类动物、真核动物基因组 DNA、cDNA、rDNA、线粒体 DNA 或 RNA、叶绿体 DNA 或 RNA、hnRNA、mRNA、tRNA、单链体、双链体或三链体、杂合体等或任何它们的组合。参见如 Ausubel, 同上和 Colligan, Immunology, 同上, 第 2 章, 在此完全并入作为参考。

抗体产生细胞还可获得自业已用目的抗原免疫的人或其他适合的动物的外周血或优选地获得自脾或淋巴结。任何其他适合的宿主细胞也可用于表达编码本发明的抗体、其特定片段或变体的异源或内源核酸。可利用选择性培养条件或其他适合的已知方法分离并通过有限稀释或细胞分选或其他已知方法克隆融合细胞(杂交瘤)或重组细胞。可通过适合的测定法(如 ELISA)选择产生具有期望特异性的抗体的细胞。

还可使用用于工程化或人源化非人或人抗体的方法并为本领域众所周知。人源化或工程抗体可具有一个或多个非人源氨基酸, 如但不限于小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物或其他哺乳动物。这些非人氨基酸残基为通常称为“输入(import)”残基的残基所取代, 其通常获得自己知人序列的“输入”可变区、恒定区或其他区域。

已知的人 Ig 序列披露于, 如 www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php; www.kabatdatabase.com/top.html; [ftp.ncbi.nlm.nih.gov/repository/kabat](ftp://ncbi.nlm.nih.gov/repository/kabat); www.sciquest.com; www.abcam.com; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.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.appliedbiosystems.com; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody; www.m.chime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com; www.cancerresearchuk.org; www.biotech.ufl.edu; www.isac-net.org; baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu; www.mrc-cpe.cam.ac.uk; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; http://www.bioinf.org.uk/abs; antibody.bath.ac.uk; www.unizh.ch; www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/caewg/caewg.html; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.jerini.de; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983), 各自在此完全并入作为参考。

这样的输入序列可用于降低免疫原性或减少、增加或改变结合、亲和力、结合速率(on-rate)、解离速率(off-rate)、亲合力、特异性、半衰期或任何其他本领域已知的适合的特性。一般而言, CDR 残基是直接或最实质地涉及影响抗原结合。因此, 当可变区或恒定区的非人序列可为人或其他氨基酸所取代时, 要保持部分或全部的非人或人 CDR 序列。

抗体还可任选地被人源化或工程化或人抗体工程化, 同时保留对抗原的高亲和力和其他有利的生物学特性。为实现该目的, 可任选地通过利用亲本、工程化和人源化序列的三维模型, 分析亲本序列和不同概念上的人源化和工程化产物的方法制备人源化(或人)或工程抗体。三维免疫球蛋白模型是通常可获得的且为本领域技术人员所熟

悉。可获得图解并显示所选择的候选免疫球蛋白序列的大概三维构象结构的计算机程序。对这些显示内容的检查使得对残基在候选免疫球蛋白序列功能中可能的作用的分析，即残基影响候选免疫球蛋白与其抗原结合的能力的分析得以进行。这样，可由共有和输入序列选择并组合构架区(FR)残基，以致获得期望的抗体特性，例如增加的靶抗原亲和力。

此外，本发明的人工程 IL-6 抗体可包含人种系轻链构架区。在特定的实施方案中，轻链种系序列选自人 VK 序列，包括但不限于

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, 和 O8。

在一些实施方案中，轻链人种系构架区选自

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, 和 V5-6。

参见 PCT WO 2005/005604 对不同种系序列的描述。

在其他的实施方案中，本发明的人工程 IL-6 抗体可包含人种系重链构架区。在特定的实施方案中，重链人种系构架区选自：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, 和 VH7-81。参见 PCT WO 2005/005604 对不同种系序列的描述。

在特定的实施方案中，轻链可变区和/或重链可变区包含构架区或至少一部分的构架区(如含有 2 或 3 个亚区，例如 FR2 和 FR3)。在一些实施方案中，至少 FRL1、FRL2、FRL3 或 FRL4 完全是人的。在其他的实施方案中，至少 FRH1、FRH2、FRH3 或 FRH4 完全是人的。在某些实施方案中，至少 FRL1、FRL2、FRL3 或 FRL4 是种系序列(如人种系)或包含用于特定构架区的人共有序列(易于获得自上述已知的人 Ig 序列的来源处)。在其他的实施方案中，至少 FRH1、FRH2、FRH3 或 FRH4 是种系序列(如人种系)或包含用于特定构架区的人共有序列。在优选的实施方案中，构架区是人构架区(如下表 13 和 14 中所示

的人构架区)。在某些实施方案中,构架区包含 SEQ ID NOS: 105、106、107、108、109、110、111、112 或其组合。

可使用任何已知的方法进行本发明抗体的人源化或工程化,例如但不限于如下描述的那些方法:

Winter (Jones 等, *Nature* 321:522 (1986); Riechmann 等, *Nature* 332:323 (1988); Verhoeven 等, *Science* 239:1534 (1988)), Sims 等, *J. Immunol.* 151: 2296 (1993); Chothia 和 Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901 (1987), Carter 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:4285 (1992); Presta 等, *J. Immunol.* 151:2623 (1993),
US 专利号: 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, EP 229246, 包括其中所引用的参考文献在内, 各自在此完全并入作为参考。

在一些实施方案中, 抗体包含改变的(如突变的)Fc 区。例如, 在某些实施方案中, 已改变 Fc 区以减少或增加抗体效应子功能。在某些实施方案中, Fc 区是选自 IgM、IgA、IgG、IgE 的同种型, 或其他同种型。

择一地或此外, 可利用改变 IL-6 结合分子 Fc 区的 C1q 结合和/或依赖补体的细胞毒性(CDC)功能的具有一个或多个额外氨基酸修饰的组合氨基酸修饰。起始具体目的多肽可以是结合 C1q 并展示依赖补体的细胞毒性的多肽。可对具有预先存在的 C1q 结合活性、任选地进一步具有介导 CDC 能力的多肽进行修饰, 使得这些活性的一种或两种得以增强。改变 C1q 和/或调节其补体依赖细胞毒性功能的氨基酸修饰描述于例如 WO0042072 中, 在此并入作为参考。

如上所披露的, 可例如通过改变 C1q 结合和/或 FcγR 结合并因此改变了 CDC 活性和/或 ADCC 活性, 以设计具有改变的效应子功能的本发明的人工程 IL-6 抗体 Fc 区。“效应子功能”负责激活或减弱生物活性(如受试者中的)。效应子功能的例子包括但不限于: C1q 结合; 依赖补体的细胞毒性(CDC); Fc 受体结合; 依赖抗体的细胞毒性(ADCC); 吞噬作用; 细胞表面受体(如 B 细胞受体; BCR)的下调节等。这样的效应子功能可能需要 Fc 区与结合区(如抗体可变区)结合并能

使用多种测定法(如 Fc 结合测定、ADCC 测定、CDC 测定等)进行评估。

例如,可产生具有改善的 C1q 结合和改善的 Fc γ RIII 结合(如具有都改善的 ADCC 活性和 CDC 活性)的人工程 IL-6 抗体的变体 Fc 区。或者,如果期望效应子功能减少或消除,可工程化具有减少的 CDC 活性和/或减少的 ADCC 活性的变体 Fc 区。在其他的实施方案中,这些活性中仅有一种得以增加,以及任选地,还有其他活性被减少(如产生具有改善的 ADCC 活性,但 CDC 活性减少的 Fc 区变体,反之亦然)。

在工程化中还可导入 Fc 突变以改变它们与新生儿 Fc 受体(FcRn)的相互作用,并改善它们的药物代谢动力学特性。业已描述了具有改善的与 FcRn 结合的人 Fc 变体集合(Shields 等, (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc γ RI, Fc γ RII, Fc γ RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc γ R, J. Biol. Chem. 276:6591-6604)。

另一种类型的氨基酸取代用于改变人工程 IL-6 抗体 Fc 区的糖基化型。Fc 区的糖基化通常为 N 联或 O 联。N 联指糖类部分连接到天冬酰胺残基的侧链上。O 联糖基化指糖类 N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一连接到羟基氨基酸上,最通常为丝氨酸或苏氨酸,尽管也可以使用 5-羟基脯氨酸或 5-羟基赖氨酸。用于酶连接糖类部分到天冬酰胺侧链肽序列上的识别序列为天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸,其中 X 为除脯氨酸之外的任何氨基酸。因此,多肽中任何一种这些肽序列的存在就形成了潜在的糖基化位点。

例如通过缺失多肽中存在的一个或多个糖基化位点,和/或添加一个或多个多肽中不存在的糖基化位点可以改变糖基化型。通过改变氨基酸序列使之含有一个或多个上述三肽序列(用于 N 联糖基化位点),就能方便地实现添加糖基化位点到人工程 IL-6 抗体 Fc 区。作例证的糖基化变体具有重链的残基 Asn 297 的氨基酸取代。还可通过对原始多肽序列添加一个或多个丝氨酸或苏氨酸残基或用之取代(用于 O 联糖基化位点)进行改变。此外,将 Asn 297 改变为 Ala 可除去一个糖基化位点。

在一些实施方案中,在表达 $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖氨基转移酶 III(GnT III)的细胞中表达本发明的人工程 IL-6 抗体,使得 GnT III 添加 GicNAc 到人工程 IL-6 抗体上。产生上述形式抗体的方法提供于

WO/9954342、WO/03011878、专利公开 20030003097A1 以及 Umana 等, *Nature Biotechnology*, 17:176-180, Feb. 1999.

可任选地通过免疫能产生如在此所述和/或本领域已知的人抗体的所有组成成分的转基因动物(如小鼠、大鼠、仓鼠、非人灵长类动物等), 产生人抗 IL-6 抗体。产生人抗 IL-6 抗体的细胞可分离自这样的动物, 并利用适合的方法例如在此所述的方法使之无限增殖化。

可通过已知方法产生能产生与人抗原结合的人抗体的所有组成成分的转基因小鼠(如但不限于 Lonberg 等的 U.S.

专利号: 5,770,428, 5,569,825, 5,545,806, 5,625,126, 5,625,825, 5,633,425,

5,661,016 和 5,789,650 ; Jakobovits 等 WO 98/50433,

Jakobovits 等 WO 98/24893, Lonberg 等 WO 98/24884, Lonberg 等 WO

97/13852, Lonberg 等 WO 94/25585, Kucherlapate 等 WO 96/34096,

Kucherlapate *et al.* EP 0463 151 B1, Kucherlapate 等 EP 0710 719 A1, Surani

等 US. 专利号 5,545,807, Bruggemann 等 WO 90/04036, Bruggemann 等 EP

0438 474 B1, Lonberg 等 EP 0814 259 A2, Lonberg 等 GB 2 272 440 A,

Lonberg 等 *Nature* 368:856-859 (1994), Taylor 等, *Int. Immunol.* 6(4):579-591

(1994), Green 等, *Nature Genetics* 7:13-21 (1994), Mendez 等, *Nature Genetics*

15:146-156 (1997), Taylor 等, *Nucleic Acids Research* 20(23):6287-6295 (1992),

Tuaillon 等, *Proc Natl Acad Sci USA* 90(8):3720-3724 (1993), Lonberg 等, *Int*

Rev Immunol 13(1):65-93 (1995) 和 Fishwald 等, *Nat Biotechnol* 14(7):845-851

(1996),各自在此完全并入作为参考)。一般而言, 这些小鼠包含至少一种含有来自至少一种人免疫球蛋白基因座的 DNA 的转基因, 该基因座为功能性基因重排的或可经受功能性基因重排。可破坏或缺失这样的小鼠中的内源免疫球蛋白基因座以消除动物产生为内源基因所编码的抗体的能力。

可利用肽展示文库方便地实现特异性结合相似蛋白或片段的抗体的筛选。该方法包括对于具有期望功能或结构的单个成员的肽大集合的筛选。肽展示文库的抗体筛选是本领域众所周知的。所展示的肽序列可为 3-5000 个或更多个氨基酸长, 通常为 5-100 个氨基酸长, 且经常为约 8-25 个氨基酸长。除用于产生肽文库的直接化学合成法之外, 已描述了一些重组 DNA 方法。一种方法包括在噬菌体或细胞表面上展示肽序列。每个噬菌体或细胞含有编码特定的展示肽序列的核苷酸序列。这样的方法描述于 PCT 专利公开号 91/17271、91/18980、

91/19818 和 93/08278。

其他用于产生肽文库的系统具有体外化学合成和重组方法两方面的内容。参见 PCT 专利公开号 92/05258, 92/14843 和 96/19256. 还参见 U.S.专利号 5,658,754; 和 5,643,768。肽展示文库、载体以及筛选试剂盒市售自这样的供应商如 Invitrogen (Carlsbad, CA) 和 Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, UK)。参见如转让给 Enzon 的 U.S.专利号 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456; 转让给 Dyax 的 5223409, 5403484, 5571698, 5837500; 转让给 Affymax 的 5427908, 5580717; 转让给 Cambridge Antibody Technologies 的 5885793; 转让给 Genentech 的 5750373; 转让给 Xoma 的 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417; Colligan, 同上; Ausubel, 同上; 或 Sambrook, 同上。还可利用将至少一种抗 IL-6 抗体编码核酸提供给在它们的乳中产生这样的抗体的转基因动物或哺乳动物例如山羊、牛、马、绵羊、兔等, 制备本发明的抗体。可利用已知方法提供这样的动物。参见例如但不限于 US 专利号 5,827,690; 5,849,992; 4,873,316; 5,849,992; 5,994,616; 5,565,362; 5,304,489 等, 各自在此完全并入作为参考。

可额外地利用将至少一种抗 IL-6 抗体编码核酸提供给产生这样的抗体的转基因植物和培养的植物细胞(如但不限于烟草和玉米)、来自于其中的植物部分或培养的细胞中的特定的部分或变体, 制备本发明的抗体。作为非限制性的例子, 业已成功地使用表达重组蛋白的转基因烟草叶子来提供大量的重组蛋白, 如使用诱导型启动子。参见如 Cramer 等, Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95-118 (1999)及其中引用的参考文献。同样, 也已使用转基因玉米来表达工业生产水平的哺乳动物蛋白, 具有相当于在其他重组系统中产生的或从天然来源纯化的那些蛋白的生物活性。参见如 Hood 等, Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 (1999)及其中引用的参考文献。还已从包括烟草种子和马铃薯块茎的转基因植物种子中产生了大量的抗体, 包括抗体片段例如单链抗体(scFv's)。参见如 Conrad 等, Plant Mol. Biol. 38:101-109 (1998)及其中引用的参考文献。因此, 还可根据已知方法利用转基因植物产生本发明的抗体。还参见如 Fischer 等, Biotechnol. Appl.

Biochem. 30:99-108 (Oct., 1999), Ma 等, Trends Biotechnol. 13:522-7 (1995); Ma 等, Plant Physiol. 109:341-6 (1995); Whitelam 等, Biochem. Soc. Trans. 22:940-944 (1994); 及其中引用的参考文献。

本发明的抗体可以广泛的亲和力(K_D)结合人 IL-6。在一个优选的实施方案中,至少一种本发明的人 mAb 能任选地以高亲和力结合人 IL-6。例如,人或人工程 mAb 能以等于或小于约 10^{-7} M 的 K_D 结合人 IL-6,例如但不限于 $0.1-9.9$ (或其中的任何范围或值) $\times 10^{-7}$ 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} 、 10^{-14} 、 10^{-15} 或其中的任何范围或值,如通过本领域技术人员所熟练的表面等离子共振或 Kinexa 法所测定的。

可利用任何适合的方法通过实验测定抗体对抗原的亲和力或亲合力。(参见例如, Berzofsky, 等, "Antibody-Antigen Interactions," 在 *Fundamental Immunology*, Paul, W. E., 编, Raven Press: New York, NY (1984)中; Kuby, Janis *Immunology*, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992);以及在此所述的方法)。如果在不同条件(如盐浓度、pH)下测定,所测定的特定的抗体-抗原相互作用的亲和力可改变。因此,优选地使用抗体和抗原的标准溶液以及标准化的缓冲液例如在此描述的缓冲液产生亲和力的测量值和其他抗原结合参数(如 K_D 、 K_{on} 、 K_{off})。

可用本发明的抗体进行竞争性测定以便测定什么蛋白、抗体或其他拮抗剂与本发明的抗体竞争结合 IL-6 和/或共有表位区。这些易于为本领域技术人员所知的测定法评估了拮抗剂或配体之间对于有限数量的蛋白上的结合位点的竞争。在竞争之前或之后蛋白和/或抗体是固定或不溶解的,并通过例如倾析(其中预先使蛋白/抗体不溶解)或离心(其中在竞争反应后沉淀蛋白/抗体)将与 IL-6 结合的样品与未结合的样品分开。同样,可通过功能是否为抗体与蛋白的结合或缺乏结合所改变来测定竞争性结合,如抗体分子是否抑制或加强例如标记的酶活性。如本领域众所周知的,可以使用 ELISA 和其他功能性测定法。

优选的本发明的抗 IL-6 抗体具有下表 1-5 和 12-14 所示的序列。例如,本发明的抗 IL-6 抗体具有一条表 1 所示的轻链 CDR 序列(即 CDRL1、CDRL2 和 CDRL3)和一条表 2 所示的重链 CDR 序列(即 CDRH1、CDRH2 和 CDRH3)。更具体地说,抗 IL-6 抗体(分子 AME-

A9)具有 SEQ ID NO: 15 的 CDRL1、SEQ ID NO: 27 的 CDRL2、SEQ ID NO: 35 的 CDRL3、SEQ ID NO: 47 的 CDRH1、SEQ ID NO: 61 的 CDRH2 和 SEQ ID NO: 91 的 CDRH3。

核酸分子

使用在此提供的信息，例如，编码 SEQ ID NOS: 93、97 和 101 的至少一种的轻链可变区，连同在此披露的其他序列，以及 SEQ ID NOS: 95、99 和 103 的至少一种的重链可变区，连同在此披露的其他序列，它们的特定片段、变体或共有序列，或包含至少一种这些序列的保藏的载体的至少 70-100% 的连续氨基酸的核苷酸序列，可利用在此描述的本领域已知的方法获得编码至少一种抗 IL-6 抗体的本发明的核酸分子。

本发明的核酸分子可以 RNA 形式存在，例如 mRNA、hnRNA、tRNA 或任何其他形式，或以 DNA 形式存在，包括但不限于通过克隆或合成产生获得的 cDNA 和基因组 DNA 或任何它们的组合。DNA 可以是三链、双链或单链的，或它们的任何组合。DNA 或 RNA 至少一条链的任何部分可以是编码链，也称为正义链，或其可以是非编码链，也称为反义链。

本发明分离的核酸分子可包括包含任选地具有一个或多个内含子的可读框(ORF)，如但不限于，至少一条重链(如 SEQ ID NOS: 38、40、42、44 等)或轻链(如 SEQ ID NOS: 2、4、6、8 等)的至少一个 CDR 例如 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 的至少一个特定部分的可读框(ORF)的核酸分子；包含抗 IL-6 抗体或可变区(如 SEQ ID NOS: 94、98 和 102 的轻链可变区，连同在此披露的其他序列，和 SEQ ID NOS: 96、100 和 104 的重链可变区)编码序列的核酸分子；和含有基本上不同于上述那些的核苷酸序列的，但由于遗传密码简并性而仍编码在此所述和/或本领域已知的至少一种抗 IL-6 抗体的核苷酸序列的核酸分子。当然，遗传密码是本领域众所周知的。因此，对于本领域技术人员而言，产生这样的编码特定的本发明抗 IL-6 抗体的简并核酸变体应当是常规技术。参见如 Ausubel, 等，同上，并且这样的核酸变体包括于本发明中。

如在此所示的，包含编码抗 IL-6 抗体的核酸的本发明的核酸分子可包括但不限于，单独编码抗体片段的氨基酸序列的那些核酸分子；

完整的抗体或其部分的编码序列；抗体、片段或部分的编码序列，以及额外的序列，例如至少一个信号前导序列或融合肽的编码序列，带有或不带有前述的额外的编码序列，例如至少一个内含子，以及额外的非编码序列，包括但不限于非编码的 5'和 3'序列，例如在转录、mRNA 加工包括剪接和多腺苷酸化信号(例如，mRNA 的核糖体结合和稳定性)中起作用的转录、非转录序列；编码额外的氨基酸例如提供额外的功能性的那些氨基酸的额外的编码序列。因此，可将编码抗体的序列融合至标记物序列，例如编码帮助包含抗体片段或部分的融合抗体纯化的肽的序列。

与在此描述的多核苷酸选择性杂交的多核苷酸

本发明提供了在选择性杂交条件下在此披露的多核苷酸杂交的分离的核酸。因此，该实施方案的多核苷酸可用于分离、检测和/或定量包含这样的多核苷酸的核酸。例如，本发明的多核苷酸可用于鉴定、分离或扩增保藏文库中的部分或全长克隆。在某些实施方案中，多核苷酸为分离的基因组或 cDNA 序列，或反之与来自人或哺乳动物核酸文库的 cDNA 互补。

更适宜地，cDNA 文库包含至少 80%的全长序列，优选地，至少 85%或 90%的全长序列，以及更优选地，至少 95%的全长序列。可标准化 cDNA 文库增加稀有序列的代表性。低或中等严格的杂交条件通常地，但非排它地，被相对于互补序列具有减少的序列同一性的序列所使用。中高严格条件可任选地用于具有更高同一性的序列。低严格条件使具有约 70%序列同一性的序列的选择性杂交得以发生，并可用于鉴定直系同源或旁系同源序列。

任选地，本发明的多核苷酸应编码为所在此所述的多核苷酸编码的抗体的至少一部分。本发明的多核苷酸包含能用于与编码本发明抗体的多核苷酸选择性杂交的核酸序列。参见如 Ausubel，同上；Colligan，同上，各自在此完全并入作为参考。

核酸构建

可使用如本领域众所周知的(a) 重组方法，(b) 合成技术，(c) 纯化技术，和/或(d) 它们的组合制备本发明的分离的核酸。

核酸可方便地包含除本发明的多核苷酸之外的序列。例如，可将包含一个或多个核酸内切酶限制位点的多克隆位点插入到核酸中以

帮助多核苷酸分离。同样，可将可翻译的序列插入以帮助翻译的本发明的多核苷酸分离。例如，6-组氨酸标记物序列提供了方便的方式以纯化本发明的蛋白。除编码序列之外的本发明的核酸任选地为用于本发明的多核苷酸克隆和/或表达的载体、衔接物或接头。

可将额外的序列添加到这样的克隆和/或表达序列上以优化它们在克隆和/或表达中的功能，帮助多核苷酸分离，或改善多核苷酸导入细胞。在本领域中克隆载体、表达载体、衔接物和接头的应用是众所周知的。(参见如 Ausubel, 同上; 或 Sambrook, 同上)。

用于构建核酸的重组方法

可使用本领域技术人员已知的多种克隆方法学由生物学来源获得本发明的分离的核酸组合物，例如 RNA、cDNA、基因组 DNA 或它们的任何组合。在某些实施方案中，在严格条件下与本发明的多核苷酸选择性杂交的寡核苷酸探针被用于鉴定 cDNA 或基因组 DNA 文库中期望的序列。RNA 的分离以及 cDNA 和基因组文库的构建对于本领域技术人员是众所周知的。(参见如 Ausubel, 同上; 或 Sambrook, 同上)。

核酸筛选和分离方法

可利用基于本发明的多核苷酸序列的探针筛选 cDNA 或基因组文库，例如在此所披露的那些多核苷酸序列。探针可用于与基因组 DNA 或 cDNA 序列杂交以分离相同或不同生物体中的同源基因。本领域技术人员应当理解在该测定中可使用不同的杂交严格程度；并且杂交或洗涤介质可以是严格的。当杂交条件变得更加严格时，在用于形成双链体的探针和靶之间一定有更高程度的互补性出现。严格的程度可受控于温度、离子强度、pH 和部分变性溶剂例如甲酰胺的存在的一种或多种。例如，通过例如在 0%-50% 范围内操纵甲酰胺浓度来改变反应物溶液的极性，杂交严格性能方便地得到改变。可检测的结合所需要的互补性(序列同一性)的程度会随着杂交介质和/或洗涤介质的严格性而改变。互补性的程度最好为 100%、或 70-100%、或任何在其中的范围或值。然而，很清楚探针和引物中微小的序列改变可以补偿减少的杂交和/或洗涤介质的严格性。

基于在此提出的教导和指导，扩增 RNA 或 DNA 的方法是本领域众所周知的，并可根据本发明得以使用而无需过度实验。

已知的 DNA 或 RNA 扩增方法包括但不限于聚合酶链反应(PCR)和有关的扩增方法(参见如 Mullis, 等的 U.S.专利号 4,683,195, 4,683,202, 4,800,159, 4,965,188; Tabor, 等的 4,795,699 和 4,921,794; Innis 的 5,142,033; Wilson, 等的 5,122,464; Innis 的 5,091,310; Gyllensten, 等的 5,066,584; Gelfand, 等的 4,889,818; Silver, 等的 4,994,370; Biswas 的 4,766,067; Ringold 的 4,656,134)和使用针对作为模板用于双链 DNA 合成的靶序列的反义 RNA 的 RNA 介导的扩增(Malek, 等的 U.S.专利号 5,130,238, 具有商品名 NASBA), 这些文献的全文在此并入作为参考。(参见如 Ausubel, 同上; 或 Sambrook, 同上)。

例如, 聚合酶链反应(PCR)技术可用于由基因组 DNA 或 cDNA 文库直接扩增本发明的多核苷酸序列以及有关的基因。PCR 和其他体外扩增方法还可用于例如克隆编码待表达的蛋白的核酸序列, 制备用作探针用于检测样品中期望的 mRNA 的存在的核酸, 用于核酸测序, 或用于其他目的。在体外扩增方法中足以指导本领域技术人员的技术的例子见于 Berger, 同上, Sambrook, 同上, 和 Ausubel, 同上, 以及 Mullis, 等, U.S.专利号 4,683,202 (1987); 和 Innis, 等, PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, 编, Academic Press Inc., San Diego, CA (1990)。用于基因组 PCR 扩增的市售试剂盒是本领域已知的。参见如 Advantage-GC 基因组 PCR 试剂盒(Clontech)。此外, 如 T4 基因 32 蛋白 (Boehringer Mannheim)可用于改善长 PCR 产物的产率。

用于构建核酸的合成方法

还可使用已知的方法通过直接化学合成制备本发明分离的核酸(参见如 Ausubel, 等, 同上)。化学合成通常产生单链寡核苷酸, 其通过与互补序列杂交或通过利用单链作为模板使用 DNA 聚合酶进行聚合能转变为双链 DNA。本领域技术人员应意识到虽然 DNA 的化学合成可被限于约 100 个或更多个碱基的序列, 但通过连接较短序列可获得更长的序列。

重组表达盒

本发明进一步提供了包含本发明的核酸的重组表达盒。本发明的核酸序列, 例如编码本发明抗体的 cDNA 或基因组序列, 可用于构建

能被导入至少一种期望的宿主细胞的重组表达盒。重组表达盒通常包含可操作地与转录起始调节序列连接的本发明的多核苷酸，所述转录起始调节序列指导预期的宿主细胞中多核苷酸的转录。异源和非异源(即内源)启动子都可用于本发明核酸的直接表达。

在某些实施方案中，可将作为启动子、增强子或其他元件分离的核酸导入非异源形式的本发明的多核苷酸的适当位置中(上游、下游或内含子中)，以便上调或下调本发明的多核苷酸的表达。例如，可通过突变、缺失和/或取代体内或体外改变内源启动子。

载体和宿主细胞

本发明还涉及包括本发明分离的核酸分子的载体，使用该重组载体遗传工程化的宿主细胞，以及通过本领域众所周知的重组技术产生至少一种抗 IL-6 抗体。参见如 Sambrook, 等, 同上; Ausubel, 等, 同上, 各自在此完全并入作为参考。

多核苷酸可任选地连接到用于在宿主中增殖的含有选择标记的载体中。一般而言，以沉淀例如以磷酸钙沉淀的形式，或以与带电脂质形成复合物的形式导入质粒载体。如果载体是病毒，则可利用适当的包装细胞系在体外包装，然后转导入宿主细胞中。

DNA 插入片段应可操作地与适当的启动子连接。表达构建体进一步含有用于转录起始、终止的位点，以及在转录区中，含有用于翻译的核糖体结合位点。通过构建体表达的成熟转录物的编码部分优选地包括位于开头的转录起始密码子以及适当地放置于待翻译的 mRNA 末尾的终止密码子(如 UAA、UGA 或 UAG)，对于哺乳动物或真核细胞表达优选 UAA 和 UAG。

表达载体优选地但任选地包括至少一种选择标记。这样的标记包括，如但不限于对于真核细胞培养物，氨甲蝶呤(MTX)、二氢叶酸还原酶(DHFR, US 专利号 4,399,216; 4,634,665; 4,656,134; 4,956,288; 5,149,636; 5,179,017)、氨苄青霉素、新霉素(G418)、霉酚酸或谷氨酰胺合酶(GS, US 专利号 5,122,464; 5,770,359; 5,827,739)抗性基因，以及对于在大肠杆菌和其他细菌或原核生物中培养，四环素或氨苄青霉素抗性基因(上述专利在此完全并入作为参考)。用于上述宿主细胞的适当的培养基和培养条件是本领域已知的。适合的载体对于熟练的技术人员而言是显而易见的。可通过磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介的

转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染或其他已知的方法将载体构建体导入宿主细胞中。这样的方法描述在本领域中得以描述,例如 Sambrook, 同上, 第 1-4 和 16-18 章; Ausubel, 同上, 第 1、9、13、15、16 章。

至少一种本发明的抗体可以修饰型得以表达, 例如融合蛋白, 并不但可包括分泌信号, 而且可包括额外的异源功能区。例如, 可将额外的氨基酸区, 特别是带电氨基酸区, 添加到抗体的 N-末端以改善在纯化或后续操作和贮藏期间于宿主细胞中的稳定性和持续性。同样, 可将肽部分添加到本发明的抗体上以利于纯化。可在抗体或其至少一个片段最终制备之前除去这样的区域。这样的方法描述于诸多标准实验室手册中, 例如 Sambrook, 同上, 第 17.29-17.42 和 18.1-18.74 章; Ausubel, 同上, 第 16、17 和 18 章。

本领域技术人员对于多种能用于表达编码本发明蛋白的核酸的表达系统了如指掌。或者, 可通过开启(通过操纵)含有编码本发明抗体的内源 DNA 的宿主细胞, 在宿主细胞中表达本发明的核酸。这样的方法是本领域众所周知的, 如描述于 US 专利号 5,580,734, 5,641,670, 5,733,746 和 5,733,761 中, 在此完全并入作为参考。

用于产生抗体、其特定部分或变体的例证性的细胞培养物为哺乳动物细胞。哺乳动物细胞系统通常以单层细胞的形式存在, 尽管还可以使用哺乳动物细胞悬浮液或生物反应器。在本领域中业已开发了多种能表达完整的糖基化蛋白的适合的宿主细胞系, 包括 COS-1(如 ATCC CRL 1650)、COS-7(如 ATCC CRL-1651)、HEK293、BHK21(如 ATCC CRL-10)、CHO(如 ATCC CRL 1610)和 BSC-1(如 ATCC CRL-26)细胞系、Cos-7 细胞、CHO 细胞、hep G2 细胞、P3X63Ag8.653、SP2/0-Ag14、293 细胞、HeLa 细胞等, 可容易地获得自例如, 美国典型培养物保藏中心, Manassas, Va (www.atcc.org)。优选的宿主细胞包括淋巴来源的细胞, 例如骨髓瘤和淋巴瘤细胞。特别优选的宿主细胞为 P3X63Ag8.653 细胞(ATCC 保藏号 CRL-1580)和 SP2/0-Ag14 细胞(ATCC 保藏号 RL-1851)。在一个特别优选的实施方案中, 重组细胞为 P3X63Ab8.653 或 SP2/0-Ag14 细胞。

用于这些细胞的表达载体可包括一种或多种如下表达控制序列, 例如但不限于, 复制起点; 启动子(如晚期或早期 SV40 启动子、

CMV 启动子(US 专利号 5,168,062; 5,385,839)、HSV tk 启动子、pgk(磷酸甘油酸激酶)启动子、EF-1 α 启动子(US 专利号 5,266,491)、至少一种人免疫球蛋白启动子); 增强子和/或加工信息位点, 例如核糖体结合位点、RNA 剪接位点、多腺苷酸化位点(如 SV40 大 T Ag 多聚腺苷酸添加位点)和转录终止序列。参见如 Ausubel 等, 同上; Sambrook, 等, 同上。其他用于产生本发明的核酸或蛋白的细胞是已知的和/或可获得自例如美国典型培养物保藏中心细胞系和杂交瘤目录(www.atcc.org)或其他已知的商业来源。

当使用真核宿主细胞时, 通常将多腺苷酸化或转录终止序列掺入载体中。终止序列的一个例子是来自牛生长激素基因的多腺苷酸化序列。还可包括用于转录物正确剪接的序列。剪接序列的一个例子是来自 SV40 的 VP1 内含子(Sprague, 等, J. Virol. 45:773-781 (1983))。此外, 如本领域已知的, 可将宿主细胞中调控复制的基因序列掺入载体中。

抗体纯化

可通过众所周知的方法从重组细胞培养物中回收并纯化抗 IL-6 抗体, 包括但不限于蛋白 A 纯化、硫酸铵或乙醇沉淀、酸抽提、阴离子或阳离子交换层析、磷酸纤维素层析、疏水作用层析、亲和层析、羟基磷灰石层析和凝集素层析。高效液相层析(“HPLC”)也可用于纯化。参见如 Colligan, Current Protocols in Immunology, 或 Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), 如第 1、4、6、8、9、10 章, 各自在此完全并入作为参考。

本发明的抗体包括天然纯化的产物、化学合成方法的产物以及由包括例如酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞的真核宿主通过重组技术产生的产物。取决于在重组生产过程中所使用的宿主, 本发明的抗体可以是糖基化的或非糖基化的, 优选糖基化的。这样的方法描述于诸多标准实验室手册中, 例如 Sambrook, 同上, 第 17.37-17.42 节; Ausubel, 同上, 第 10、12、13、16、18 和 20 章节; Colligan, Protein Science, 同上, 第 12-14 章, 各自在此完全并入作为参考。

抗 IL-6 抗体

根据本发明的抗 IL-6 抗体包括任何含有分子的蛋白或肽, 所述分子包含至少一部分免疫球蛋白分子, 例如但不限于至少一个配体结合

部分(LBP),例如但不限于重链或轻链的互补性决定区(CDR)或其配体结合部分、重链或轻链可变区、构架区(如 FR1、FR2、FR3、FR4 或其片段,或如 SEQ ID NOS: 105-112 所示的,进一步任选地包含至少一个取代、插入或缺失)、重链或轻链恒定区(如包含至少一个 CH1、铰链区 1(hinge1)、铰链区 2、铰链区 3、铰链区 4、CH2 或 CH3 或其片段,进一步任选地包含至少一个取代、插入或缺失)或其任何能并入本发明抗体中的部分。本发明的抗体可包括或可来源于任何哺乳动物,例如但不限于人、小鼠、兔、大鼠、啮齿动物、灵长类动物或它们的任何组合等。

本发明分离的抗体包含为任何适合的多核苷酸所编码的在此披露的抗体氨基酸序列,或任何分离的或制备的抗体。更适宜地,人抗体或抗原结合片段结合人 IL-6 并因此部分或基本上中和蛋白的至少一种的生物活性。部分或优选地基本上中和至少一种 IL-6 蛋白或片段的至少一种生物活性的抗体、或其特定部分或变体能结合该蛋白或片段,并因此抑制通过 IL-6 与 IL-6 受体结合或其他 IL-6 依赖的或介导的机制所介导的活性。在此使用的术语“中和抗体”指能取决于测定方法,抑制约 20-120%,优选至少约 10、20、30、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%或更多的 IL-6 依赖的活性的抗体。优选通过至少一种如在此所述和/或本领域已知的适合的 IL-6 蛋白或受体测定法评估抗 IL-6 抗体抑制 IL-6 依赖的活性的能力。本发明的人抗体可以是任何类型(IgG、IgA、IgM、IgE、IgD 等)或同种型的,并可包含 κ 或 λ 轻链。在一个实施方案中,人抗体包含 IgG 重链或规定片段,例如至少一种同种型, IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 (如 γ 1、 γ 2、 γ 3 或 γ 4)。可通过使用包含至少一种如在此所述和/或本领域已知的人轻链(如 IgG、IgA 和 IgM)转基因的转基因小鼠或其他转基因非人哺乳动物制备该类型的抗体。在另一个实施方案中,抗人 IL-6 人抗体包含 IgG1 重链和 IgG1 轻链。

至少一种本发明的抗体结合至少一种特异于至少一个 IL-6 蛋白、其亚基、片段、部分或任何组合的特定表位。至少一种表位可包含至少一种包含蛋白至少一部分的抗体结合区,该表位优选由至少一种蛋白的胞外的、可溶的、亲水的、表面的或细胞质部分组成。对于 SEQ ID NO: 115 的连续氨基酸的完整特定部分,至少一种特定表位可

包含至少 1-3 个氨基酸的至少一种氨基酸序列的任何组合例如, 氨基酸残基第 151-178 位, 更具体地说, 残基第 171-182 位。

一般而言, 本发明的人抗体或抗原结合片段应包含含有至少一个重链可变区的至少一个人互补性决定区(CDR1、CDR2 和 CDR3)或变体, 以及至少一个轻链可变区的至少一个人互补性决定区(CDR1、CDR2 和 CDR3)或变体的抗原结合区。CDR 序列可来源于人种系序列或与种系序列密切相配。例如, 可使用来自来源于原始小鼠 CDRs 的合成文库的 CDRs。可通过将保守取代掺入原始小鼠序列形成这些 CDRs。作为非限制性的例子, 抗体或抗原结合部分或变体可包含至少一个具有选自 SEQ ID NOS: 79、81、83、85、87、89 和 91 的氨基酸序列的重链 CDR3 和/或具有选自 SEQ ID NOS: 29、31、33 和 35 的氨基酸序列的轻链 CDR3。在一个特定的实施方案中, 抗体或抗原结合片段可具有包含至少一个重链 CDR(即 CDR1、CDR2 和/或 CDR3)的至少一部分的抗原结合区, 所述至少一个重链 CDR 具有相应的 CDRs 1、2 和/或 3 的氨基酸序列(如 SEQ ID NOS: 37、49 和 79)。在另一个特定的实施方案中, 抗体或抗原结合部分或变体可具有包含至少一个轻链 CDR(即 CDR1、CDR2 和/或 CDR3)的至少一部分的抗原结合区, 所述至少一个轻链 CDR 具有相应的 CDRs 1、2 和/或 3 的氨基酸序列(如 SEQ ID NOS: 1、17 和 29)。

在一个优选的实施方案中, 抗体或抗原结合片段的 3 个重链 CDRs 和 3 个轻链 CDRs 具有如在此所述的至少一种 mAb AME-A9、AME-1b、AME-18a、AME-22a、AME-20b、AME-23a 和 AME-19a 的相应的 CDR 的氨基酸序列。可通过使用常规方法将抗体的不同部分(如 CDRs、构架区)化学连接在一起、通过使用重组 DNA 技术的常规方法制备并表达编码该抗体的(即一个或多个)核酸分子或通过使用任何其他适合的方法制备这样的抗体。

抗 IL-6 抗体可包含至少一个具有规定的氨基酸序列的重链或轻链可变区。例如, 在一个优选的实施方案中, 抗 IL-6 抗体包含至少一个的至少一个任选地具有选自 SEQ ID NOS: 95、99、103、118、122、126 和 130 的氨基酸序列的重链可变区, 和/或至少一个任选地具有选自 SEQ ID NOS: 93、97、101、116、120、124 和 128 的氨基酸序列的轻链可变区。可使用适合的方法制备结合人 IL-6 并包含规定的重链

或轻链可变区的抗体,例如噬菌体展示(Katsube, Y., 等, *Int J Mol. Med*, 1(5):863-868 (1998))或如本领域已知的和/或在此描述的使用转基因动物的方法。例如,可用人 IL-6 或其片段免疫包含功能重排人免疫球蛋白重链转基因和含有来自能经受功能重排的人免疫球蛋白轻链基因座的 DNA 的转基因的转基因小鼠,以激发抗体产生。视需要,可如在此所述的和/或本领域已知的分离抗体产生细胞并制备杂交瘤或其他无限增殖化的抗体产生细胞。或者,可在适合的宿主细胞中使用编码核酸或其部分表达抗体、特定部分或变体。

氨基酸编码

组成本发明的抗 IL-6 抗体的氨基酸通常是缩写的。可通过本领域众所周知的其单字母编码、其三字母编码、名称或三核苷酸密码子标明氨基酸,来指示氨基酸名称(参见 Alberts, B., 等, *Molecular Biology of The Cell*, 第 3 版., Garland Publishing, Inc., New York, 1994)。

本发明的抗 IL-6 抗体可包括一个或多个如在此所列举的来自自然突变或人为操纵的氨基酸取代、缺失或添加。可通过本领域已知的方法鉴定本发明抗 IL-6 抗体中对于功能必不可少的氨基酸,例如位点定向诱变或丙氨酸扫描诱变(如 Ausubel, 同上,第 8, 15 章; Cunningham 和 Wells, *Science* 244:1081-1085 (1989))。后一种方法将单个丙氨酸突变导入到分子的每个残基处。然后测试所得到的突变分子的生物活性,例如但不限于至少一种 IL-6 中和活性。还可通过结构分析鉴定抗体结合关键位点,例如结晶、核磁共振或光亲和标记(Smith, 等, *J. Mol. Biol.* 224:899-904 (1992)和 de Vos, 等, *Science* 255:306-312 (1992))。

本发明的抗 IL-6 抗体可包括但不限于 SEQ ID NOS: 91、93、95、97、99 等至少之一的选自 5 个至所有连续氨基酸的至少一部分、序列或组合。

能增加或保持至少一种所列活性的非限制性变体包括但不限于任何上述多肽,进一步包含至少一个相应于至少一个在所披露的变体氨基酸序列之间改变的残基中的取代的突变。

抗 IL-6 抗体可进一步任选地包含具有不同于 SEQ ID NOS: 95、99 和 103 等至少之一的连续氨基酸序列的氨基酸序列的多肽(如在此提供的序列的一个或多个保守取代)。同样,本发明包含 SEQ ID NOS: 93、97 或 101 的轻链可变区 氨基酸序列或 SEQ ID NOS: 79、81、

83、85、87、89 或 91 的重链氨基酸序列的变体。

如本领域技术人员所理解的,本发明包括至少一种本发明的生物活性抗体。生物活性抗体具有天然的(非合成的)、内源的或有关的和已知抗体的至少 20%、30%或 40%,以及优选地至少 50%、60%或 70%,以及最优选地至少 80%、90%或 95%-1000%或更多的比活性。酶活性和底物特异性的测定法和定量法是本领域技术人员众所周知的。

在另一方面,本发明涉及在此所述的通过共价连接有机物部分而被修饰的人抗体和抗原结合片段。这样的修饰可产生具有改善的药物代谢动力学特性(如增加的体内血清半衰期)的抗体或抗原结合片段。有机物部分可以是线型或支链亲水聚合物基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。在特定的实施方案中,亲水聚合物基团可具有约 800-约 120,000 道尔顿的分子量,并且可以是聚链烷二醇(如聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇(PPG))、碳水化合物聚合物、氨基酸聚合物或聚乙烯吡咯烷酮,以及脂肪酸或脂肪酸酯基团可包含约 8-约 40 个碳原子。

本发明修饰的抗体和抗原结合片段可包含一个或多个与抗体直接或间接共价键合的有机物部分。每个与本发明的抗体或抗原结合片段键合的有机物部分可独立地为亲水聚合物基团、脂肪酸基团或脂肪酸酯基团。在此使用的术语“脂肪酸”包括一元羧酸和二羧酸。“亲水聚合物基团”作为在此使用的术语时指与辛烷相比更易溶于水的有机聚合物。例如,与辛烷相比聚赖氨酸更易溶于水的。因此,通过共价连接聚赖氨酸修饰的抗体为本发明所涵盖。适合于修饰本发明抗体的亲水聚合物可以是线型或支链的,包括例如聚烷醇类(如 PEG、甲氧基聚乙二醇(mPEG)、PPG 等)、糖类(如葡聚糖、纤维素、寡糖、多糖等)、亲水氨基酸聚合物(如聚赖氨酸、聚精氨酸、聚天冬氨酸等)、聚链烷氧化物(如聚环氧乙烷、聚环氧丙烷等)以及聚乙烯吡咯烷酮。更适宜地,修饰本发明抗体的亲水聚合物作为单独分子实体具有约 800-约 150,000 道尔顿的分子量。例如,可以使用其中下标为以道尔顿表示的聚合物平均分子量的 PEG₅₀₀₀ 和 PEG_{20,000}。亲水聚合基团可用 1-约 6 个烷基、脂肪酸或脂肪酸酯基团取代。可通过使用适当的方法制备用脂肪酸或脂肪酸酯基团取代的亲水聚合物。例如,可将包含胺基的聚合物与脂肪酸羧酸酯或脂肪酸酯偶联,然后脂肪酸上活化的羧酸酯(如用 N, N-羰基二咪唑活化的)或脂肪酸酯可与聚合物上的

羟基偶联。

适合于修饰本发明抗体的脂肪酸和脂肪酸酯可以是饱和的或可含有一个或多个不饱和单元。适合于修饰本发明抗体的脂肪酸包括,例如正十二烷酸盐(C_{12} , 月桂酸盐)、正十四烷酸盐(C_{14} , 肉豆蔻酸盐)、正十八烷酸盐(C_{18} , 硬脂酸盐)、正二十烷酸盐(C_{20} , 花生酸盐)、正二十二烷酸盐(C_{22} , 山 酸盐)、正三十烷酸盐(C_{30})、正四十烷酸盐(C_{40})、顺- Δ^9 -十八烷酸盐(C_{18} , 油酸盐)、所有的顺- $\Delta^{5,8,11,14}$ -二十碳四烯酸盐(C_{20} , 花生四烯酸盐)、辛二酸、十四烷二酸、十八烷二酸、二十二烷二酸等。适合的脂肪酸酯包括包含线型或支链低级烷基的二羧酸的单酯。低级烷基可包含 1-约 12 个, 优选地 1-约 6 个碳原子。

可使用适当的方法制备修饰的人抗体和抗原结合片段, 例如通过于一种或多种改性剂反应。“改性剂”作为在此使用的术语时指包含活化基团的适当的有机基团(如亲水聚合物、脂肪酸或脂肪酸酯)。“活化基团”为在适当的条件下能与另一化学基团反应由此在改性剂和另一化学基团之间形成共价键的化学部分或官能团。例如, 胺反应性活化基团包括亲电子基团, 例如甲苯磺酸酯、甲磺酸酯、卤素(氯、溴、氟、碘)、N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS)等。能与硫醇反应的活化基团包括例如马来酰亚胺、碘乙酰基(iodoacetyl)、丙烯酰基(acryloyl)、吡啶基二硫化物、5-巯基-2-硝基苯甲酸硫醇(TNB-硫醇)等。可将醛官能团与含有胺或酰肼的分子偶联, 叠氮基可与三价磷基团反应形成氨基磷酸酯或磷酰亚胺(phosphorimide)键合。适合于将活化基团导入分子中的方法是本领域已知的(参见例如, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996))。活化基团可直接键合有机基团(如亲水聚合物、脂肪酸、脂肪酸酯), 或通过接头部分结合, 例如二价 C_1 - C_{12} 基团, 其中一个或多个碳原子可为诸如氧、氮或硫的杂原子所取代。适合的接头部分包括, 例如, 四甘醇、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-NH-(CH_2)_6-NH-$ 、 $-(CH_2)_2-NH-$ 和 $-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-NH-$ 。可例如通过在 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)存在下, 让单-Boc-烷基二胺(如单-Boc-乙二胺、单-Boc-己二胺)与脂肪酸反应以形成在游离胺和脂肪酸羧酸酯之间的胺键, 从而产生包含接头部分的改性剂。可通过用三氟乙酸(TFA)处理从产物上除去 Boc 保护基团, 如所述以暴露能与另一碳酸酯偶联的伯胺, 或可让 Boc 保护基

团与马来酐反应并使得到的产物环化以产生活化的脂肪酸马来酰亚胺衍生物。(参见例如, Thompson, 等, WO 92/16221, 其完整教导在此并入作为参考)。

可让人抗体或抗原结合片段与改性剂反应产生本发明的修饰的抗体。例如, 通过使用胺活性改性剂例如 PEG 的 NHS 酯, 有机物部分可以非位点特异性方式键合抗体。还可通过还原抗体或抗原结合片段的二硫键(如链内二硫键)制备修饰的人抗体或抗原结合片段。然后, 让所还原的抗体或抗原结合片段与硫醇活性改性剂反应以产生本发明的修饰的抗体。可使用适当的方法制备包含键合本发明抗体特异性位点的有机物部分的修饰的人抗体和抗原结合片段, 所述方法例如反向蛋白水解(reverse proteolysis) (Fisch et. al., *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153 (1992); Werlen et. al., *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994); Kumaran et. al., *Protein Sci* 6(10):2233-2241 (1997); Itoh et. al., *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996); Capellas et. al., *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463 (1997)) 以及在 Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)中所描述的方法。

针对抗 IL-6 抗体的抗独特型抗体组合物

除单克隆抗 IL-6 抗体之外, 本发明还涉及特异于本发明的这样的抗体的抗独特型(抗-Id)抗体。抗-Id 抗体是一种识别通常与另一抗体的抗原结合区相关的独特决定簇的抗体。可通过用抗体或其含有 CDR 的区域免疫作为 Id 抗体来源的相同种和基因类型的动物(如小鼠品系)制备抗-Id。免疫的动物会识别并应答于免疫抗体的独特型决定簇并产生抗-Id 抗体。抗-Id 抗体还可被用作“免疫原”来诱导在另一只动物中的免疫应答, 产生所谓的抗抗-Id 抗体。

本发明还提供了至少一种抗 IL-6 抗体组合物, 在其中包含如在此所述和/或本领域已知的至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种、至少六种或更多种抗 IL-6 抗体, 所述抗体以非天然存在的组合物、混合物或类型的形式提供。这样的组合物包含非天然存在的组合物, 所述非天然存在的组合物含有至少一种或两种选自 SEQ ID NOS: 1-114 和 116-138 或其特定片段、结构域或变体的 70-100%的连续氨基酸的抗 IL-6 抗体氨基酸序列的全长、C-和/或 N-末端缺失的变体、结构域、片段或特定变体。优选的抗 IL-6 抗体组合物包括在此所

述的抗 IL-6 抗体序列例如 70-100%的 SEQ ID NOS: 15、27、35、47、61 和 91 或其特定片段、结构域或变体的作为至少一种 CDR 或 LBP 包含部分的至少一种或两种全长、片段、结构域或变体。进一步优选的组合包含, 例如, 40-99%的至少一种的 70-100%的 SEQ ID NOS: 93、95、97、99、101、103 等或其特定片段、结构域或变体。这样的组合物的百分数为如本领域已知的或在此描述的重量、体积、浓度、克分子浓度百分数或液体或干燥溶液、混合物、混悬液、乳状液、颗粒、粉末或胶体的克分子浓度。

包含额外的治疗活性成分的抗体组合物

本发明的抗体组合物可任选地进一步包含有效量的至少一种化合物或蛋白, 所述化合物或蛋白选自至少一种的抗感染药、心血管(CV)系统药、中枢神经系统(CNS)药、植物性神经系统(ANS)药、呼吸道药、胃肠(GI)道药、激素药、用于水或电解质平衡的药物、血液学药物、抗癌剂、免疫调节药、眼药、耳药或鼻药、局部用药物、营养药等。这样的药物是本领域众所周知的, 包括每种药物的成分、适应症、剂量和服药法都列于此(参见如 Nursing 2001 Handbook of Drugs, 第 21 版, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; Health Professional's Drug Guide 2001, 编辑, Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; Pharmacotherapy Handbook, Wells 等, 编, Appleton & Lange, Stamford, CT, 各自在此完全并入作为参考)。

抗感染药可以是选自杀阿米巴药或至少一种抗原虫药、抗蠕虫药、抗真菌药、抗疟药、抗结核药或至少一种抗麻风药、氨基葡萄糖类药物、青霉素类药物、头孢菌素类药物、四环素类药物、磺胺类药物、氯喹诺酮类药物、抗病毒药、大环内酯抗感染药和杂类抗感染药的至少一种。心血管药可以是选自促心肌收缩药、抗心律不齐药、抗心绞痛药、抗高血压药、抗血脂药和杂类心血管药的至少一种。CNS 药可以是选自非麻醉性镇痛药的至少一种或选自解热药、非甾类抗炎药、麻醉药或至少一种鸦片镇痛药、镇静催眠药、抗惊厥剂、抗抑郁药、抗焦虑药、抗精神病药、中枢神经系统兴奋剂、抗震颤麻痹药和杂类中枢神经系统药的至少一种。ANS 药可以是选自胆碱能药(拟副交感神经药)、抗胆碱能药、肾上腺素能药(拟交感神经药)、肾上腺素

能阻断剂(交感神经阻滞药)、骨骼肌松弛药和神经肌肉阻断剂的至少一种。呼吸道药可以是选自抗组胺药、支气管扩张药、祛痰药或至少一种镇咳药以及杂类呼吸系统药的至少一种。胃肠(GI)道药可以是选自抗酸剂或至少一种吸附剂或至少一种消胀药、消化酶或至少一种胆结石增溶剂、止泻剂、轻泻药、止吐药和抗溃疡药的至少一种。激素药可以是选自皮质激素、雄激素或至少一种促蛋白合成甾类、雌激素或至少一种黄体激素、绒促性素、抗糖尿病药或至少一种高血糖素、甲状腺激素、甲状腺激素拮抗剂、垂体激素和甲状旁腺样药的至少一种。用于水和电解质平衡的药物可以是选自利尿剂、电解质或至少一种置换溶液、酸化剂或至少一种碱化剂的至少一种。血液学药物可以是选自补血药、抗凝血剂、血液衍生物和血栓溶解酶类的至少一种。抗肿瘤剂可以是选自烷化药、抗代谢物、抗生素抗肿瘤剂、改变激素平衡的抗肿瘤剂和杂类抗肿瘤剂的至少一种。免疫调节药可以是选自免疫抑制剂、疫苗或至少一种类毒素、抗毒素或至少一种抗蛇毒血清、免疫血清和生物学应答调节物的至少一种。眼药、耳药和鼻药可以是选自眼用抗感染药、眼用抗炎药、缩瞳药、扩瞳剂、眼用血管收缩药、杂类眼药、耳药和鼻药的至少一种。局部用药物可以是选自局部用抗感染药、杀疥螨药或至少一种灭虱药或局部用皮质甾类的至少一种。营养药可以是选自维生素、矿物质或热量物质(calorics)的至少一种。参见如 Nursing 2001 Drug Handbook 的内容, 同上。

至少一种杀阿米巴药或抗原虫药可以是选自阿托伐醌、盐酸氯喹、磷酸氯喹、甲硝唑、盐酸甲硝唑和羟乙磺酸戊氧苯脒的至少一种。至少一种抗蠕虫药可以是选自甲苯咪唑、双羟萘酸噻嘧啶和噻苯咪唑的至少一种。至少一种抗真菌药可以是选自两性霉素 B、两性霉素 B 胆甾醇硫酸酯复合物、两性霉素 B 脂质体复合物、两性霉素 B 脂质体、氟康唑、氟胞嘧啶、灰黄霉素微粒、超微粉化灰黄霉素、依曲康唑、酮康唑、制霉菌素和盐酸特比萘芬的至少一种。至少一种抗疟药可以是选自盐酸氯喹、磷酸氯喹、脱氧土霉素、硫酸羟氯喹、盐酸甲氟喹、磷酸伯氨喹、乙胺嘧啶和乙胺嘧啶-磺胺多辛的至少一种。至少一种抗结核药或抗麻风药可以是选自氯苯吩嗪、环丝氨酸、氨苯砒、盐酸乙胺丁醇、异烟肼、吡嗪酰胺、利福布丁、利福平、利福喷丁和硫酸链霉素的至少一种。至少一种氨基糖苷类药物可以是选自硫酸丁胺卡那

霉素、硫酸双生霉素、硫酸新霉素、硫酸链霉素以及硫酸妥布霉素的至少一种。至少一种青霉素类药物可以是选自阿莫西林/克拉维酸钾、三水阿莫西林、氨苄青霉素、氨苄青霉素钠、三水苄青霉素、氨苄青霉素钠/舒巴克坦钠、氯唑西林钠、双氯西林钠、美洛西林钠、萘夫西林钠、苯唑西林钠、苄星青霉素 G、青霉素 G 钾、普鲁卡因青霉素 G、青霉素 G 钠、青霉素 V 钾、哌拉西林钠、氧哌嗪青霉素钠/三唑巴坦钠、替卡西林二钠以及替卡西林二钠/克拉维酸钾的至少一种。至少一种头孢菌素类药物可以是选自头孢克洛、头孢羟氨苄、头孢钠素、头孢地尼、盐酸头孢平、头孢克肟、头孢美唑钠、头孢尼西钠、头孢哌酮钠、头孢噻肟钠、头孢替坦二钠、头孢西丁钠、头孢西丁钠、头孢罗齐、头孢他定、头孢布坦、头孢唑肟钠、头孢曲松钠、头孢呋肟酯、头孢呋肟钠、头孢呋肟钠、一水头孢力新、头孢雷定和氯拉卡比的至少一种。至少一种四环素类药物可以是选自盐酸去甲金霉素、强力霉素钙、盐酸脱氧土霉素、盐酸多西环素、一水强力霉素、盐酸二甲胺四环素和盐酸四环素的至少一种。至少一种磺胺类药物可以是选自磺胺甲基异噁唑、磺胺嘧啶、磺胺甲基异噁唑、磺胺异噁唑和磺胺乙酰基异噁唑的至少一种。至少一种氟喹诺酮类药物可以是选自阿拉曲沙星、环丙沙星、依诺沙星、左氧氟沙星、盐酸洛美沙星、萘啶酸、氟哌酸、氧氟沙星、施帕沙星和甲磺酸曲伐沙星至少一种。至少一种氟喹诺酮类药物可以是选自阿拉曲沙、环丙沙星、依诺沙星、左氧氟沙星、盐酸洛美沙星、萘啶酸、氟哌酸、氧氟沙星、施帕沙星和甲磺酸曲伐沙星的至少一种。至少一种抗病毒药可以是选自硫酸阿巴卡韦、阿昔洛韦钠、盐酸金刚烷胺、安波那韦、西多福韦、地拉韦定甲磺酸、地达诺新、依法韦仑、泛西洛维、福米韦生钠、麟甲酸钠、更昔洛韦、硫酸茚地那韦、拉米夫定、拉米夫定/齐多夫定、甲磺酸那非那韦、奈韦拉平、磷酸奥塞米韦、利巴韦林、盐酸金刚乙胺、利托那韦、沙奎那韦、甲磺酸噻嗪努佛、司他夫定、盐酸伐昔洛韦、扎西他宾、扎那米韦和齐多夫定的至少一种。至少一种大环内酯抗感染药可以是选自阿齐红霉素、克拉红霉素、地红霉素、乙琥红霉素碱、无味红霉素、红霉素丁二酸乙酯、乳糖红霉素和红霉素硬脂酸盐的至少一种。至少一种杂类抗感染药可以是选自氯曲南、杆菌肽、丁二酸钠氯霉素、盐酸克林霉素、盐酸氯林可霉素棕榈酸酯、氯林可霉素磷酸酯、

亚胺培南钠和西司他丁钠、倍能、粗晶呋喃妥因、微晶呋喃妥因、奎奴普丁/达福普汀、盐酸壮观霉素、盐酸壮观霉素和盐酸万古霉素的至少一种。(参见如 Nursing 2001 Drug Handbook 的第 24-214 页)。

至少一种促心肌收缩药可以是选自乳酸氨利酮、地高辛和米力农乳酸盐的至少一种。至少一种抗心律不齐药可以是选自阿糖腺苷、盐酸胺碘酮、硫酸阿托品、溴苄胺、盐酸地尔硫卓、吡二丙胺、磷酸双异丙吡胺、盐酸艾司洛尔、醋酸氟卡尼、延胡索酸伊布利特、盐酸利多卡因、盐酸美西律、盐酸乙吗噻嗪、苯妥英、苯妥英钠、盐酸普鲁卡酰胺、盐酸普罗帕酮、盐酸普萘洛尔、奎尼丁重硫酸盐、奎尼丁葡萄糖酸盐、奎尼丁聚半乳糖醛酸盐、硫酸奎尼丁、索他洛尔、盐酸妥卡胺和盐酸维拉帕米的至少一种。至少一种抗心绞痛药可以是选自苯磺酸氨氯地平、亚硝戊酯、盐酸苄普地尔、盐酸地尔硫卓、硝酸异山梨酯、长效异乐定、纳多洛尔、盐酸尼卡地平、硝苯地平、硝化甘油、盐酸普萘洛尔、维拉帕米和盐酸维拉帕米的至少一种。至少一种抗高血压药可以是选自盐酸醋丁洛尔、阿罗地平磺酸盐、阿替洛尔、盐酸贝那普利、盐酸倍他洛尔、富马酸比索洛尔、坎地沙坦西酯、卡托普利、盐酸卡替洛尔、卡维地洛、可乐宁、盐酸可乐宁、二氮嗪、盐酸地尔硫卓、甲磺酸多沙唑嗪、依那普利拉、恩替普利、甲磺酸依普沙坦、非洛地平、甲磺酸非诺多巴、福辛普利钠、醋酸氯压胍、硫酸胍那决尔、盐酸谷氨法新、盐酸胍苯哒嗪、依贝沙坦、依拉地平、盐酸拉贝洛尔、赖诺普利、洛沙坦钾、甲基多巴、盐酸甲基多巴乙酯、琥珀酸甲氧乙心安、酒石酸美多洛尔、米诺地尔、盐酸莫西普利、纳多洛尔、盐酸尼卡地平、硝苯地平、尼索地平、硝普钠、硫酸喷布洛尔、哌道普利特丁胺、甲磺酸酚妥拉明、吲哚洛尔、盐酸哌唑嗪、盐酸普萘洛尔、盐酸喹那普利、雷米普利、替米沙坦、盐酸特拉唑嗪、马来酸噻吗心安、群多普利、缬沙坦和盐酸维拉帕米的至少一种。至少一种抗血脂药可以是选自阿托伐他汀钙、西立伐他汀钠、消胆胺、盐酸降胆宁、非诺贝特(微粉化的)、氟伐他汀钠、吉非贝齐、洛伐他汀、烟酸、普伐他汀钠和辛伐他汀的至少一种。至少一种杂类心血管药可以是选自阿昔单抗、前列腺素 E1、盐酸阿布他明、阿布他明、氯吡格雷酸式硫酸盐、双嘧啶胺醇、依替巴肽、盐酸甲氧胺福林、己酮可可碱、盐酸塞氯匹定和盐酸替罗非班的至少一种。(参见如 Nursing 2001

Drug Handbook 的第 215-336 页)。

至少一种非麻醉性镇痛药或解热药可以是选自扑热息痛、阿司匹林、三水杨酸胆碱镁、双氟尼酸和水杨酸镁的至少一种。至少一种非甾体抗炎药可以是选自塞来考昔、双氯芬酸钾、二氯苯胺苯乙酸钠、依托度酸、非诺洛芬钙、氟吡洛芬、布洛芬、吲哚美辛、吲哚美辛钠三水化物、酮洛芬、酮咯酸氨丁三醇、萘普酮、甲氧萘丙酸、甲氧萘丙酸钠、噁丙嗪、吡罗昔康、罗非考昔和舒林酸的至少一种。至少一种麻醉药或鸦片镇痛药可以是选自盐酸阿芬他尼、盐酸布本诺酚、酒石酸环丁甲二羟吗啡、磷酸可待因、硫酸可待因、枸橼酸芬太尼、芬太尼透皮系统、转化粘质液的芬太尼、盐酸氢化吗啡酮、哌替啶盐酸盐、盐酸美沙酮、盐酸吗啡、硫酸吗啡、酒石酸吗啡、盐酸纳布啡、盐酸氧可酮、果胶酸羟氢可待酮、盐酸羟吗啡酮、盐酸喷他佐辛、盐酸喷他佐辛和盐酸纳洛酮、乳酸喷他佐辛、盐酸丙氧芬、萘磺酸丙氧芬、盐酸瑞芬太尼、枸橼酸舒芬太尼和盐酸曲马多的至少一种。至少一种镇静催眠药可以是选自水合氯醛、艾司唑仑、盐酸氟西泮、戊巴比妥、戊巴比妥钠、苯巴比妥钠、司可巴比妥钠、羟基安定、三唑仑、扎来普隆和酒石酸佐比登的至少一种。至少一种抗惊厥剂可以是选自乙酰唑胺钠、酰胺咪嗪、氯硝西泮、二钾氯氮卓、地西泮、 α -正丙基戊酸钠二聚物、乙琥胺、磷苯妥英钠、加巴喷丁、拉莫三嗪、硫酸镁、苯巴比妥、苯巴比妥钠、苯妥英、苯妥英钠、苯妥英钠(长期用的)、去氧苯比妥、盐酸硫加宾、托吡酯、丙戊酸钠和丙戊酸的至少一种。至少一种抗抑郁药可以是选自盐酸阿米替林、双羟萘酸阿米替林、氯氧平、盐酸丁氯苯丙酮、氢溴酸西酞普兰、盐酸氯米帕明、盐酸去郁敏、盐酸多虑平、盐酸氟西汀、盐酸丙咪嗪、双羟萘酸丙咪嗪、米尔塔扎平、盐酸萘法唑酮、盐酸卡甲替林、盐酸帕罗西汀、硫酸苯乙基胍、盐酸舍曲林、硫酸反苯环丙胺、马来酸曲米帕明和盐酸文拉法辛的至少一种。至少一种抗焦虑药可以是选自阿普唑仑、盐酸丁螺酮、甲氧二氮卓、盐酸氯氮卓、二钾氯氮卓、地西泮、盐酸多塞平、双羟萘酸羟嗪、盐酸羟嗪、双羟萘酸羟嗪、劳拉西泮、甲丙氨酯、盐酸咪达唑仑和去甲羟安定的至少一种。至少一种抗精神病药可以是选自盐酸氯丙嗪、氯扎平、氟奋乃静癸酸酯、庚酸氟奋乃静、盐酸氟奋乃静、氟哌啶醇、癸酸氟哌啶醇、乳酸氟哌啶醇、盐酸洛沙平、琥珀

酸洛沙平、苯磺酸美索达嗪、盐酸吗啉啉醇、奥氮平、羟哌氯丙嗪、匹莫齐特、丙氯拉嗪、富马酸喹硫平、利哌利酮、盐酸甲硫哒嗪、氨砒噻吨、盐酸氨砒噻吨和盐酸三氟拉嗪的至少一种。至少一种中枢神经系统兴奋剂可以是选自硫酸苯丙胺、咖啡因、硫酸右旋苯异丙胺、盐酸多沙普仑、盐酸脱氧麻黄碱、哌甲酯、莫达非尼、匹莫林和盐酸苯丁胺的至少一种。至少一种抗震颤麻痹药可以是选自盐酸金刚脍胺、甲磺酸苄托品、盐酸安克痉、乳酸安克痉、甲磺酸溴隐亭、卡比多巴-左旋多巴、恩他卡朋、左旋多巴、甲磺酸硫丙麦角林、二盐酸普拉克索、盐酸罗匹尼罗、盐酸司来吉兰、托卡朋和盐酸苯海索的至少一种。至少一种杂类中枢神经系统药可以是选自盐酸丁氨苯丙酮、盐酸多奈培齐、达哌啉醇、马来酸氟伏沙明、碳酸锂、枸橼酸锂、盐酸那拉曲坦、尼古丁香糖、尼古丁透皮系统、异丙酚、苯甲酸利扎曲坦、盐酸西布茶明一水合物、琥珀酸舒马曲坦、盐酸他克林和佐米曲坦的至少一种。(参见如 Nursing 2001 Drug Handbook 的第 337-530 页)。

至少一种胆碱能药(拟副交感神经药)可以是选自氯化氨甲酰甲胆碱、氯化滕喜龙、溴化新斯的明、甲硫酸新斯的明、水杨酸毒扁豆碱和溴吡斯的明的至少一种。至少一种抗胆碱能药可以是选自硫酸阿托品、盐酸双环胺、胃长宁、莨菪碱、硫酸莨菪碱、溴化丙胺太林、东莨菪碱、丁溴东莨菪碱和氢溴酸东莨菪碱的至少一种。至少一种肾上腺素能药(拟交感神经药)可以是选自盐酸多巴酚丁胺、盐酸多巴胺、酒石酸间羟胺、酒石酸降肾上腺素、盐酸苯肾上腺素、盐酸假麻黄碱和硫酸假麻黄碱的至少一种。至少一种肾上腺素能阻断剂(交感神经阻滞药)可以是选自双氢麦角胺甲磺酸盐、酒石酸麦角胺、马来酸二甲麦角新碱和盐酸普萘洛尔的至少一种。至少一种骨骼肌松弛药可以是选自巴氯芬、肌安宁、氯羟苯唑、盐酸环苯扎林、丹曲洛林钠盐、美索巴莫和盐酸替扎尼定的至少一种。至少一种神经肌肉阻断剂可以是选自卡肌宁、苯碳酸顺阿曲库胺、多沙氯铵、米库氯铵、潘库溴铵、哌库溴铵、雷帕库碘铵、罗库溴铵、氯化琥珀胆碱、氯化筒箭毒碱和维库罗宁的至少一种。(参见如 Nursing 2001 Drug Handbook 的第 531-84 页)。

至少一种抗组胺药可以是选自马来酸溴苯那敏、盐酸西替立嗪、马来酸氯苯那敏、富马酸氯苯苄咯、盐酸赛庚啶、盐酸苯海拉明、盐

酸非索那定、氯雷他定、盐酸异丙嗪、异丙嗪茶碱酸盐和盐酸曲普利啉的至少一种。至少一种支气管扩张药可以是选自沙丁胺醇、硫酸舒喘灵、氨茶碱、硫酸阿托品、硫酸麻黄碱、肾上腺素、重酒石酸肾上腺素、盐酸肾上腺素、异丙阿托品、异丙肾上腺素、盐酸异丙肾上腺素、硫酸异丙肾上腺素、盐酸左沙丁胺醇、硫酸间羟异丙肾上腺素、胆茶碱、醋酸吡布特罗、沙美特罗替茶酸酯、硫酸叔丁肾上腺素和胆茶碱的至少一种。至少一种祛痰药或镇咳药可以是选自苯佐那酯、磷酸可待因、硫酸可待因、氢溴酸右甲吗喃、盐酸苯海拉明、愈创木酚甘油醚和氢化吗啡酮的至少一种。至少一种杂类呼吸系统药可以是选自乙酰半胱氨酸、二丙酸氯地米松、贝拉康坦、布地缩松、外源性肺泡表面活性剂(calfactant)、色甘酸钠、阿法链道酶、依前列醇钠、氟尼缩松、丙酸氟替卡松、孟鲁司特钠、奈多罗米钠、帕利珠单抗、丙炎松、扎鲁司特、和弃白通的至少一种。(参见如 Nursing 2001 Drug Handbook 的第 585-642 页)。

至少一种抗酸剂、吸附剂或消胀药可以是选自碳酸铝、氢氧化铝、碳酸钙、氢氧化镁铝、氢氧化镁、氧化镁、二甲硅油和碳酸氢钠的至少一种。至少一种消化酶或胆结石增溶剂可以是选自胰酶、胰脂酶和熊去氧胆酸的至少一种。至少一种止泻剂可以是选自硅镁土、碱式水杨酸铋、聚卡波非钙、盐酸氟苯哌酯和硫酸阿托品、洛哌丁胺、醋酸奥曲肽、阿片酞以及阿片酞(含有樟脑的)的至少一种。至少一种轻泻药可以是选自比沙可啶(bisocodyl)、聚卡波非钙、波希鼠李皮、波希鼠李皮芳香流浸膏、波希鼠李皮流浸膏、蓖麻油、多库酯钙、多库酯钠、甘油、乳果糖、柠檬酸镁、氢氧化镁、硫酸镁、甲基纤维素、矿物油、聚乙二醇或电解质溶液、车前草、番泻叶和磷酸钠的至少一种。至少一种止吐药可以是选自盐酸氯丙嗪、茶苯海明、甲磺酸多拉司琼、屈大麻酚、盐酸格拉司琼、盐酸氯苯苄嗪、盐酸甲氧氯普胺、盐酸昂丹司琼、羟哌氯丙嗪、甲呱氯丙嗪、甲呱氯丙嗪乙二磺酸盐、甲哌氯丙嗪顺丁烯二酸盐、盐酸异丙嗪、东莨菪碱、马来酸硫乙哌丙嗪和盐酸曲美苄胺的至少一种。至少一种抗溃疡药可以是选自西米替丁、盐酸西咪替丁、法莫替丁、南索拉唑、胶体次枸橼酸铋、尼扎替丁、奥美拉唑、雷贝拉唑钠、雷尼替丁枸橼酸铋、盐酸雷尼替丁和硫糖铝的至少一种。(参见如 Nursing 2001 Drug Handbook 的第 643-95

页)。

至少一种皮质激素可以是选自倍他米松、醋酸倍他米松或倍他米松磷酸钠、倍他米松磷酸钠、醋酸可的松、地塞米松、醋酸地塞米松、地塞米松磷酸钠、醋酸氟氢可的松、氢化可的松、醋酸氢化可的松、氢化可的松环戊丙酸酯、氢化可的松磷酸钠、氢化可的松琥珀酸钠、甲基氢化泼尼松、醋酸甲基氢化泼尼松、甲氢泼尼松琥珀酸钠、强的松龙、醋酸强的松龙、强的松龙磷酸钠、强的松龙叔丁乙酯、强的松、去炎松、丙炎松和双醋去炎松的至少一种。至少一种雄激素或促蛋白合成甾类可以是选自炔羟雄烯异唑、氟羟甲睾酮、甲基睾酮、癸酸诺龙、苯丙酸诺龙、睾酮、环戊丙酸睾酮、庚酸睾酮、丙酸睾酮和睾酮透皮系统的至少一种。至少一种雌激素或黄体激素可以是选自酯化雌激素、雌二醇、环戊丙酸雌二醇、雌二醇/醋炔诺酮透皮系统、雌二醇戊酸酯、雌激素(缀合的)、哌嗪雌酮硫酸酯、炔雌醇、炔雌醇和地索高诺酮、炔雌醇和炔诺醇二醋酸酯、炔雌醇和去氧孕烯、炔雌醇和炔诺醇二醋酸酯、炔雌醇和左炔诺孕酮、炔雌醇和炔诺酮、炔雌醇和醋酸炔诺酮、炔雌醇和炔诺肟酯、炔雌醇和甲基炔诺酮、炔雌醇和醋酸炔诺酮以及富马酸铁、左炔诺孕酮、醋酸甲羟孕酮、炔雌醇甲醚和炔诺酮、炔诺酮、醋酸炔诺酮、甲基炔诺酮和孕酮的至少一种。至少一种绒促性素可以是选自醋酸加尼瑞克、醋酸戈那瑞林、醋酸组氨瑞林和尿促性素的至少一种。至少一种抗糖尿病药或高血糖素可以是选自抑葡萄糖甙酶、氯磺丙脲、格列美脲、格列吡嗪、胰高血糖素、格列本脲、胰岛素、盐酸二甲双胍、米格列醇、盐酸匹格列酮、瑞格列奈、马来酸罗格列酮和曲格列酮的至少一种。至少一种甲状腺激素可以是选自左甲状腺素钠、碘塞罗宁钠、复方甲状腺素和甲状腺粉的至少一种。至少一种甲状腺激素拮抗剂可以是选自甲巯咪唑、碘化钾、碘化钾(饱和溶液)、丙基硫氧嘧啶、放射性碘(碘化钠 ^{131}I)和浓碘溶液的至少一种。至少一种垂体激素可以是选自促肾上腺皮质激素、 $\alpha 1$ -24 促肾上腺皮质激素、醋酸去氨加压素、醋酸亮丙瑞林、长效促肾上腺皮质激素、人蛋氨酸生长素、生长激素和后叶加压素的至少一种。至少一种甲状旁腺样药可以是选自骨化二醇、降钙素(人)、降钙素(鲑鱼)、钙三醇、二氢速甾醇和羟乙二磷酸二钠的至少一种。(参见如 Nursing 2001 Drug Handbook 的第 696-796 页)。

至少一种利尿剂可以是选自乙酰唑胺、乙酰唑胺钠、盐酸阿米洛利、布美他尼、氯噻酮、利尿酸钠、利尿酸、呋塞米、氢氯噻嗪、吲达胺、甘露糖醇、甲苯噻唑酮、螺内酯、托塞米、氨苯蝶啶和尿素的至少一种。至少一种电解液或置换溶液可以是选自乙酸钙、碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙、葡乳醛酸钙、葡庚糖酸钙、葡萄糖酸钙、乳酸钙、磷酸钙(二代的)、磷酸钙(三代的)、葡聚糖(高分子量)、葡聚糖(低分子量)、羟乙基淀粉、氯化镁、硫酸镁、乙酸钾、碳酸氢钾、氯化钾、葡萄糖酸钾、林格氏注射液、林格氏注射液(乳酸的)和氯化钠的至少一种。至少一种酸化剂或碱化剂可以是选自碳酸氢钠、乳酸钠和氨基丁三醇的至少一种。(参见如 Nursing 2001 Drug Handbook 的第 797-833 页)。

至少一种补血药可以是选自富马酸亚铁、葡萄糖酸亚铁、硫酸亚铁、硫酸亚铁(干的)、右旋糖酐铁、山梨醇铁、多糖-铁复合物和葡糖酸铁钠复合物的至少一种。至少一种抗凝血剂可以是选自阿地肝素钠、达特肝素钠、达那肝素钠、依诺肝素钠、肝素钙、肝素钠和苜蓿香豆素钠的至少一种。至少一种血液衍生物可以是选自 5%白蛋白、25%白蛋白、抗血友病因子、抗抑制因子凝血剂复合物、抗纤维蛋白酶 EU (人)、第 IX 因子(人)、第 IX 因子复合物和血浆蛋白部分的至少一种。至少一种血栓溶解酶类可以是选自阿替普酶、复合纤溶酶链激酶、瑞替普酶(重组体)、链激酶和尿激酶的至少一种。(参见如 Nursing 2001 Drug Handbook 的第 834-66 页)。

至少一种烷化药可以是选自白消安、碳铂、卡氮芥、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、异磷酰胺、罗莫司丁、盐酸氮芥、美法仑、盐酸美法仑、链唑霉素、替莫唑胺和塞替派的至少一种。至少一种抗代谢物可以是选自卡培他滨、克拉屈滨、阿糖胞苷、5-氟去氧尿苷、磷酸氟达拉滨、氟尿嘧啶、羟基脲、巯基嘌呤、氨甲蝶呤、氨甲蝶呤钠和硫鸟嘌呤的至少一种。至少一种抗生素抗癌剂可以是选自硫酸博来霉素、更生霉素、枸橼酸柔红霉素脂质体、盐酸柔红霉素、盐酸阿霉素、盐酸阿霉素脂质体、盐酸表柔比星、盐酸伊达比星、丝裂霉素、喷司他丁、光辉霉素和 alrubicin 的至少一种。至少一种改变激素平衡的抗癌剂可以是选自阿纳托(司)唑、比卡鲁胺、雌氮芥磷酸钠、依西美坦、氟他米特、醋酸高锡林、来曲唑、醋酸亮丙瑞林、醋酸甲地孕酮、尼

鲁米特、枸橼酸他莫昔芬、鞣内酯和枸橼酸托瑞米芬的至少一种。至少一种杂类抗癌剂可以是选自天冬酰胺酶、卡介苗(BCG)(膀胱内有效的)、氮烯唑胺、多西他奇、足叶乙甙、磷酸鬼臼乙叉甙、盐酸吉西他滨、盐酸依立替康、邻氯苯对氯苯二氯乙烷、盐酸米托蒽醌、紫杉醇、培加帕酶、吡吩姆钠、盐酸甲基苄肼、利妥昔单抗、鬼臼噻吩甙、盐酸拓扑替康、曲妥单抗、维甲酸、硫酸长春碱、硫酸长春新碱和酒石酸长春瑞滨的至少一种。(参见如 Nursing 2001 Drug Handbook 的第 867-963 页)。

至少一种免疫抑制剂可以是选自硫唑嘌呤、巴利昔单抗、环孢霉素、达(克)珠单抗、淋巴细胞免疫球蛋白、莫罗单抗-CD3、麦考酚酸吗乙酯、盐酸麦考酚酸吗乙酯、西罗莫司和他克莫司的至少一种。至少一种疫苗或类毒素可以是选自 BCG 疫苗、霍乱菌苗、白喉-破伤风类毒素(吸附的)、吸附的白喉-破伤风类毒素-无细胞的百日咳疫苗、白喉-破伤风类毒素-全细胞百日咳疫苗、乙型嗜血杆菌缀合物疫苗、甲型肝炎疫苗(灭活的)、乙型肝炎疫苗(重组体)、流感病毒疫苗 1999-2000 三价型 A & B(纯化的表面抗原)、流感病毒疫苗 1999-2000 三价型 A & B(亚病毒粒子或纯化的亚病毒粒子)、流感病毒疫苗 1999-2000 三价型 A & B(全病毒粒子)、日本脑炎病毒疫苗(灭活的)、莱姆病疫苗(重组体 OspA)、麻疹-流行性腮腺炎-风疹病毒疫苗(活的)、麻疹-流行性腮腺炎-风疹病毒疫苗(活减毒的)、麻疹病毒疫苗(活减毒的)、流行性脑膜炎多糖疫苗、流行性腮腺炎病毒疫苗(活的)、鼠疫疫苗、肺炎球菌疫苗(多价)、脊髓灰质炎病毒疫苗(灭活的)、脊髓灰质炎病毒疫苗(活的、口服、三价)、狂犬病疫苗(吸附的)、狂犬病疫苗(人二倍体细胞)、风疹-流行性腮腺炎病毒疫苗(活的)、风疹病毒疫苗(活的、减毒的)、破伤风类毒素(吸附的)、破伤风类毒素(液体的)、伤寒疫苗(口服的)、伤寒疫苗(肠胃外注射用的)、伤寒 Vi 多糖疫苗、水痘病毒疫苗和黄热病疫苗的至少一种。至少一种抗毒素或抗蛇毒血清可以是选自黑寡妇蜘蛛毒抗毒血清、响尾蛇抗蛇毒血清(多价)、白喉抗毒素(马)和小尾眼镜蛇抗蛇毒血清的至少一种。至少一种免疫血清可以是选自巨细胞病毒免疫球蛋白(静脉注射的)、乙型肝炎病毒免疫球蛋白(人)、肌肉注射的免疫球蛋白、静脉注射的免疫球蛋白、狂犬病免疫球蛋白(人)、静脉注射的呼吸道合胞体病毒免疫球蛋白(人)、Rh₀(D)免疫球蛋白(人)、

静脉注射的 Rh₀(D)免疫球蛋白(人)、破伤风免疫球蛋白(人)和水痘带状疱疹免疫球蛋白的至少一种。至少一种生物学应答调节物可以是选自阿地白介素、重组人红细胞生成素、非格司亭、用于注射的醋酸格拉默、复合 α 干扰素、干扰素 α -2a(重组体)、干扰素 α -2b(重组体)、干扰素 β -1a、干扰素 β -1b(重组体)、干扰素 γ -1b、盐酸左旋咪唑、奥普瑞白介素和沙莫司亭的至少一种。(参见如 Nursing 2001 Drug Handbook 的第 964-1040 页)。

至少一种眼用抗感染药可以是选自杆菌肽、氯霉素、盐酸环丙沙星、乙琥红霉素、硫酸双生霉素、0.3%氧氟沙星、硫酸多粘菌素 B、10%磺胺醋酰钠、15%磺胺醋酰钠、30%磺胺醋酰钠、妥布霉素和阿糖腺苷的至少一种。至少一种眼用抗炎药可以是选自地塞米松、地塞米松磷酸钠、0.1%双氯酚酸钠、丙酮缩氟氢羟龙、氟比洛芬钠、酮咯酸氨丁三醇、泼尼松龙(混悬液)和强的松龙磷酸钠(溶液)的至少一种。至少一种缩瞳药可以是选自氯化乙酰胆碱、碳酸胆碱(眼内给药)、碳酸胆碱(局部给药)、二乙氧磷酰硫胆碱、匹鲁卡品、盐酸匹鲁卡品和硝酸匹鲁卡品的至少一种。至少一种扩瞳剂可以是选自硫酸阿托品、盐酸环戊通、盐酸肾上腺素、环硼肾上腺素、氢溴酸后马托品、盐酸苯肾上腺素、氢溴酸东莨菪碱和托品酰胺的至少一种。至少一种眼用血管收缩药可以是选自盐酸萘甲唑啉、盐酸羟间唑啉和盐酸四氢唑啉的至少一种。至少一种杂类眼药可以是选自阿拉可乐定盐酸盐、盐酸倍他洛尔、酒石酸溴莫尼定、盐酸卡替洛尔、地匹福林盐酸盐、盐酸多佐胺、二福马酸依美斯汀、荧光素钠、酮替芬、拉坦前列素、盐酸左布诺洛尔、盐酸美替洛尔、氯化钠(高渗的)和马来酸噻吗心安的至少一种。至少一种耳药可以是选自硼酸、过氧化氢脲、氯霉素和三乙醇胺多肽油酸冷凝物的至少一种。至少一种鼻药可以是选自二丙酸氯地米松、布地缩松、硫酸麻黄碱、盐酸肾上腺素、氟尼缩松、丙酸氟替卡松、盐酸萘甲唑啉、盐酸羟间唑啉、盐酸苯肾上腺素、盐酸四氢唑啉、丙炎松和盐酸丁苄唑啉的至少一种(参见如 Nursing 2001 Drug Handbook 的第 1041-97 页)。

至少一种局部用抗感染药可以是选自阿昔洛维、两性霉素 B、壬二酸乳膏、杆菌肽、硝酸布康唑、氯林可霉素磷酸酯、克霉唑、益康唑、乙琥红霉素、硫酸双生霉素、酮康唑、醋酸甲磺灭脓、甲硝唑(局

部用)、咪康唑硝酸盐、莫匹罗星、盐酸萘替芬、硫酸新霉素、呋喃西林、制霉菌素、磺胺嘧啶银、盐酸特比萘芬、特康唑、盐酸四环素、噻康唑和发癣退的至少一种。至少一种杀芥螨药或灭虱药可以是选自克罗米通、林丹、扑灭司林和除虫菊酯的至少一种。至少一种局部用皮质甾类可以是选自二丙酸倍他米松、戊酸倍他米松、丙酸氯倍米松、丙缩羟强龙、去羟米松、地塞米松、地塞米松磷酸钠、双醋二氟拉松、氟西奈德、氟轻松、氟羟可舒松、丙酸氟替卡松、halcionide、氢化可的松、醋酸氢化可的松、氢化可的松丁酸酯、戊酸氢化可的松、莫米松糠酸酯和曲安缩松的至少一种。(参见如 Nursing 2001 Drug Handbook 的第 1098-1136 页)。

至少一种维生素或矿物质可以是选自维生素 A、复合维生素 B、氰钴胺素、叶酸、羟钴胺素、甲酰四氢叶酸钙、烟酸、烟酰胺、盐酸吡哆辛、核黄素、维生素 B1、维生素 C、维生素 D、胆钙化醇、麦角钙化醇、维生素 D 类似物、度骨化醇、帕立骨化醇、维生素 E、维生素 K 类似物、维生素 K1、氯化钠、氯化钠(局部用)、微量元素、铬、铜、碘、锰、硒和锌的至少一种。至少一种热量物质可以是选自氨基酸输注剂(结晶的)、处于葡萄糖中的氨基酸输注剂、带有电解质的氨基酸输注剂、处于葡萄糖中的带有电解质的氨基酸输注剂、用于肝衰竭的氨基酸输注剂、用于高代谢应激的氨基酸输注剂、用于肾衰竭的氨基酸输注剂、葡萄糖、脂肪乳浊液和中链甘油三酯的至少一种。(参见如 Nursing 2001 Drug Handbook 的第 1137-63 页)。

本发明的抗 IL-6 抗体组合物可进一步包含至少一种任意适合且有效量的组合物或药物组合物,所述组合物或药物组合物包含与需要这样的调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者接触或施用于其的至少一种抗 IL-6 抗体,任选地进一步包含选自至少一种 TNF 拮抗剂(如但不限于 TNF 化学或蛋白拮抗剂、TNF 单克隆或多克隆抗体或片段,可溶性 TNF 受体(如 p55、p70 或 p85)或片段,它们的融合多肽,或小分子 TNF 拮抗剂,如 TNF 结合蛋白 I 或 II(TBP-I 或 TBP-II)、奈瑞莫单抗、英夫利昔单抗、依那西普、CDP-571、CDP-870、阿非莫单抗、来那西普等)、抗风湿药(如氯甲蝶呤、金诺芬、硫代葡萄糖金、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟米特、柳氮磺胺吡啶)、肌肉松弛药、麻醉药、非甾体抗炎药(NSAID)、镇痛

药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉药、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂(如氨基葡萄糖苷、抗真菌药、抗寄生虫药、抗病毒药、碳(杂)青霉烯、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺、四环素、其他抗微生物剂)、抗牛皮癣剂、皮质甾类、促蛋白合成甾类、糖尿病有关的药物、矿物质、营养物、甲状腺剂、维生素、钙有关的激素、止泻剂、镇咳药、止吐药、抗溃疡药、轻泻药、抗凝血剂、促红细胞生成素(如重组人肾红细胞生成素)、非格司亭(如 G-CSF, Neupogen)、沙莫司亭(GM-CSF, Leukine)、免疫接种、免疫球蛋白、免疫抑制剂(如巴利昔单抗、环孢霉素、达(克)珠单抗)、生长激素、激素置换药、雌激素受体调节剂、扩瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢药、有丝分裂抑制剂、防辐射药、抗抑郁药、抗躁狂剂、抗精神病药、抗焦虑剂、催眠药、拟交感神经药、兴奋剂、多奈哌齐、他克林、哮喘药、 β 激动剂、吸入的甾类、白细胞三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、色甘酸、肾上腺素或类似物、 α 链道酶(Pulmozyme)、细胞因子或细胞因子拮抗剂的至少一种。这样的细胞因子的非限制性的例子包括但不限于 IL-1 至 IL-23 的任何一种(如 IL-1、IL-2 等)。适合的剂量是本领域众所周知的。参见如 Wells 等, 编, Pharmacotherapy Handbook, 第 2 版, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, 高级版, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), 各自在此完全并入作为参考。

这样的抗癌或抗感染药还可包括与至少一种本发明的抗体缔合、结合、共同配制或同时给药的毒素分子。毒素可任选地起作用以选择性杀死病理性细胞或组织。病理性细胞可以是癌细胞或其他细胞。这样的毒素可以是但不限于纯化的或重组的毒素或包含至少一个毒素的功能性细胞毒性结构域的毒素片段, 如选自至少一种蓖麻毒素、白喉毒素、蛇毒或细菌毒素。术语毒素还包括任何天然存在的、突变的或重组的细菌或病毒所产生的内毒素和外毒素, 所述细菌或病毒可引起人或其他哺乳动物病理状况, 包括可导致死亡的毒素休克。这样的毒素可包括但不限于产肠毒素的大肠杆菌热肠毒素(LT)、耐热肠毒素(ST)、志贺细胞毒素、气单胞菌肠毒素、中毒性休克综合征毒素-1(TSST-I)、葡萄球菌肠毒素 A(SEA)、葡萄球菌肠毒素 B(SEB)或葡萄球菌肠毒素 C(SEC)、链球菌肠毒素等。这样的细菌包括但不限于产

肠毒素的大肠杆菌(ETEC)、肠出血的大肠杆菌(如 0157:H7 血清型菌株)、葡萄球菌(如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*))、酿脓葡萄球菌(*Staphylococcus pyogenes*))、志贺氏菌(如痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*))、弗氏志贺氏菌(*Shigella flexneri*)、波伊德志贺氏菌(*Shigella boydii*)和宋内志贺氏菌(*Shigella sonnei*))、沙门氏菌(如伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*))、猪霍乱沙门氏菌(*Salmonella cholera-suis*)、肠炎沙门氏菌(*Salmonella enteritidis*))、梭状芽孢杆菌(如产气荚膜梭状芽孢杆菌(*Clostridium perfringens*))、难辨梭状芽孢杆菌(*Clostridium difficile*)、肉毒梭状芽孢杆菌(*Clostridium botulinum*))、弯曲杆菌(如空肠弯曲杆菌(*Camphlobacter jejuni*))、胚胎弯曲杆菌(*Camphlobacter fetus*))、螺杆菌(如幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*))、气单胞菌(如温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*))、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)、豚鼠气单胞菌(*Aeromonas caviae*))、类志贺邻单胞菌(*Pleisomonas shigelloides*)、小肠结肠耶氏菌(*Yersinia enterocolitica*)、弧菌(如霍乱弧菌(*Vibrios cholerae*))、副溶血性弧菌(*Vibrios parahemolyticus*))、克雷伯氏杆菌、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)和链球菌的菌株。参见如 Stein, 编, INTERNAL MEDICINE, 第 3 版, pp 1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans 等, 编, Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 第 2 版, pp 239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell 等, Principles and Practice of Infectious Diseases, 第 3 版, Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow 等, 编, The Merck Manual, 第 16 版, Merck and Co., Rahway, NJ. , 1992; Wood 等, FEMS Microbiology Immunology, 76:121-134 (1991); Marrack 等, Science, 248:705-711 (1990), 各自内容在此完全并入作为参考。

本发明的抗 IL-6 抗体化合物、组合物或组合可进一步包含至少一种任何适当的助剂, 例如但不限于稀释剂、粘合剂、稳定剂、缓冲剂、盐类、亲脂性溶剂、防腐剂、佐剂等。药学上可接受的助剂是优选的。制备这样的无菌溶液的方法的非限制性的例子是本领域众所周知的, 例如但不限于 Gennaro, 编, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990。如本领域众所周知的或在此所述的, 可按常规选择适合于给药方式, 抗 IL-6 抗体、片段或

变体组合物的溶解性和/或稳定性的药学上可接受的载体。

用于本发明组合物的药用赋形剂和添加剂包括但不限于可单独或组合存在的蛋白、肽、氨基酸、脂质和碳水化合物(如糖类,包括单糖、二糖、三糖、四糖和寡糖;衍生的糖类,例如糖醇、醛糖酸、酯化的糖类等;以及多糖或糖聚合物),单独组成或按重量或体积计以1-99.99%包含于组合中。代表性的蛋白赋形剂包括血清白蛋白,例如人血清白蛋白(HSA)、重组人血清白蛋白(rHA),明胶,酪蛋白等。代表性的还能起缓冲容量作用的氨基酸/抗体组分包括丙氨酸、甘氨酸、精氨酸、甜菜碱、组氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、赖氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、阿斯巴甜糖等。一种优选的氨基酸为甘氨酸。

适用于本发明的碳水化合物赋形剂包括,例如,诸如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等的单糖;诸如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等的二糖;诸如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等的多糖;以及诸如甘露糖醇、木糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇山梨糖醇(山梨醇)、肌醇等的糖醇。优选的用于本发明的碳水化合物赋形剂为甘露糖醇、海藻糖和棉子糖。

抗IL-6抗体组合物还可包括缓冲剂或pH调节剂;代表性地,缓冲剂为制备自有机酸或碱的盐。代表性的缓冲剂包括有机酸盐、例如枸橼酸盐、抗坏血酸盐、葡萄糖酸盐、碳酸盐、酒石酸盐、琥珀酸盐、醋酸盐或酞酸盐;Tris、氨基丁三醇盐酸盐或磷酸盐缓冲剂。用于本发明组合物的优选的缓冲剂是有机酸盐,例如枸橼酸。

此外,本发明的抗IL-6抗体组合物可包括聚合物赋形剂/添加剂,例如聚乙烯吡咯烷酮、菲柯尔(聚糖)、葡萄糖结合剂(如环糊精,例如2-羟丙基- β -环糊精)、聚乙二醇、调味剂、抗微生物剂、增甜剂、抗氧化剂、抗静电剂、表面活性剂(如聚山梨醇酯,例如“吐温20”和“吐温80”)、脂质(如磷脂、脂肪酸)、类固醇(如胆固醇)和螯合剂(如EDTA)。

这些和其他已知的适用于根据本发明的抗IL-6抗体、部分或变体组合物的药用赋形剂和/或添加剂是本领域已知的,如列于"Remington: The Science & Practice of Pharmacy",第19版,Williams & Williams, (1995)和"Physician's Desk Reference",第52版,Medical

Economics, Montvale, NJ (1998)中的, 其内容在此完全并入作为参考。优选的载体或赋形剂物质是碳水化合物(如糖类和糖醇)和缓冲剂(如柠檬酸盐)或聚合物试剂。作例证的载体分子是可用于关节内递送的粘多糖、透明质酸。

配方

如上所述, 本发明提供了包含处于药学上可接受的配方中的至少一种抗 IL-6 抗体的稳定的配方, 其优选包含具有盐水或所选择的盐的磷酸盐缓冲剂和保存溶液, 和含有防腐剂的配方, 以及适合于药用或兽医用的多用途保存配方。保存配方含有处于含水稀释剂中的至少一种已知的防腐剂或任选地选自至少一种苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、苯汞基亚硝酸酯、苯氧乙醇、甲醛、氯丁醇、氯化镁(如六水合物)、烷基对羟苯甲酸酯(甲基、乙基、丙基、丁基等)、苯扎氯铵、苄索氯铵、甲醋吡喃酮钠和硫柳汞、聚合物或它们的混合物。如本领域中已知的, 可使用任何适合的浓度或混合, 例如约 0.0015%, 或其中的任何范围、值或分数。非限制性的例子包括, 不含有防腐剂、约 0.1-2% 间甲酚(如 0.2、0.3、0.4、0.5、0.9、1.0%)、约 0.1-3% 苯甲醇(如 0.5、0.9、1.1、1.5、1.9、2.0、2.5%)、约 0.001-0.5% 硫柳汞(如 0.005、0.01)、约 0.001-2.0% 苯酚(如 0.05、0.25、0.28、0.5、0.9、1.0%)、0.0005-1.0% 烷基对羟苯甲酸酯(如 0.00075、0.0009、0.001、0.002、0.005、0.0075、0.009、0.01、0.02、0.05、0.075、0.09、0.1、0.2、0.3、0.5、0.75、0.9、1.0%)等。

如上所述, 本发明提供了一种包含包装材料和至少一个含有至少一种抗 IL-6 抗体与任选地处于含水稀释剂中的给定的缓冲剂和/或防腐剂的溶液的管形瓶的产品, 其中所述包装包含标示这样的溶液可在 1、2、3、4、5、6、9、12、18、20、24、30、36、40、48、54、60、66、72 小时或更长的一段时间内保存的标签。本发明进一步包含一种包含包装材料、含有冻干的至少一种抗 IL-6 抗体的第一管形瓶, 和含有给定的缓冲剂或防腐剂的含水稀释剂的第二管形瓶, 其中所述包装材料包含指导患者在含水稀释剂中重建至少一种抗 IL-6 抗体以形成能保存 24 小时或更长的一段时间的溶液的标签。

如在此所述的或本领域已知的, 可通过包括来自哺乳动物细胞或转基因制备物的重组手段, 或可纯化自其他生物来源, 产生根据本发

明所使用的至少一种抗 IL-6 抗体。

本发明产物中至少一种抗 IL-6 抗体的范围包括重建所产生的量，若在湿/干系统中，则浓度为约 1.0 $\mu\text{g/ml}$ -约 1000 mg/ml ，尽管更低或更高的浓度是可操作的，并取决于预期的递送载体，如溶液配方应不同于透皮贴剂、肺、转化粘液质或渗透或微量泵法。

优选地，含水稀释剂任选地进一步包含药学上可接受的防腐剂。优选的防腐剂包括选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、烷基对羟苯甲酸酯(甲基、乙基、丙基、丁基等)、苯扎氯铵、苄索氯铵、甲醋吡喃酮钠和硫柳汞或它们的混合物的那些防腐剂。配方中所用的防腐剂的浓度为足以产生抗微生物效应的浓度。这样的浓度取决于所选择的防腐剂并易于为本领域技术人员所确定。

其他的赋形剂，如等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂和防腐增强剂，可任选且优选地添加到稀释剂中。诸如甘油的等渗剂通常在已知浓度下使用。优选添加生理学耐受的缓冲剂以提供改善的 pH 控制。配方可覆盖广泛的 pHs，例如从约 pH 4-约 pH 10，优选的范围为约 pH 5-约 pH 9，最优选的范围为约 6.0-约 8.0。优选地，本发明的配方具有约 6.8-约 7.8 的 pH。优选的缓冲剂包括磷酸盐缓冲剂，最优选磷酸钠，特别是磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

其他添加剂，例如药学上可接受的增溶剂象吐温 20(聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单月桂酸酯)、吐温 40(聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单棕榈酸酯)、吐温 80(聚氧乙烯(20)脱水山梨糖醇单油酸酯)、Pluronic F68(聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物)和 PEG(聚乙二醇)或非离子型表面活性剂，例如聚山梨醇酯 20 或 80 或泊洛沙姆 184 或 188、Pluronic®聚合物、其他的嵌段共聚物，以及螯合剂，例如 EDTA 和 EGTA，可任选地添加到配方或组合物中以减少聚集。如果泵或塑料容器用于施用配方，则这些添加剂特别有用。药学上可接受的表面活性剂的存在缓解了蛋白聚集的倾向。

可通过包括将至少一种抗 IL-6 抗体与处于含水稀释剂中的选自苯酚、间甲酚、对甲酚、邻甲酚、氯甲酚、苯甲醇、烷基对羟苯甲酸酯(甲基、乙基、丙基、丁基等)、苯扎氯铵、氯化苄乙氧铵、甲醋吡喃酮钠和硫柳汞或它们的混合物的防腐剂混合的方法制备本发明的配方。利用常规的溶解和混合方法进行至少一种抗 IL-6 抗体与处于含

水稀释剂中的防腐剂的混合。例如，以足以提供蛋白和防腐剂期望浓度的量将处于缓冲溶液中的已测定量的至少一种抗 IL-6 抗体与处于缓冲溶液中的期望的防腐剂结合以制备适合的配方。本领域技术人员应认识到该方法的改变。例如，组分添加顺序，是否使用额外的添加剂、制备配方时温度和 pH，是所有可对浓度以及所使用的给药手段进行优化的因素。

可将所要求保护的配方作为澄清溶液或作为二元管形瓶提供给患者，所述二元管形瓶包含用含有水、处于含水的稀释剂中的防腐剂和/或赋形剂，优选地磷酸盐缓冲液和/或盐水以及所选择的盐的第二管形瓶重建的冻干的至少一种抗 IL-6 抗体的一个管形瓶。单个溶液管形瓶或需要重建的二元管形瓶可多次再使用，并能满足单个或多个循环的患者治疗，并因此能提供较当前所能得到的更便利的治疗用药法。

本发明所要求保护的产品具有在从立即到 24 小时或更长的一段时间内给药的用途。因此，本发明所要求保护的产品提供给患者显著的利益。本发明的配方可任选地安全贮藏在约 2°C-约 40°C 的温度下并长期保持蛋白的生物活性，因此容许包装标签标示溶液可在 6、12、18、24、36、48、72 或 96 小时或更长的时间内保存和/或使用。如果使用防腐稀释剂，则这样的标签可包括长达 1-12 个月、半年、一年半和/或两年的使用期。

可通过包括混合处于含水稀释剂中的至少一种抗体的方法制备本发明的至少一种抗 IL-6 抗体的溶液。使用常规的溶解和混合方法进行混合。例如，以足以提供蛋白和任选地防腐剂或缓冲剂期望浓度的量将处于水或缓冲剂中的已测定量的至少一种抗体结合以制备适合的稀释剂。本领域技术人员应认识到该方法的改变。例如，组分添加顺序，是否使用额外的添加剂、制备配方时温度和 pH，是所有可对浓度以及所使用的给药手段进行优化的因素。

可将所要求保护的产品作为澄清溶液或作为二元管形瓶提供给患者，所述二元管形瓶包含用含有含水的稀释剂的第二管形瓶重建的冻干的至少一种抗 IL-6 抗体的一个管形瓶。单个溶液管形瓶或需要重建的二元管形瓶可多次再使用，并能满足单个或多个循环的患者治疗，并因此能提供较当前所能得到的更便利的治疗用药法。

所要求保护的产品可通过提供澄清溶液或包含用含有含水的稀释剂的二元管形瓶重建的冻干的至少一种抗 IL-6 抗体的一个管形瓶的二元管形瓶给药、诊所或其他这样的机构和设施,间接提供给患者。倘若较少一部分的至少一种抗体溶液能一次或多次从大的容器中取出用于转移到较小的管形瓶中并通过药房或诊所提供给它们的消费者和/或患者,则在该情况下,澄清溶液体积可多达一升或甚至更大。

公认的包含单个管形瓶系统的装置包括用于递送溶液笔形注射器装置,例如 BD Pens, BD Autojector[®], Humaject[®],

NovoPen[®], B-D[®]Pen, AutoPen[®], 和 OptiPen[®], GenotropinPen[®], Genotronorm Pen[®], Humatro Pen[®], Reco-Pen[®], Roferon Pen[®], Biojector[®], Iject[®], J-tip Needle-Free Injector[®], Intraject[®], Medi-Ject[®], 如 Becton

Dickensen (Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com), Disetronic (Burgdorf,

Switzerland, www.disetronic.com; Bioject, Portland, Oregon (www.bioject.com);

National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK, [www.weston-](http://www.weston-medical.com)

[mediject.com](http://www.mediject.com)), Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, www.mediject.com),

所制造或开发的,以及类似的适合装置。公认的包含二元管形瓶系统的装置包括用于在供递送重建溶液的药筒中重建冻干药物的那些笔形注射器系统,例如 HumatroPen[®]。其他适合装置的例子包括预装注射器、自动注射器、无针头注射器和无针头静脉内输液器具。

本发明所要求保护的产品包括包装材料。包装材料除管理机构所要求的信息之外,还提供了使用产品的条件。对于二元管形瓶的湿/干产品,本发明的包装材料提供给患者在含水稀释剂中重建至少一种抗 IL-6 抗体以形成溶液并在 2-24 小时或更长的一段时间内使用该溶液的指导。对于单个管形瓶的溶液产品,标签标示了这样的溶液可在 2-24 小时或更长的一段时间内使用。本发明所要求保护的产品具有人药用产品的用途。

可通过包括将至少一种抗 IL-6 抗体与所选择的缓冲剂,优选地,含有盐水或所选择的盐的磷酸盐缓冲剂混合方法制备本发明的配方。使用常规的溶解和混合方法进行至少一种抗 IL-6 抗体和处于含水稀释剂中的缓冲剂的混合。例如,以足以提供蛋白和缓冲剂期望浓度的量将处于水或缓冲剂中的已测定量的至少一种抗体与处于水中的

期望的缓冲剂结合以制备适合的配方。本领域技术人员应认识到该方法的改变。例如，组分添加顺序，是否使用额外的添加剂、制备配方时温度和 pH，是所有可对浓度以及所使用的给药手段进行优化的因素。

所要求保护的稳定的或保存配方可作为澄清溶液或作为二元管形瓶提供给患者，所述二元管形瓶包含用含有处于含水稀释剂中的防腐剂或缓冲剂以及赋形剂的第二管形瓶重建的冻干的至少一种抗 IL-6 抗体的一个管形瓶。单个溶液管形瓶或需要重建的二元管形瓶可多次再使用，并能满足单个或多个循环的患者治疗，并因此能提供较当前所能得到的更便利的治疗用药法。

除包含抗体的冻干粉末澄清溶液之外，可产生其他稳定的抗 IL-6 抗体的配方或方法。非澄清溶液之一的是包含颗粒混悬液的配方，所述颗粒为具有可变尺寸结构的含有抗 IL-6 抗体的组合物，已知的多种颗粒为微球、微粒(microparticle)、毫微粒、毫微球或脂质体。按照 U.S. 4,589,330 中的教导，可通过将含有活性剂的水相和聚合物及非水相接触，之后蒸发非水相以使来自水相的颗粒聚结，从而生成这样的含有活性剂的相对均质的、基本上球形的颗粒配方。按照 U.S. 4,818,542 中的教导，可使用含有活性剂的第一相和分散于连续溶剂中的聚合物，并通过冷冻干燥或稀释-萃取-沉淀从混悬液中除去所述溶剂，从而制备多孔微粒。优选的用于这样的制剂的聚合物为选自明胶、琼脂、淀粉、阿拉伯半乳聚糖、白蛋白、胶原、聚乙醇酸、聚乳酸、乙交酯-L(-)丙交酯、聚(ϵ -己内酯)、聚(ϵ -己内酯-CO-乳酸)、聚(ϵ -己内酯-CO-乙醇酸)、聚(β -羟基丁酸)、聚环氧乙烯、聚乙烯、聚(烷基-2-氰基丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸羟乙酯)、聚酰胺、聚(氨基酸)、聚(2-羟乙基 DL-天冬酰胺)、聚(脲酯)、聚(L-苯丙氨酸/乙二醇/1,6-二异氰酸己烷)和聚(甲基丙烯酸甲酯)的天然或合成的共聚物或聚合物。特别优选的聚合物为聚酯，例如聚乙醇酸、聚乳酸、乙交酯-L(-)丙交酯、聚(ϵ -己内酯)、聚(ϵ -己内酯-CO-乳酸)和聚(ϵ -己内酯-CO-乙醇酸)。用于溶解聚合物和/或活性成分的溶剂包括：水、六氟异丙醇、二氯甲烷、四氢呋喃、己烷、苯或六氟丙酮倍半水合物。用第二相分散含有活性成分的相的方法可包括施压所述第一相通过喷孔以形成微滴。

可使用不同于冻干的方法产生干粉配方，例如通过喷雾干燥或蒸

发溶剂萃取或沉淀结晶组合物，之后的一步或多步是除去含水或非水溶剂。在 U.S. 6,019,968 中教导了喷雾干燥的抗体制剂的制备。在提供可呼吸的干粉条件下，可通过喷雾干燥处于溶剂中的抗体和任选地赋形剂的溶液或淤浆产生基于抗体的干粉组合物。溶剂可包括极性化合物，例如能容易地干燥的水和乙醇。可通过进行无氧喷雾干燥操作增强抗体稳定性，例如在氮气层下或通过利用氮气作为干燥气体。另一种相对干燥的配方是按照 WO 9916419 中的教导将大量多孔微结构分散于通常包含氢氟代烷抛射剂的悬浮介质中的分散物。利用计量吸入器可将该稳定的分散物施用于患者的肺。Buchi Ltd.或 Niro Corp 制造了喷雾干燥药物商业制备中所使用的装备。

依据本发明通过多种递送方法可将处于在此所述的稳定的或保存配方或溶液中的至少一种抗 IL-6 抗体施用于患者，所述递送方法包括如本领域众所周知的 SC 或 IM 注射；经皮、肺、转化粘液质、植入、渗透泵、药筒、微量泵或为本领域技术人员所理解的其他手段。

治疗应用

本发明还提供了一种用于调节或治疗如本领域已知的或在此所述的细胞、组织、器官、动物或患者中至少一种 IL-6 有关的疾病的方法，所述方法使用了至少一种本发明的 IL-6 抗体，如将治疗有效量的 IL-6 抗体施用或接触细胞、组织、器官、动物或患者。本发明还提供了一种用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中至少一种 IL-6 有关的疾病的方法，所述 IL-6 有关的疾病包括但不限于，至少一种的肥胖症、免疫相关疾病、心血管疾病、传染病、恶性病或神经疾病。

本发明还提供了一种用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中至少一种 IL-6 有关的免疫相关疾病的方法，所述 IL-6 有关的免疫相关疾病包括但不限于至少一种的类风湿性关节炎、儿童类风湿性关节炎、全身发作的青少年类风湿性关节炎、牛皮癣性关节炎、强直性脊椎炎、胃溃疡、血清(反应)阴性关节病、骨关节炎、骨质溶解、外科埋植剂的无菌松弛、炎性肠病、溃疡性结肠炎、全身性红斑狼疮、皮肤红斑狼疮、狼疮肾炎、抗磷脂综合征、虹膜睫状体炎/葡萄膜炎/视神经炎、特发性肺纤维变性、系统性血管炎/韦格内氏肉芽肿症、肉样瘤病、睾丸炎/输精管切除术逆转过程、变应性/特应性疾病、哮喘、过敏性鼻炎、湿疹、过敏性接触性皮炎、变应性结膜炎、过敏性肺炎、

移植物、器官移植排斥、移植物抗宿主病、全身炎症反应综合征、脓毒症综合征、革兰氏阳性脓毒症、革兰氏阴性脓毒症、培养物阴性脓毒症、真菌脓毒症、中性白细胞减少症发热、尿脓毒症、脑膜炎球菌血症、创伤/出血、烧伤、电离辐射暴露、急性胰腺炎、成人呼吸窘迫综合征、类风湿性关节炎、酒精诱导的肝炎、慢性炎症性病理、肉样瘤病、Crohn 氏病理、镰状细胞性贫血、糖尿病、肾病、特应性疾病、超敏反应、变应性鼻炎、花粉热、常年性鼻炎、结膜炎、子宫内膜异位、哮喘、风疹、全身过敏、皮炎、恶性贫血、溶血性疾病、血小板减少(症)、任何器官或组织的移植物排斥、肾移植排斥、心脏移植排斥、肝移植排斥、胰腺移植排斥、肺移植排斥、骨髓移植(BMT)排斥、同种移植皮片排异反应、软骨移植排斥、骨移植物排斥、小肠移植排斥、胎儿胸腺植入排斥、甲状旁腺移植排斥、任何器官或组织的异种移植物排斥、同种异体移植物排斥、抗受体超敏反应、格雷夫斯病、雷诺(氏)病、B 型胰岛素抵抗性糖尿病、哮喘、重症肌无力、抗体介导的细胞毒性、DI 型超敏反应、POEMS 综合征(多发性神经病、器官巨大症、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病和皮肤变化综合征)、多发性神经病、器官巨大症、内分泌病、单克隆丙种球蛋白病、皮肤变化综合征、抗磷脂综合征、天疱疮、硬皮症、混合性结缔组织病、原发性阿狄森(氏)病、糖尿病、慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬变、白斑病、血管炎、MI 后心切开术综合征、IV 型过敏症、接触性皮炎、过敏性肺炎、同种异体移植物排斥、由于细胞内生物体的肉芽肿、药物过敏、代谢病/自发病、威尔逊氏病、血色素沉着症、 α -1-抗胰蛋白酶缺乏、糖尿病性视网膜病、桥本甲状腺炎、骨质疏松症、下丘脑-垂体-肾上腺轴评估、原发性胆汁性肝硬变、甲状腺炎、脑脊髓炎、恶病质、纤维囊泡症、新生儿慢性肺病、慢性阻塞性肺病 (COPD)、家族性噬血细胞淋巴组织细胞增多病 (familial hematophagocytic lymphohistiocytosis)、皮肤用药病症、牛皮癣、秃顶、肾病综合征、肾炎、肾小球肾炎、急性肾功能衰竭、血液透析、尿毒症、中毒、先兆子痫、okt3 疗法、抗 cd3 疗法、细胞因子疗法、化学疗法、放射疗法(如包括但不限于乏力、贫血、恶病质等)、慢性水杨酸盐中毒等。参见如 Merck Manual, 第 12-17 版, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook,

Wells 等, 编, 第 2 版, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), 各自完全并入作为参考。

本发明还提供了一种用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中至少一种心血管疾病的方法, 所述心血管疾病包括但不限于至少一种的心脏 stun 综合征(cardiac stun syndrome)、心肌梗塞、充血性心力衰竭、中风、缺血性发作、出血、急性冠状动脉综合征、动脉硬化、动脉粥样硬化、再狭窄、糖尿病粥样硬化病(diabetic atherosclerotic disease)、高血压、动脉性高血压、肾血管性高血压、晕厥、休克、心血管系统梅毒、心力衰竭、肺(原)性心脏病、原发性肺动脉高压、心律失常、心房异位性搏动、心房扑动、心房颤动(持续性或突发性)、灌注后综合征、心肺分流术炎症反应、紊乱性或多源性房性心动过速、规律性窄 QRS 心动过速、特殊心律失常、心室颤动、希氏束心律失常(His bundle arrhythmias)、房室性传导阻滞、束支传导阻滞、心肌局部缺血性病症、冠状动脉疾病、心绞痛、心肌梗塞、心肌病、扩张性充血性心肌病、限制性心肌病、心脏瓣膜疾病、心内膜炎、心包疾病、心脏肿瘤、主动脉和周围性动脉瘤、主动脉壁夹层形成、主动脉炎症、腹主动脉及其分支闭塞、外周血管病症、闭塞性动脉病症、周围动脉粥样硬化疾病(peripheral atherosclerotic disease)、血栓闭塞性脉管炎、机能性周围动脉病症、雷诺氏现象和疾病、手足发绀、红斑性肢痛、静脉疾病、血栓静脉炎、曲张静脉、动静脉瘘、淋巴水肿、脂肪水肿、不稳定心绞痛、再灌注损伤、泵后综合征(post pump syndrome)、缺血-再灌注损伤等。这样的方法可任选地包括施用有效量的包含至少一种抗 IL-6 抗体的组合物或药物组合物于需要这样的调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者。

本发明还提供了一种用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中至少一种 IL-6 有关的传染病的方法, 所述 IL-6 有关的传染病包括但不限于至少一种的: 急性或慢性细菌感染、急性或慢性寄生或传染过程、包括细菌、病毒和真菌感染、HTV 感染/HIV 神经病变、脑膜炎、肝炎(如甲型、乙型或丙型等)、脓毒性关节炎、腹膜炎、肺炎、会厌炎、大肠杆菌 0157:h7、溶血性尿毒症综合征/溶栓性血小板减少性紫癜、疟疾、登革出血热、利什曼病、麻风病、中毒性休克综合征、链球菌肌炎、气性坏疽、结核分支杆菌、鸟分枝杆菌胞内寄生

菌、卡氏肺囊虫性肺炎、盆腔炎症性疾病、睾丸炎/附睾炎、军团杆菌、莱姆病、甲型流感、EB 病毒、病毒相关的噬血细胞综合征、病毒性脑炎/无菌脑膜炎等。

本发明还提供了一种用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中至少一种 IL-6 有关的恶性病的方法，所述 IL-6 有关的恶性病包括但不限于至少一种的：白血病、急性白血病、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性淋巴细胞性白血病、B-细胞、T-细胞或 FAB ALL、急性骨髓性白血病(AML)、急性髓性白血病、慢性粒细胞性白血病(CML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、毛细胞白血病、骨髓增生异常综合征(MDS)、淋巴瘤、何杰金氏病、恶性淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、多发性骨髓瘤、卡波济氏肉瘤、结肠直肠癌、胰腺癌、鼻咽癌、恶性组织细胞增多症、瘤外综合征/恶性高钙血(特发性)综合征、实体瘤、膀胱癌、乳腺癌、结直肠癌、子宫内膜癌、头癌、颈癌、遗传性非息肉癌、何杰金(氏)淋巴瘤、肝癌、肺癌、非小细胞肺癌、卵巢癌、胰癌、前列腺癌、肾细胞癌、睾丸癌、腺癌、肉瘤、恶性黑色素瘤、血管瘤、肿瘤转移性疾病,癌有关的骨吸收、癌有关的骨痛等。

本发明还提供了一种用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中至少一种 IL-6 有关的神经疾病的方法，所述 IL-6 有关的神经疾病包括但不限于至少一种的：神经变性疾病、多发性硬化症、偏头痛、AIDS 痴呆综合征、脱髓鞘性病，例如多发性硬化和急性横贯性脊髓炎；锥体束外和小脑病症，例如皮质脊髓系统损害；基底神经节病症；运动机能亢进的运动障碍，例如亨廷顿氏舞蹈病和老年性舞蹈病；药物诱发的运动障碍，例如为阻断 CNS 多巴胺受体的药物所诱发的那些病症；运动机能减退的运动障碍，例如帕金森病；进行性前核麻痹(Progressive supranucleo Palsy)；小脑结构损害；脊髓小脑变性，例如脊髓性共济失调，弗里德赖希(氏)共济失调，小脑皮质变性，多系统变性病(Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager 和 Machado-Joseph)；全身性病症(雷弗素姆(氏)病，abetalipoproteinemia，共济失调，毛细血管扩张和线粒体多系统病症)；脱髓鞘核病症(demyelinating core disorders)，例如多发性硬化，急性横贯性脊髓炎；以及运动单元病症例如神经性肌萎缩(前角细胞变性，例如肌萎缩性(脊髓)侧索硬化、

婴儿型脊髓性肌萎缩和青少年脊髓性肌萎缩); 阿尔茨海默氏病; 中年人中的唐氏综合征; 弥漫性 Lewy 体疾病; Lewy 体型老年性痴呆; 韦尼克-科尔萨科夫综合征; 慢性醇中毒; 克罗伊茨费尔特-雅各布病; 亚急性硬化性全脑炎、Hallerrorden-Spatz 病; 拳击员痴呆; 神经外伤(如脊髓损伤、脑损伤、脑震荡、重复性脑震荡); 疼痛; 炎性痛; 孤独症; 抑郁症; 中风; 认知障碍; 癫痫等。这样的方法可任选地包括施用有效量的包含至少一种 TNF 抗体或特定部分或变体的组合物或药物组合物于需要这样的调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者。参见如 the Merck Manual, 第 16 版, Merck & Company, Rahway, NJ (1992)。

本发明还提供了一种用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中至少一种 IL-6 有关的创伤、外伤或组织损害或有关的慢性病症的方法, 所述 IL-6 有关的创伤、外伤或组织损害或有关的慢性病症包括但不限于, 至少一种的: 与包括牙周外科手术、拔牙、牙髓治疗、牙齿植入物的插入、牙齿修复术的应用和使用的口腔外科手术有关的身体损伤或外伤; 或其中创伤为选自无菌创伤、挫伤、割伤、裂伤、非穿透伤、开放性创伤、贯通创伤、穿破创伤、刺伤、染毒创伤、梗塞形成和皮下创伤; 或其中创伤为选自缺血性溃疡、缺血性溃疡、瘰管、严重咬伤、热灼伤和供体部位创伤; 或其中创伤为口疮创伤、外伤性创伤或疱疹有关的创伤。

创伤和/或溃疡通常见于皮肤突出部分或粘膜表面上或为器官梗塞形成(“中风”)之结果。创伤可以是软组织缺损或损害或潜在病症的结果。在本发明上下文中, 术语“皮肤”涉及包括人的动物的身体的最外层表面, 并包含未受损的或几乎未受损的皮肤以及受损的皮肤表面。术语“粘膜”涉及未受损的或受损的诸如人的动物的粘膜, 可以是口腔粘膜、颊粘膜、耳粘膜、鼻粘膜、肺粘膜、眼粘膜、胃肠粘膜、阴道粘膜或直肠粘膜。

在本发明上下文中, 术语“创伤”指具有组织结构正常完整性破坏的身体损伤。该术语还意在包含术语“疮”、“损害”、“坏死”和“溃疡”。一般地, 术语“疮”是几乎所有皮肤或粘膜损害的通用术语, 以及术语“溃疡”是产生自坏死组织脱落的器官或组织表面的局部缺损或陷凹。损害通常与任何组织缺损有关。坏死与感染、损伤、

炎症或梗塞形成所产生的死亡组织有关。

用于本发明上下文中的术语“创伤”指任何创伤(参见以下对创伤的分类)并在治愈过程中处于任何特定阶段,包括在任何愈合开始之前的阶段或甚至在产生特定的创伤象外科切口(预防性治疗)之前的阶段。根据本发明可被预防和/或治疗的创伤的例子为,如无菌创伤、挫伤、割伤、裂伤、非穿透伤(即其中皮肤未受破坏,但其下结构受损害的创伤)、开放性创伤、贯通创伤、穿破创伤、刺伤、染毒创伤、皮下创伤等。疮的例子为褥疮(bed sores)、口疮、铬毒性溃疡、感冒疮、褥疮(pressure sores)等。溃疡的例子为,如消化性溃疡、十二指肠溃疡、胃溃疡、痛风溃疡、糖尿病性溃疡、高血压缺血性溃疡、淤积性溃疡、小腿溃疡(静脉曲张性溃疡)、舌下溃疡、粘膜下溃疡、症状性溃疡、营养不良性溃疡、热带溃疡和如淋病(包括尿道炎、子宫颈内膜炎和直肠炎)所引起的软下疳。根据本发明可成功治疗的与创伤或疮有关的病症为烧伤、炭疽、破伤风、气性坏疽、猩红热、丹毒、寻常须疮、毛囊炎、触染性脓疱病或大疱性脓疱病等。在术语“创伤”和“溃疡”以及“创伤”和“疮”的使用之间,通常有一定程度的重叠,此外,这些术语通常可任意使用。因此,如上所述,在本发明上下文中,术语“创伤”包括术语“溃疡”、“损害”、“疮”和“梗塞形成”,除非另有陈述,否则这些术语可无差别地使用。

根据本发明被治疗的创伤的种类还包括(i) 一般创伤,例如外科、外伤性、感染性、局部缺血性、热、化学和大疱创伤;(ii) 口腔特有的创伤,例如拔牙后创伤,牙髓创伤尤其是与脓胞和脓肿、细菌、病毒或自身免疫源溃疡和损伤、机械、化学、热、感染和苔藓样伤口治疗有关的创伤;疱疹溃疡,口疮性口炎,急性坏死性溃疡性龈炎和口腔烧灼综合征是具体的例子;和(iii) 皮肤伤口,例如赘生物、烧伤(如化学烧伤、热烧伤)、损伤(细菌、病毒、自身免疫)、咬伤和外科切口。另一种创伤分类方式为(i) 由于外科切口、较小的擦破和较小的咬伤所致的小的组织损失,或(ii) 明显的组织损失。后一组包括缺血性溃疡、褥疮、瘰管、裂伤、严重咬伤、热灼伤和供体部位创伤(在软组织和硬组织中)以及梗塞形成。

其他与本发明有关的重要创伤为诸如缺血性溃疡、褥疮、瘰管、严重咬伤、热灼伤和供体部位创伤的创伤。缺血性溃疡和褥疮是通常

只愈合得非常缓慢的创伤且特别在这样的情况下,改善的和快速的愈合过程对于患者当然是非常重要的。此外,当愈合得以改善并且更加快速时,与患有这样的创伤的患者治疗有关花费就会显著减少。

供体部位创伤为例如在与从身体一部分移除硬组织到身体另一部分有关的所出现的创伤,如与移植有关的创伤。这样的操作所产生的创伤非常疼痛,因此改善的愈合是最有价值的。术语“皮肤”以非常广泛的含义使用,包括皮肤的表皮层和—在其中皮肤表面或多或少受损的那些情况—还包括皮肤的真皮层。除角质层之外,皮肤的表皮层是外(上皮)层,更深的皮肤结缔组织层称为真皮。

本发明提供了一种用于调节或治疗细胞、组织、器官、动物或患者中骨关节炎、全身性红斑狼疮、皮肤红斑狼疮、狼疮肾炎、II型糖尿病和慢性阻塞性肺病,以及如上所列的 IL-6 有关的其他疾病的方法,所述 IL-6 有关的其他疾病包括但不限于,至少一种的免疫相关疾病、心血管疾病、传染病、恶性病和/或神经疾病。这样的方法可任选地包括施用有效量的包含至少一种抗 IL-6 抗体的组合物或药物组合物于需要这样的调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者。

任何本发明的方法可包括施用有效量的包含至少一种抗 IL-6 抗体的组合物或药物组合物于需要这样的调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者。这样的方法可任选地进一步包括用于治疗这样的疾病或病症的同时给药或联合治疗,其中所述至少一种抗 IL-6 抗体、其特定部分或变体的施用进一步包括在其施用之前、同时和/或之后施用选自至少一种 TNF 拮抗剂(如但不限于 TNF 化学或蛋白拮抗剂、TNF 单克隆或多克隆抗体或片段,可溶性 TNF 受体(如 p55、p70 或 p85)或片段,它们的融合多肽,或小分子 TNF 拮抗剂,如 TNF 结合蛋白 I 或 II(TBP-I 或 TBP-II)、nerelimomab、英夫利昔单抗、依那西普、CDP-571、CDP-870、阿非莫单抗、来那西普等)、抗风湿药(如氨甲蝶呤、金诺芬、硫代葡萄糖金、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟米特、柳氮磺胺吡啶)、肌肉松弛药、麻醉药、非甾体抗炎药(NSAID)、镇痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉药、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂(如氨基葡萄糖苷、抗真菌药、抗寄生虫药、抗病毒药、碳(杂)青霉烯、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺、四环素、其他抗微生物剂)、抗牛皮癣剂、皮质甾类、促蛋白合

成甾类、糖尿病有关的药物、矿物质、营养物、甲状腺剂、维生素、钙有关的激素、止泻剂、镇咳药、止吐药、抗溃疡药、轻泻药、抗凝血剂、促红细胞生成素(如重组人肾红细胞生成素)、非格司亭(如 G-CSF, Neupogen)、沙莫司亭(GM-CSF, Leukine)、免疫接种、免疫球蛋白、免疫抑制剂(如巴利昔单抗、环孢霉素、达(克)珠单抗)、生长激素、激素置换药、雌激素受体调节剂、扩瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢药、有丝分裂抑制剂、防辐射药、抗抑郁药、抗躁狂剂、抗精神病药、抗焦虑剂、催眠药、拟交感神经药、兴奋剂、多奈哌齐、他克林、哮喘药、 β 激动剂、吸入的甾类、白细胞三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、色甘酸、肾上腺素或类似物、 α 链道酶(Pulmozyme)、细胞因子或细胞因子拮抗剂的至少一种。适合的剂量是本领域众所周知的。参见如 Wells 等, 编, 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); Nursing 2001 Handbook of Drugs, 第 21 版, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; Health Professional's Drug Guide 2001, 编辑, Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ., 每篇文献均在此完全并入作为参考。

适合于本发明组合物、联合治疗、同时给药、装置和/或方法(进一步包含至少一种本发明的抗体、其特定部分和变体)的 TNF 拮抗剂包括但不限于, 抗 TNF 抗体(如至少一种如以上定义的 TNF 拮抗剂)、其抗原结合片段和特异性结合 TNF 的受体分子; 阻止和/或抑制 TNF 合成、TNF 释放或其对靶细胞作用的化合物, 例如沙立度胺、替尼达普、磷酸二酯酶抑制剂(如己酮可可碱和咯利普兰)、A2b 腺苷受体激动剂和 A2b 腺苷受体增强剂; 阻止和/或抑制 TNF 受体信号传导的化合物, 例如有丝分裂原激活蛋白(MAP)激酶抑制剂; 阻断和/或抑制膜 TNF 切割的化合物, 例如金属蛋白酶抑制剂; 阻断和/或抑制 TNF 活性的化合物, 例如血管紧张素转化酶(ACE)抑制剂(如卡托普利); 以及阻断和/或抑制 TNF 产生和/或合成的化合物, 例如 MAP 激酶抑制剂。

在此使用的“肿瘤坏死因子抗体”、“TNF 抗体”、“TNF α 抗体”或片段等减少、阻断、抑制、消除或干扰 TNF α 体外、原位和/或优选地体内活性。例如, 适合的本发明的 TNF 人抗体可结合 TNF α

并包括抗 TNF 抗体、其抗原结合片段、以及特定突变体或其特异性结合 TNF α 的结构域。适合的 TNF 抗体或片段还可减少、阻断、消除、干扰、阻止和/或抑制 TNF RNA、DNA 或蛋白合成, TNF 释放, TNF 受体信号传导, 膜 TNF 切割, TNF 活性, TNF 产生和/或合成。

一个 TNF 抗体或拮抗剂的例子为嵌合抗体 cA2。本领域中描述了另外的可用于本发明中的单克隆抗 TNF 抗体的例子(参见如 U.S.专利号 5,231,024; Möller, A. 等, *Cytokine* 2(3): 162-169 (1990); U.S.申请号 07/943,852 (1992 年 9 月 11 日提交的); Rathjen 等, 国际公开号 WO 91/02078 (1991 年 2 月 21 日公布的); Rubin 等, EPO 专利公开号 0 218 868 (1987 年 4 月 22 日公布的); Yone 等, EPO 专利公开号 0 288 088 (1988 年 10 月 26 日); Liang, 等, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 237:847-854 (1986); Meager, 等, *Hybridoma* 6:305-311 (1987); Fendly 等, *Hybridoma* 6:359-369 (1987); Bringman, 等, *Hybridoma* 6:489-507 (1987); 和 Hirai, 等, *J. Immunol. Meth.* 96:57-62 (1987)。

TNF 受体分子

用于本发明中的优选的 TNF 受体分子是那些以高亲和力结合 TNF α 以及任选地具有低免疫原性的受体分子(参见如 Feldmann 等, 国际公开号 WO 92/07076 (1992 年 4 月 30 日公布的); Schall 等, *Cell* 67:361-370 (1990); 和 Loetscher 等, *Cell* 67:351-359 (1990), 这些文献在此完全并入作为参考)。特别是, 在本发明中使用 55 kDa (p55 TNF-R)和 75 kDa (p75 TNF-R) TNF 细胞表面受体。包含受体胞外域(ECD)或其功能部分的这些受体的截短形式(参见如 Corcoran 等, *Eur. J. Biochem.* 223:831-840 (1994))也用于本发明。已在尿液和血清中检测到包含 ECD 的 TNF 受体截短形式, 分别为 30 kDa 和 40 kDa TNF α 抑制结合蛋白(Engelmann, H. 等, *J. Biol. Chem.* 265:1531-1536 (1990))。TNF 受体多聚体分子和 TNF 免疫受体融合分子及其衍生物和片段或部分是用用于本发明方法和组合物的额外的 TNF 受体的例子。

用于本发明的 TNF 受体多聚体分子包含通过一个或多个多肽接头或诸如聚乙二醇(PEG)的其他非肽接头连接的两个或更多个 TNF 受体的 ECD 的全部或功能部分。这样的 TNF 免疫受体融合分子的一个例子为 TNF 受体/IgG 融合蛋白。本领域中业已描述了 TNF 免疫受体融合分子和产生其的方法(Lesslerer 等, *Eur. J. Immunol.* 27:2883-2886

(1991); Ashkenazi 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 10535-10539 (1991); Peppel 等, *J. Exp. Med.* 774:1483-1489 (1991); KoUs 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:215-219 (1994); Butler 等, *Cytokine* 6(6):616-623 (1994); Baker 等, *Eur. J. Immunol.* 24:2040-2048 (1994); Beutler 等, U.S.专利号 5,447,851;和 U.S.申请号 08/442,133 (1995年5月16日提交的), 每篇文献均在此完全并入作为参考)。用于产生免疫受体融合分子的方法还可见于 Capon 等, U.S.专利号 5,116,964; Capon 等, U.S.专利号 5,225,538 和 Capon 等, *Nature* 357:525-531 (1989), 这些文献在此完全并入作为参考。

细胞因子包括任何已知的细胞因子。参见如 CopewithCytokines.com。细胞因子拮抗剂包括但不限于任何抗体、片段或模拟物, 任何可溶性受体、片段或模拟物, 任何小分子拮抗剂或它们的任何组合。

治疗处理

任何本发明的方法可包括用于治疗 IL-6 介导的病症的方法, 包括施用有效量的包含至少一种抗 IL-6 抗体的组合物或药物组合物于需要这样的调节、处理或治疗的细胞、组织、器官、动物或患者。这样的方法可任选地进一步包括用于治疗这样的疾病或病症的同时给药或联合治疗, 其中所述至少一种抗 IL-6 抗体、其特定部分或变体的施用进一步包括在其施用之前、同时和/或之后施用选自抗感染药、心血管(CV)系统药、中枢神经系统(CNS)药、植物性神经系统(ANS)药、呼吸道药、胃肠(GI)道药、激素药、用于水或电解质平衡的药物、血液学药物、抗肿瘤剂、免疫调节药、眼药、耳药或鼻药、局部用药物、营养药等、至少一种 TNF 拮抗剂(如但不限于 TNF 抗体或片段、可溶性 TNF 受体或片段, 它们的融合蛋白或小分子 TNF 拮抗剂)、抗风湿药(如氨甲蝶呤、金诺芬、硫代葡萄糖金、硫唑嘌呤、依那西普、硫代苹果酸金钠、硫酸羟氯喹、来氟米特、柳氮磺胺吡啶)、肌肉松弛药、麻醉药、非甾体抗炎药(NSAID)、镇痛药、麻醉剂、镇静剂、局部麻醉药、神经肌肉阻断剂、抗微生物剂(如氨基葡萄糖苷、抗真菌药、抗寄生虫药、抗病毒药、碳(杂)青霉烯、头孢菌素、氟喹诺酮、大环内酯、青霉素、磺胺、四环素、其他抗微生物剂)、抗牛皮癣剂、皮质甾类、促蛋白合成甾类、糖尿病有关的药物、矿物质、营养物、甲状腺剂、维生素、

钙有关的激素、止泻剂、镇咳药、止吐药、抗溃疡药、轻泻药、抗凝血剂、促红细胞生成素(如重组人肾红细胞生成素)、非格司亭(如 G-CSF, Neupogen)、沙莫司亭(GM-CSF, Leukine)、免疫接种、免疫球蛋白、免疫抑制剂(如巴利昔单抗、环孢霉素、达(克)珠单抗)、生长激素、激素置换药、雌激素受体调节剂、扩瞳剂、睫状肌麻痹剂、烷化剂、抗代谢药、有丝分裂抑制剂、防辐射药、抗抑郁药、抗躁狂剂、抗精神病药、抗焦虑剂、催眠药、拟交感神经药、兴奋剂、多奈哌齐、他克林、哮喘药、 β 激动剂、吸入的甾类、白细胞三烯抑制剂、甲基黄嘌呤、色甘酸、肾上腺素或类似物、 α 链道酶(Pulmozyme)、细胞因子或细胞因子拮抗剂的至少一种。这样的药物为本领域众所周知, 包括每种药物的成分、适应症、剂量和服药法都列于此(参见如 Nursing 2001 Handbook of Drugs, 第 21 版, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; Health Professional's Drug Guide 2001, 编辑, Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; Pharmacotherapy Handbook, Wells 等., 编, Appleton & Lange, Stamford, CT, 各自在此完全并入作为参考)。

典型地, 通过施用有效量或剂量的至少一种抗 IL-6 抗体组合物进行病理状况的治疗, 取决于组合物中所含有的活性剂的比活性, 有效量或剂量合计平均至少约 0.01-500 毫克至少一种抗 IL-6 抗体/公斤患者/剂量, 以及优选地, 至少约 0.1-100 毫克抗体/公斤患者/剂量或多次施用。或者, 有效的血清浓度可包括 1-5000 $\mu\text{g/ml}$ 血清浓度/单次或多次施用。适合的剂量为医学从业者所知, 且当然应取决于具体的疾病状况、施用的组合物的比活性以及患者所经历的具体治疗。在某些情况下, 为达到期望的治疗量, 可能需要提供重复施用, 即重复具体监测或计量的剂量的单独施用, 其中重复单独施用直至达到期望的日剂量或效果为止。

优选的剂量可任选地包括约 0.1-99 和/或 100-500 mg/kg/给药, 或其他的任何范围、值或分数, 或达到约 0.1-5000 $\mu\text{g/ml}$ 血清浓度/单次或多次施用的血清浓度, 或其他的任何范围、值或分数。优选的本发明抗 IL-6 抗体的剂量范围为每公斤患者体重约 1 mg 至约 3、约 6 或约 12 mg。

或者, 给药剂量可依诸如具体药剂的药效特性以及其给药方式和

途径；受者年龄、健康和体重；症状的性质和程度，联合治疗的类型，治疗频率以及期望效果的已知因素而改变。活性成分的剂量一般可为每公斤体重约 0.1-100 mg。通常为 0.1-50，以及优选地为 0.1-10 mg/kg/给药或为以有效获得期望结果的持续释放形式。

作为非限制性的例子，利用单次、输注或多次剂量，在 1-40 天的至少一天，或在 1-52 周的至少一周，或在 1-20 年的至少一年，或它们的任何组合，提供每天约 0.1-100 mg/kg 或其的任何范围、值或分数的至少一种本发明抗体的一次或周期剂量作为人或动物的治疗。

每单位或容器的适合于体内给药的剂型(组合物)通常含有约 0.001 mg-约 500 mg 的活性成分。在这些药物组合物中，活性成分通常以基于组合物总重按重量计约 0.5-99.999% 的量存在。

为了肠胃外给药，抗体可与药学上可接受的肠胃外载体结合或单独提供配制为溶液、混悬液、乳剂、颗粒、粉末或冻干粉末。这样的载体的例子是水、盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和约 1-10% 人血清白蛋白。还可使用脂质体和非水载体例如固定油类。载体或冻干粉末可含有保持等渗性(如氯化钠、甘露糖醇)和化学稳定性(如缓冲剂和防腐剂)的添加剂。通过已知或适合的技术灭菌配方。

适合的药物载体描述于最近一版的该领域标准参考教科书 Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol 中。

选择性给药

根据本发明，可使用多种已知和开发的方式施用药学有效量的根据本发明的至少一种抗 IL-6 抗体。当在以下描述中使用了经肺给药时，可使用根据本发明具有适合结果的其他给药方式。利用适合于吸入给药或在此描述的或本领域已知的其他给药方式的多种装置和方法的任何一种，本发明的 IL-6 抗体可处于载体中，作为溶液、乳剂、胶体或混悬液，或作为干粉递送。

肠胃外配方和给药

用于肠胃外给药的配方可含有常用的赋形剂—无菌水或盐水、聚烯基乙二醇，例如聚乙二醇、植物油、氢化萘等。根据已知方法可通过使用适当的乳化剂或增湿剂以及助悬剂制备供注射的含水或含油混悬液。注射用试剂可以是无毒的、非口服的稀释剂，例如水溶液、无菌注射溶液或处于溶剂中的混悬液。作为可用的载体或溶剂，提供

了水、林格氏溶液、等渗透盐水等；可使用作为一般溶剂或助悬剂的无菌不挥发性油。为了这些目的，可使用任何类型的不挥发性油或脂肪酸，包括天然的或合成的或半合成的脂肪油或脂肪酸；天然的或合成的或半合成的甘油单-或二-或三酯。肠胃外给药为本领域所已知的，包括但不限于 常规注射方法、如 U.S.专利号 5,851,198 中描述的气压无针头注射装置和如 U.S.专利号 5,839,446 中描述的激光穿孔装置，在此完全并入作为参考。

选择性递送

本发明进一步涉及通过肠胃外、皮下、肌内、静脉内、关节内、支气管内、腹内、囊内、软骨内、腔内、体腔内、小脑内、脑室内、结肠内、子宫颈内、胃内、肝内、心肌内、骨内、骨盆内、心包内、腹膜内、胸膜内、前列腺内、肺内、直肠内、肾内、视网膜内、脊柱内、滑膜内、胸腔内、子宫内、膀胱内、损害部位内、推注、阴道、直肠、口腔含服、舌下、鼻内或经皮方法施用至少一种抗 IL-6 抗体。可制备至少一种抗 IL-6 抗体组合物，用于肠胃外(皮下、肌内或静脉内)或任何其他给药，特别是以液体溶液或混悬液的形式存在；用于阴道或直肠给药特别是以半固体形式存在，例如但不限于乳膏和栓剂；用于口腔含服或舌下给药，例如但不限于以片剂或胶囊形式存在；或用于鼻内给药，例如但不限于，粉末、滴鼻剂或气雾剂或某些试剂形式；或用于经皮给药，例如但不限于凝胶、软膏、洗剂、混悬液或具有诸如二甲基亚砷以改变皮肤结构或增加透皮贴剂中药物浓度的化学增强剂(Junginger, 等, 在 "Drug Permeation Enhancement;" 中 Hsieh, D. S., 编, pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994, 在此完全并入作为参考), 或具有能施用含有蛋白和肽的配方于皮肤上的氧化剂(WO 98/53847), 或施加电场以产生短暂运输通路, 例如电穿孔, 或增加带电药物通过皮肤的移动性, 例如离子电渗疗法, 或施加超声波, 例如超声促渗(U.S.专利号 4,309,989 和 4,767,402)的贴剂递药系统(以上出版物和专利在此完全并入作为参考)。

经肺/鼻内给药

为了经肺给药, 优选地, 将至少一种抗 IL-6 抗体组合物以有效地到达肺或窦道的下级气道的粒度递送。根据本发明, 可通过多种用于通过吸入施用治疗剂的本领域已知的吸入或鼻内装置的任何一种递

送至少一种抗 IL-6 抗体。这些能沉积气雾剂配方于患者鼻窦腔或槽中的装置包括计量吸入器、雾化器、干粉发生器、喷雾器等。其他适合于抗体直接经肺或鼻内给药的装置也为本领域所已知。所有这样的装置皆可使用适合于给药分配处于气雾剂中的抗体的配方。这样的气雾剂可由溶液(含水和非水的)或固体颗粒组成。

计量吸入器如 Ventolin[®] 计量吸入器在吸入期间通常使用了抛射剂并需要启动(参见如 WO 94/16970, WO 98/35888)。干粉吸入器如 Turbuhaler[™] (Astra)、Rotahaler[®] (Glaxo)、Diskus[®] (Glaxo)、Spiros[™] 吸入器(Dura)、Inhale Therapeutics 销售的装置和 Spinhaler[®] 干粉吸入器(Fisons), 使用了呼吸驱动的混合粉末(US 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons, 在此完全并入作为参考)。雾化器如 AERx[™] Aradigm、Ultravent[®] 雾化器(Mallinckrodt)和 Acorn II[®] 雾化器(Marquest Medical Products) (US 5404871 Aradigm, WO 97/22376), 上述文献在此完全并入作为参考, 由溶液产生了气雾剂, 而计量吸入器、干粉吸入器等则产生了微粒气雾剂。这些市售吸入装置的特定例子意在代表适合于本发明实践的特定装置, 而并不意在为限制本发明的范围。

优选地, 通过干粉吸入器或喷雾器递送包含至少一种抗 IL-6 抗体的组合物。对于施用至少一种本发明的抗体, 吸入装置有着几种所需要的特性。例如, 通过吸入装置递送优势在于可靠、可重复以及精确。吸入装置能任选地递送干燥微粒, 如小于约 10 μm , 优选约 1-5 μm , 非常适合呼吸。

作为喷雾剂施用 IL-6 抗体组合物

可通过加压至少一种抗 IL-6 抗体的混悬液或溶液通过喷嘴产生包含 IL-6 抗体组合物的喷雾剂。可选择喷嘴大小和外形、所施加的压力以及液体进料速度以获得期望的输出量和粒度。可例如通过与毛细管或喷嘴进料管结合的电场产生电喷雾剂。有利地, 通过喷雾器递送的至少一种抗 IL-6 抗体组合物的颗粒具有小于约 10 μm 的粒度, 优选地, 在约 1 μm -约 5 μm 范围内, 以及最优选地, 为约 2 μm -约 3 μm 。

适用于喷雾器的至少一种抗 IL-6 抗体组合物的配方通常包括在约 0.1 mg-约 100 mg 的至少一种抗 IL-6 抗体组合物/毫升溶液或 mg/gm, 或其中的任何范围、值或分数的浓度下的以水溶液形式存在

的抗体组合物。配方可包括诸如赋形剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂、表面活性剂和优选地铕的试剂。配方还可包括赋形剂或用于稳定抗体组合物的试剂，例如缓冲剂、还原剂、填充蛋白(bulk protein)或碳水化合物。用于配制抗体组合物的填充蛋白包括白蛋白、鱼精蛋白等。用于配制抗体组合物的代表性的碳水化合物包括蔗糖、甘露糖醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等。抗体组合物配方还可包括表面活性剂，其能减少或阻止由于在气雾剂形成中溶液雾化所引起的表面诱导的抗体组合物聚集。可使用多种常规的表面活性剂，例如聚氧乙烯脂肪酸酯类和醇类，以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯类。按重量计表面活性剂的量通常为配方的 0.001-14%。对本发明来说，特别优选的表面活性剂为聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯、聚山梨醇酯 80、聚山梨醇酯 20 等。本领域已知用于诸如 IL-6 抗体、或特定部分或变体的蛋白配方的额外试剂还可包括于配方中。

通过雾化器施用 IL-6 抗体组合物

可通过诸如喷射雾化器或超声波雾化器的雾化器施用本发明的抗体组合物。典型地，在喷射雾化器中，使用压缩空气源以产生通过喷嘴的高速空气射流。当气体喷出喷嘴时，产生了低压区，通过与贮液器相连的毛细管抽取抗体组合物溶液。来自毛细管的液流当其离开时被剪切为不稳定的细丝和微滴，产生气雾剂。由给定的喷射雾化器可使用多种外形、流速和导流片类型以获得期望的性能特性。在超声波雾化器中，通常使用压电换能器将高频电能用于产生振动能、机械能。该能量被直接或通过连耦合流体传送到抗体组合物配方，产生包含抗体组合物的气雾剂。有利地，通过雾化器递送的抗体组合物颗粒具有小于约 10 μm 的粒度，优选地在约 1 μm -约 5 μm 范围内，以及最优选地，为约 2 μm -约 3 μm 。

适用于雾化器(喷射或超声波雾化器)的至少一种抗 IL-6 抗体的配方通常包括每毫升溶液约 0.1 mg-约 100 mg 的至少一种抗 IL-6 抗体蛋白的浓度。配方可包括诸如赋形剂、缓冲剂、等渗剂、防腐剂、表面活性剂和优选地铕的试剂。配方还可包括赋形剂或用于稳定至少一种抗 IL-6 抗体组合物的试剂，例如缓冲剂、还原剂、填充蛋白或碳水化合物。用于配制至少一种抗 IL-6 抗体组合物的填充蛋白包括白蛋白、鱼精蛋白等。用于配制至少一种抗 IL-6 抗体的代表性的碳水化合物包

括蔗糖、甘露糖醇、乳糖、海藻糖、葡萄糖等。至少一种抗 IL-6 抗体配方还可包括表面活性剂，其能减少或阻止由于在气雾剂形成中溶液雾化所引起的表面诱导的至少一种抗 IL-6 抗体聚集。可使用多种常规的表面活性剂，例如聚氧乙烯脂肪酸酯类和醇类，以及聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯类。按重量计表面活性剂的量通常为配方的 0.001-4%。对本发明来说，特别优选的表面活性剂为聚氧乙烯山梨糖醇酐单油酸酯、聚山梨醇酯 80、聚山梨醇酯 20 等。本领域已知用于诸如抗体蛋白的蛋白配方的额外试剂还可包括于配方中。

通过计量吸入器施用 IL-6 抗体组合物

在计量吸入器(MDI)中，抛射剂、至少一种抗 IL-6 抗体以及任何的赋形剂或其他添加剂包含于金属罐中作为包括液化压缩气体的混合物。启动计量阀释放了作为气雾剂的混合物，优选含有小于约 10 μm 的粒度范围的颗粒，优选地为约 1 μm -约 5 μm ，以及最优选地为约 2 μm -约 3 μm 。可通过使用通过多种本领域技术人员已知的方法产生的抗体组合物的配方获得期望的气雾剂粒度，所述方法包括喷射研磨、喷雾干燥、临界点冷凝等。优选的计量吸入器包括为 3M 或 Glaxo 所制造的并使用氢碳氟化合物抛射剂的那些计量器。用于计量吸入器装置的至少一种抗 IL-6 抗体的配方通常包括作为处于无水介质中的混悬物的含有至少一种抗 IL-6 抗体的细分散粉末，例如，借助于表面活性剂混悬于抛射剂中。抛射剂可以是任何用于该用途的常规物质，例如氯碳氟化合物、氢氯碳氟化合物、氢碳氟化合物或碳氢化合物，包括三氯氟甲烷、二氯二氟甲烷、二氯四氟甲烷和 1,1,1,2-四氟乙烯、HFA-134a (氢氟烷-134a)、HFA-227 (氢氟烷-227)等。优选地，抛射剂为氢碳氟化合物。可选择表面活性剂来稳定作为处于抛射剂中的混悬物的至少一种抗 IL-6 抗体，以使活性成分免于化学降解等。适合的表面活性剂包括山梨聚糖三油酸酯、大豆磷脂、油酸等。在一些情况下，使用诸如乙醇的溶剂的溶液型气雾剂是优选的。本领域已知用于蛋白配方的额外试剂还可包括于配方中。本领域技术人员应承认可通过在此没有描述的装置经肺施用至少一种抗 IL-6 抗体组合物实现本发明的方法。

口服配方和给药

用于口服的配方依赖于所共同施用的佐剂(如间苯二酚和非离子

型表面活性剂,例如聚氧乙烯油基醚和正十六烷基聚乙醚)以人工增加肠壁渗透性,以及所共同施用的酶抑制剂(如胰脏的胰蛋白酶抑制剂、异氟磷(DFP)和特斯乐)以抑制酶降解。为口服、口腔含服、粘膜、鼻内、经肺、阴道跨膜或直肠给药所设计的用于包括蛋白和抗体亲水试剂以及至少两种表面活性剂的组合递送的配方教导于 U.S. 6,309,663 中。用于口服的固体剂型的活性组分化合物可与至少一种添加剂混合,所述添加剂包括蔗糖、乳糖、纤维素、甘露糖醇、海藻糖、棉子糖、麦芽糖醇、葡聚糖、淀粉、琼脂、arginates、几丁质、壳聚糖、果胶、黄耆胶、阿拉伯树胶、明胶、胶原、酪蛋白、白蛋白、合成或半合成聚合物以及甘油酯。这些剂型还可含有其他类型的添加剂,如惰性稀释剂,诸如硬脂酸镁的润滑剂,对羟基苯甲酸酯,诸如山梨酸、抗坏血酸、 α -生育酚的防腐剂,诸如半胱氨酸的抗氧化剂,崩解剂,粘合剂,增稠剂,缓冲剂,甜味剂,芳香剂,加香剂等。

片剂和丸剂可进一步加工为肠溶包衣制剂。用于口服的液体制剂包括乳剂、糖浆剂、酏剂、混悬液和容许医用的溶液制剂。这些制剂可含有通常用于所述领域的惰性稀释剂,如水。还已描述了用于胰岛素和肝素的作为药物递送系统的脂质体(U.S.专利号 4,239,754)。新近,业已使用混合氨基酸(类蛋白质)人工聚合物微球来递送药物(U.S.专利号 4,925,673)。此外,描述于 U.S.专利号 5,879,681 和 U.S.专利号 5,587,753 中的载体化合物以及用于口服递送生物活性剂皆为本领域所知。

粘膜配方和给药

用于口服生物活性剂的配方包囊于一种或多种生物相容的聚合物或共聚物赋形剂中,优选地,包囊于生物可降解聚合物或共聚物中,提供了微囊剂,由于所产生的微囊剂的合适的尺寸,使得该药剂到达并为动物的滤泡淋巴聚集体,或者称为“派伊尔氏淋巴集结”或“GALT”所摄取,而由于药剂已通过胃肠道,因此疗效没有损失。类似的滤泡淋巴聚集体可见于支气管(BALT)和大肠中。上述组织一般称为粘膜相关的淋巴网状组织(MALT)。为了通过粘膜表面吸收,施用至少一种抗 IL-6 抗体的组合物和方法包括含有大量亚微米颗粒、粘膜粘着剂大分子、活性肽和连续水相的乳剂,通过实现乳剂颗粒的粘膜粘着促进通过粘膜表面的吸收(U.S.专利号 5,514,670)。适合于本发

明乳剂施用的粘膜表面可包括角膜、结膜、含服、舌下、鼻、阴道、肺、胃、肠和直肠给药途径。诸如栓剂的用于阴道或直肠给药的配方可含有赋形剂，例如聚烯基乙二醇、凡士林、可可豆油等。用于鼻内给药的配方可以是固态的并含有诸如乳糖的赋形剂，或可以是滴鼻剂的水溶液或油性溶液。对于含服给药，赋形剂包括糖类、硬脂酸钙、硬脂酸镁、预凝胶化(pregelinated)淀粉等(U.S.专利号 5,849,695)。

经皮配方和给药

为了经皮给药，将至少一种抗 IL-6 抗体包囊在递送装置中，例如脂质体或聚合物纳米颗粒、微粒、微胶囊或微球粒(除非另作说明，共同称为微粒)。已知多种适合的装置，包括由合成聚合物，例如多羧基酸，如聚乳酸、聚乙醇酸以及它们的共聚物，多正酯类，聚酐和聚磷腈，以及天然组合物，例如胶原、聚氨基酸、白蛋白和其他蛋白、藻酸盐和其他多糖以及它们的组合制成的微粒(U.S.专利号 5,814,599)。

长期给药和配方

期望在持续很久的一段时间内递送本发明的化合物给受试者，例如，单次给药持续一周到一年的时间。可利用多种缓释、长效或植入剂型。例如，剂型可含有药学上可接受的在体液中具有低溶解度的化合物的无毒盐类，例如，(a) 具有诸如磷酸、硫酸、柠檬酸、酒石酸、鞣酸、双羧萆酸、海藻酸、聚谷氨酸、萆单或二磺酸、多聚半乳糖醛酸等的多元酸的酸加成盐；(b) 具有诸如锌、钙、铋、钡、镁、铝、铜、钴、镍、镉等的多价金属阳离子，或具有如 N,N'-二苄基-乙二胺或乙二胺所形成的有机阳离子的盐；或(c) (a)和(b)的组合，如鞣酸锌盐。此外，本发明的化合物或优选地相对不溶解的盐，例如刚才描述的那些盐，可与如适于注射的芝麻油配制为凝胶例如单硬脂酸铝凝胶。特别优选的盐类为锌盐、鞣酸锌盐、双羧萆酸盐等。另一种类型的用于注射的缓释长效配方应含有被分散用于包囊于缓慢降解的、无毒性的、非抗原性的聚合物中的化合物或盐，所述聚合物例如聚乳酸/聚乙醇酸聚合物，如 U.S.专利号 3,773,919 中所描述的。化合物或优选地相对不溶解的盐类，例如上述那些盐类，还可配制为胆固醇基质硅橡胶片剂，特别是供动物使用的。额外的缓释、长效或植入配方，如气体或液体脂质体已知于文献中(U.S.专利号 5,770,222 和 "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J. R. Robinson 编.,

Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978)。

本发明已得到一般性描述, 参考以下实施例将更易于理解本发明, 所述实施例提供作为举例说明而非意在限制。

适应症

类风湿性关节炎(RA)

类风湿性关节炎(RA)是一种具有自身免疫特征的慢性全身性炎症性疾病。可通过失调的 IL-6 作用解释 RA 的许多特征。

RA 中可能有关的 IL-6 作用包括通过 IL-6 作为 B 细胞分化因子的作用, 诱导多克隆高丙种球蛋白血症和产生自身抗体(类风湿因子); 促进细胞毒性 T 细胞发育, 与 IL-2 一致; 通过肝细胞刺激活性产生急性期蛋白质(CRP、SAA、纤维蛋白原); 破骨细胞活化, 导致关节周围骨质疏松和骨组织破坏; 通过作为巨核细胞分化因子的作用, 诱导血小板增多; 以及调节 VEGF, 并因此可能血管发生, 与 IL-1 β 和 TNF α 一致。

在 RA 中, 通过 TNF α 或 IL-1 刺激 RA 滑液成纤维细胞产生了 IL-6, 并在滑膜液(SF)和血清中以高浓度存在。在血清水平和疾病活性的临床/实验室指标之间存在着相关性。

在活跃性 RA 患者的一些临床研究中研究了抗 IL-6/IL-6R mAbs。迄今为止的结果简述如下。

I/II 期研究

在这些研究的一开始, 在 5 位 RA 患者中连续 10 天每日施用鼠抗 IL-6 mAb (BE-8), 并与短暂的临床和实验室改善有关(9) (Wendling, D; 等, 1993 *J. Rheumatol.* 20:259)。在一些 RA 患者的 I/II 期研究中测试人源化抗 IL-6R (80kDa) mAb (MRA; Chugai)。在这些研究的一开始, 通过每周一或两次静脉内输注 1-50 mg 剂量施用 MRA, 50 mg/周的持续治疗持续多达 6 个月。在急性期测量中, C-反应性蛋白(CRP)和纤维蛋白原、低热、疲劳和临床得分例如晨间强直和肿胀以及触痛关节计数急剧减少。还注意到贫血、血小板增多和高丙种球蛋白血症得到改善。在之后的研究中, 通过单次静脉内输注 0.1-10 mg/kg 剂量的 MRA 处理 45 位患者, 在更高的剂量水平上产生了临床得分改善的趋势, 外加急性期反应物的减少。

II 期研究

在这些研究的一开始, 用 MRA 处理 15 位患者(剂量水平 2、4 或 8 mg/kg, 每周两次, 持续 24 周), 并在 24 周的 13/15 周显示 ACR20 应答, 具有正常化的 CRP/血清淀粉样蛋白 A (SAA)。尽管并不主要关注急性安全性, 但多达 2/3 的患者显示明显增加的 LDL 胆固醇水平。在接下来的 II 期研究中, 通过静脉内输注用安慰剂或 MRA 处理 DMARDs 耐药的 164 位 RA 患者(每 4 周给予剂量水平 4 或 8 mg/kg, 持续 3 个月), 并分别对于安慰剂、4 和 8 mg/kg 在第 12 周显示 11%、57%和 78%的 ACR20 应答率。最后, 359 位活跃性 RA 患者接受单独的 MTX(10-25 mg/周)、单独的 MRA(剂量水平 2、4 或 8 mg/kg, 通过静脉内输注每月给药一次)或 MTX + MRA。通过 ACR20 应答测定, 与单独的 MTX 相比, MRA 和 MRA + MTX 更有效。

全身性红斑狼疮(SLE)

SLE 是一种具有多种变态蛋白表现的慢性的、可能致命的、自身免疫疾病。病因学未知。该疾病的一个标志涉及 B 细胞过度增殖、活化和产生抗多种自体抗原的自身抗体。

IL-6 诱导 B 细胞分化为抗体形成细胞。在 SLE 中, 通过这些抗体形成细胞和免疫复合物沉积增加了自身抗体(ANA, 抗 dsDNA)的产生。IL-6 促进了细胞毒性 T 细胞发育, 增加了肝急性期反应物, 肾小球膜细胞增殖, 角质化细胞生长, 巨核细胞分化和血栓形成。

在 SLE 患者和鼠 SLE 模型中, IL-6 水平都升高。证明了结合在 B 细胞上的 IL-6 受体诱导 B 细胞终末分化为自身抗体产生细胞。Linker-Israeli 等. (Linker-Israeli M 等, 1991 *J Immunol* 147: 117-123) 已证明当使用抗 IL-6 的中和抗体时, 减少了自发多克隆抗体的产生。Kitani 等人(Kitani A, 等, 1992 *Clin Exp Immunol* 88: 75-83)通过证明在 SLE 培养物中体外 IL-6 加倍了 T 细胞产生以及与对照 B 细胞相比 SLE B 细胞具有五倍更多的 IL-6 产生支持了这些发现。然而, 在 SLE 中自身抗体的病理学产生并不单独受限于 IL-6 的效应。还已研究了 IL-6 受体的作用。Nagafuchi 等人证明相对于正常 B 细胞, 在大多数 SLE B 细胞中 IL-6 受体上调。抗 IL-6 受体抗体抑制了这些 B 细胞终末分化为抗体形成细胞。还已确定了 SLE 中可溶性 IL-6 受体的作用。

II 型糖尿病(T2DM)

胰岛素抵抗力(受损的胰岛素作用)和受损的 β -细胞功能(胰腺 β -细胞分泌胰岛素功能缺陷)被认为是 T2DM 发展的主要原因。胰岛素抵抗力表现为周围组织无法充分响应胰岛素激发,由此导致血糖水平增加。在胰岛素抵抗力和血糖水平增加后,在疾病早期胰腺 β -细胞代偿性分泌过多的胰岛素。当 T2DM 进展时, β -细胞分泌胰岛素的能力降低了。

造成胰岛素抵抗力的内在机制尚未明了。一种与 T2DM 发展通常最相关的病症是肥胖症,甚至于适度的体重减轻都能明显地改善了 T2DM 患者的葡萄糖水平。

肥胖症和胰岛素抵抗力/高胰岛素血症,与血脂障碍、葡萄糖耐量降低和高血压共同的特征在于具有称为代谢综合征的病症。代谢综合征到 T2DM 的自然发展使个体易发展为微血管和大血管改变,可导致心血管(CV)疾病以及最终死亡。业已认为肥胖症、胰岛素抵抗力和高胰岛素血症最有可能联系 T2DM 和 CV 疾病。

脂肪组织已被鉴定为一种调节代谢的主要器官,是能量储存库和分泌诸多与胰岛素敏感性调节有关的分子的内分泌器官。除瘦蛋白、抵抗素、脂连蛋白和 $\text{TNF}\alpha$ 之外,脂肪组织分泌 IL-6,认为在肥胖症、炎症、T2DM 和心血管(CV)疾病之间存在联系。

已证明了肥胖症和 IL-6 水平之间存在正相关。有可能肥胖症中增加的脂肪组织能提供循环的 IL-6 的持续增加,通过促进胰岛素敏感组织炎症会减少胰岛素敏感性或通过干扰与胰岛素信号级联相关的活性和蛋白表达导致胰岛素抵抗力。支持或反对在胰岛素抵抗力发展中 IL-6 潜在作用的体外和体内数据都有存在。

利用了包括肝(HepG2)(44)、脂肪(3T3L1)或分离的大鼠胰岛细胞在内的定义明确的细胞系统的体外数据显示 IL-6 对胰岛素信号传导、葡萄糖摄取和胰岛素分泌分别存在着直接的负效应。另一方面,对骨骼肌活组织检查实验所获得的数据认为在所使用的肌肉中 IL-6 能增加葡萄糖摄取。

对于 IL-6 水平和胰岛素敏感性之间关系的体内数据是同样的混杂。IL-6 过表达或完全除去模型提出 IL-6 活性的完全抑制也许不具有有益效应。例如,在转基因非肥胖糖尿病(NOD)小鼠中,人 IL-6 过表达延缓了糖尿病的发作并延长了生存。此外,来自无 IL-6 小鼠的数据

认为在能量平衡调节中 IL-6 可能起作用,因为这些动物稍迟发展为肥胖症和更高的葡萄糖水平。

在人中,IL-6 启动子区中天然存在的突变导致 IL-6 分泌速率的增加。该突变与胰岛素敏感性的增加和减少都有关。

在另一组实验中,业已评估了外源 IL-6 的作用。在正常的受试者中,IL-6 施用导致葡萄糖水平增加而不影响血浆胰岛素浓度,反之,在癌症患者中,添加 IL-6 增加了葡萄糖清除率。此外,业已研究了 IL-6 水平和胰岛素抵抗力之间的相关性。从这些实验得到的数据认为在男性和女性中,更高的 IL-6 循环水平与更高的胰岛素抵抗力相关,尽管因果关系仍需确定。

业已显示 IL-6 在肥胖症相关的胰岛素抵抗力发展中起重要的作用。然而,存在着支持或反对其在胰岛素抵抗力中潜在作用的不一致的体外和体内数据。

骨关节炎(OA)

OA 是一种慢性、退行性关节病症,特征在于损失关节软骨以及相关的软骨下骨改变。尽管在关节镜检查或在滑膜活检标本中观察到了不同程度的炎症,但该疾病并不主要是炎症。相反地,其被视为起源于软骨细胞和/或成骨细胞代谢改变。TNF、IL-1 和 IL-6 是与这些改变最相关的细胞因子。

尽管水平实质上低于炎性关节病,但在 OA 患者滑液中可检测到 IL-6 (Bertazzolo, N. 等. 1994 *Agents and Actions* 41: 90-92)。IL-6 被认为是一种肝急性期蛋白合成的主要刺激物,甚至在考虑到已知的 CRP 和肥胖症之间的关系之后,CRP 水平与膝 OA 存在仍然有关(Mohtai, M. 等. 1996 *J Orthopedic Research* 14: 67-73)。

IL-6 在 OA 软骨的软骨细胞中表达,但在正常软骨的软骨细胞中没有表达(Sowers, M. 等. 2002 *Osteoarthritis and Cartilage* 10: 595-601)。在测试机械应力对体外软骨细胞细胞因子表达的效应的实验中,流体诱导切应力明显地上调节了 IL-6 mRNA 和蛋白。这暗示 OA 软骨中的 IL-6 表达可能是由机械负荷所引起的。应答于 IL-1 对软骨细胞的作用,还可产生 IL-6(Dozin, B. 等. 2002 *Matrix Biology* 21: 449-459)。

在其他实验中,IL-6 与 sIL-6R 共同导致离体培养的人关节软骨细

胞蛋白多糖合成的抑制, 尽管与 IL-1 相比该效应不大(Guerne, P. 等. 1999 *Matrix Biology* 18: 253-260)。

慢性阻塞性肺病(COPD)

COPD 是一种具有气流受限无法完全逆转特征的疾病状态。气流受限通常是进行性的, 且与肺对有害颗粒和气体的异常炎症反应有关(Pauwels RA 等. 2001 *Am.J.Respir Crit Care Med* 163:1256-1276)。COPD 特征在于加速随年龄增长的肺功能正常衰退。缓进型气流受限导致了残疾和早产儿死亡。COPD 是死亡和残疾的主要病因, 但只在近来才从细胞和分子角度对其进行广泛的研究(Barnes PJ. 等. 2003 *EurRespir J* 22:672-688)。在 COPD 中, 慢性炎症导致固定的小气道狭窄以及肺泡破坏(肺气肿)。炎症反应特征在于增加数量的肺泡巨噬细胞、中性白细胞和细胞毒性 T-淋巴细胞以及多种炎症介质(趋化因子、细胞因子、生长因子和脂质)的释放。高水平的氧化应激可扩大炎症。还增加了弹性组织离解, 并有证据显示涉及一些弹性酶。COPD 中的炎症和蛋白水解是对卷烟烟气正常炎症反应的扩大。与哮喘不同的是, 炎症似乎对皮质甾类有抗性(Barnes PJ. 等. 2003)。

在动物模型中, 细菌性内毒素或脂多糖(LPS)以及卷烟烟气暴露诱导了中性白细胞增多以及在支气管肺泡灌洗(BAL)液中增加的 IL-6 产生(Underwood D.C. 等. 2000 *AJPLCMP* 279:L895-902)。IL-6 在小鼠肺中过表达诱导了肺气肿(Kuhn HI Ch. 等. 2000 *AJRCMB* 22:289-295)。在人中, 一秒内的最大呼气量(FEV1)与 IL-6、IL-8 水平以及 BAL 中的多形核细胞计数逆相关(Soler N. 等. 1999 *Eur Respir J* 14:1015-1022)。在中重度 COPD 受试者中血浆 TNF α 、IL-6 和 CRP 水平增加(Yasuda N. 等. 1998 *Respir Med* 92:993-999)。

COPD 的急性恶化定义为患者病症的持续恶化, 从稳定状态到逐日改变远离正常, 即急性发作且需要常规药物治疗来改变(Burge S. 等. 2003 *Eur Respir J* 21: Suppl. 41, 46s-53s)。尽管增加的症状和恶化的肺功能是住院(在美国大约每年 500,000 人)的常见原因, 但内在的细胞和分子机制仍尚未得到广泛研究, 并且缺乏了解(Wedzicha, J.A. 2002 *Chest* 121: 136S-141S)。急性恶化可持续很久并对生命质量产生深刻的影响, 还可加速 COPD 的进展(Soto FJ. 等. 2003 *PuIm Med* 9:117-124)。呼吸道感染是 COPD 恶化最常见的病因。大多数这些感

染是由细菌所引起的，但其中的许多是由病毒感染所致，特别是鼻病毒感染(Soto FJ. 等. 2003)。环境因素、大气污染物和温度也可起作用。

在恶化期间，COPD 患者痰液中的中性白细胞和 IL-6、IL-8、TNF α 及 LTB₄ 浓度增加。一些中重度 COPD 患者易于经常恶化(每年 3 次或更多次恶化)。即使当 COPD 稳定时，该群患者(“频繁恶化者”)仍具有较高水平的 IL-6 以及较低水平的分泌性白细胞蛋白酶抑制剂(Bhowmik A. 等. 2000 *Thorax* 55:114-120; Gompertz S. 等. 2001 *Thorax* 56: 36-41; Gompertz S. 等. 2001 *Eur Respir J* 17: 1112-1119)。

许多其他机制，例如氧化应激以及细菌群集同样也与 COPD 恶化的病理生理学有关。

实施例 1: 在哺乳动物细胞中克隆并表达 IL-6 抗体

典型的哺乳动物表达载体含有至少一个调节 mRNA 转录起始的启动子元件、抗体编码序列以及转录终止和转录物多腺苷酸化所需的信号。额外的元件包括增强子、Kozak 序列和供 RNA 剪接的供体和受体位点侧翼的间隔序列。使用来自 SV40 的早期和晚期启动子，来自如 RSV、HTLVI、HIVI 的逆转录病毒的长末端重复(LTRS)以及巨细胞病毒(CMV)的早期启动子可实现高效转录。然而，还可使用细胞元件(如人肌动蛋白启动子)。适用于实践本发明的表达载体包括例如，载体如 pIRES1neo、pRetro-Off、pRetro-On、PLXSN 或 pLNCX (Clonetech Labs, Palo Alto, CA)，pcDNA3.1 (+/-)、pcDNA/Zeo (+/-)或 pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen)，PSVL 和 PMSG (Pharmacia, Uppsala, Sweden)，pRSVcat (ATCC 37152)，pSV2dhfr (ATCC 37146) 和 pBC12MI (ATCC 67109)。适合的哺乳动物和其他宿主细胞包括人 HeLa、293、H9 和 Jurkat 细胞，小鼠 NIH3T3 和 C127 细胞，Cos 1、Cos 7 和 CV 1，鹤鹑 QCl-3 细胞，小鼠 L 细胞和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。或者，基因可在含有整合入染色体中的基因的稳定细胞系中表达。使用选择标记例如 dhfr、gpt、新霉素或潮霉素的共转染使转染细胞的鉴定和分离得以可能。

还可扩增转染基因以表达大量的编码抗体。DHFR (二氢叶酸还原酶)标记用于开发携带有几百个甚至几千个拷贝的目的基因的细胞

系。另一种有用的选择标记为谷氨酰胺合酶(GS) (Murphy, 等, *Biochem. J.* 227:277-279 (1991); Bebbington, 等., *Bio/Technology* 10:169-175 (1992))。利用这些标记, 让哺乳动物细胞在选择培养基中生长并选择具有最高抗性的细胞。这些细胞系含有整合入染色体的扩增基因。中国仓鼠卵巢(CHO)和 NSO 细胞经常用于产生抗体。

表达载体 pC1 和 pC4 含有劳氏肉瘤病毒的强启动子(LTR) (Cullen, 等, *Mol. Cell. Biol.* 5:438-447 (1985))外加 CMV-增强子片段(Boshart, 等, *Cell* 41:521-530 (1985))。诸如带有限制性内切酶切割位点 BamHI、XbaI 和 Asp718 的多克隆位点利于目的基因的克隆。除 3'内含子之外, 载体含有大鼠前胰岛素原基因的多腺苷酸化和终止信号。

在 CHO 细胞中克隆和表达

载体 pC4 可用于表达 IL-6 抗体。质粒 pC4 是一种质粒 pSV2-dhfr(ATCC 保藏号 37146)的衍生物。该质粒含有受 SV40 早期启动子控制的小鼠 DHFR 基因。可通过在补充有化学治疗剂氨甲蝶呤的选择培养基(如 alpha minus MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD)中培养细胞, 选择用这些质粒转染的缺乏二氢叶酸活性的中国仓鼠卵巢或其他细胞。已有众多文献记载了在抗氨甲蝶呤(MTX)细胞中扩增 DHFR 基因(参见如 F. W. Alt, 等., *J. Biol. Chem.* 253:1357-1370 (1978); J. L. Hamlin 和 C. Ma, *Biochem. et Biophys. Acta* 1097:107-143 (1990); 以及 M. J. Page 和 M. A. Sydenham, *Biotechnology* 9:64-68 (1991))。由于 DHFR 基因的扩增, 从而在增加的 MTX 浓度下所生长的细胞通过过量产生靶酶—DHFR 显示出对该药物的抗性。如果将第二基因连接于 DHFR 基因, 则通常共扩增并过表达。本领域已知该方法能用于开发携带有多于 1,000 个拷贝的扩增基因的细胞系。之后, 当弃去氨甲蝶呤时, 获得含有整合入宿主细胞的一个或多个染色体中的扩增基因的细胞系。

除劳氏肉瘤病毒长末端重复(LTR)强启动子之外, 诸如人 β -肌动蛋白启动子、SV40 早期或晚期启动子或来自于其他反转录病毒如 HTV 和 HTLVII 的长末端重复的高效启动子也可用于表达。Clontech 的 Tet-Off 和 Tet-On 基因表达系统以及类似的系统可在哺乳动物细胞中以调节方式用于 IL-6 抗体表达(M. Gossen 和 H. Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551 (1992))。为了 mRNA 的多腺苷酸化, 同

样可使用其他信号,如来自人生长激素或珠蛋白基因的信号。还可在与诸如 gpt、G418 或潮霉素的选择标记共转染的基础上选择携带有整合入染色体中的目的基因的稳定细胞系。其有利之处在于开始时使用多于一种的选择标记,如 G418 + 氨甲蝶呤。用限制性内切酶消化质粒 pC4,然后通过本领域已知的操作用牛肠磷酸酶脱去磷酸。接着从 1%琼脂糖凝胶中分离出载体。

根据已知的方法步骤,使用编码完整 IL-6 抗体的 DNA 序列,如分别相应于本发明 IL-6 抗体的 HC 和 LC 可变区的如 SEQ ID NOS: 98 和 96 所示序列。在该构建体中还使用了编码适合的人恒定区(即 HC 和 LC 区)的分离的核酸。

然后用 T4 DNA 连接酶连接分离的可变区和恒定区编码 DNA 以及脱去磷酸的载体。然后转化大肠杆菌 HB101 或 XL-1 蓝细胞并使用例如限制性内切酶分析鉴定含有插入质粒 pC4 中的片段的细菌。

将缺少活性 DHFR 基因的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞用于转染。利用脂质转染试剂,用 0.5 μg 的质粒 pSV2-neo 共转染 5 μg 的表达质粒 pC4。质粒 pSV2neo 含有显性选择标记—来自于 Tn5 的 neo 基因,编码赋予对包括 G418 在内的一组抗生素抗性的酶。将细胞接种在补充有 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 的 alpha minus MEM 中。2 天后,使细胞受胰蛋白酶作用并接种在杂交瘤克隆平板(Greiner, Germany)中的补充有 10、25 或 50 ng/ml 氨甲蝶呤 + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 的 alpha minus MEM 中。在约 10-14 天后,使单克隆受胰蛋白酶作用,然后接种在 6-孔培替氏培养皿或 10 ml 烧瓶中,使用了不同浓度的氨甲蝶呤(50 nM、100 nM、200 nM、400 nM、800 nM)。然后将在最高浓度的氨甲蝶呤下生长的克隆转移到含有甚至更高浓度的氨甲蝶呤(1 mM、2 mM、5 mM、10 mM、20 mM)的新的 6-孔平板中。重复相同的操作直到获得在 100 - 200 mM 浓度下生长的克隆为止。例如通过 SDS-PAGE 和蛋白质印迹或反相 HPLC 分析分析期望的基因产物的表达。

实施例 2—构建并筛选抗 IL-6 抗体

构建并筛选有活性的 IL-6 抗体变体(克隆 AME-A9)。在该实施例和本文的其他地方中,除 CDRH1 为 Kabat 和 Chothia 定义之和外,CDRs 为 Kabat 定义。CDRH2 的长度是构建两个独立文库以覆盖整个

区域所必需的长度。对目的克隆测序并通过 ELISA 和基于细胞的测定法进一步鉴定，并测定动力学常数。

使用纯化的 IgGs 进行 ELISA 的一个例子示于图 9 中。ELISA 通常使用包被有山羊抗人 κ 抗体的 Costar 3366 微量滴定板。在 22°C 下于经包被的孔中温育稀释的 Fab(或 IgG)1 小时。然后用 PBS、0.1% Tween 20 洗涤孔并添加 200 ng/ml 的生物素化的 IL-6 温育 1 小时。洗涤后，添加 NeutrAvidin 的碱性磷酸酶缀合物，并在 22°C 下温育 1 小时。在大量洗涤后添加比色底物并测定结合的 IL-6。一种 ELISA 的变型包括了在生物素化的 IL-6 温育后，在 PBS、0.01% BSA 烧杯中于 37°C 下延长的洗涤步骤，如 18 小时的延长的洗涤步骤。

一些本发明所产生的人工程 IL-6 反应性 IgG 单克隆抗体具有 1×10^9 - 9×10^{12} 的亲合常数。这些人工程单克隆抗体的高亲和力使得它们能适用于 IL-6-依赖的疾病、病理或有关病症的治疗应用。

通过改变抗体的一个或多个 CDR 区获得多种不同的人工程化抗 IL-6 抗体变体。下表 3 概示了在个体 CDR 文库中所发现的有益突变(氨基酸改变是相对于 AME-A9 变体的)。此外，下表 13 显示了具有可能的取代位点(标记为“X”)的轻链和重链 CDRs 的氨基酸序列。

基于在个体 CDR 文库中所发现的最好的克隆(即变体)构建“组合”文库。表 4 列出了包括在“组合”文库中的突变。如上所述筛选并鉴定组合文库。在六个较好的克隆中所发现的突变示于下表 5A 中，同时这些克隆中的 CDRs 的序列 ID 号示于表 5B 中。

在基于细胞的测定法中测定抗 IL-6 IgGs

测试嵌合抗 IL-6 和人工程化抗 IL-6 (克隆 AME-19a) 抗体阻止 IL-6 依赖细胞系生长的能力。将 7TD1 细胞以 200 个细胞/孔铺在 Costar 3610 96 孔平板中。将在 IMDM 培养基中稀释的抗体添加到孔中，随后添加人 IL-6 至 500 pg/ml 终浓度并将平板于组织培养恒温箱中温育 64-72 小时。在当时，添加来自 ATPlite 试剂盒(Packard Bioscience)的 50 μ l 细胞裂解缓冲液到所有的孔中，并震荡平板 3 分钟。添加 50 μ l ATPlite 底物并摇动覆盖的平板 1 分钟。在光度计上测定化学发光。

基于细胞测定的结果示于图 10 中，具有下表 6 中所示的计算 EC₅₀ 值。嵌合抗 IL-6 抗体的 EC₅₀ 值为 2.7×10^{-11} M (4.09 ng/ml)，人工程化抗 IL-6(克隆 AME-19a)抗体的 EC₅₀ 值为 2.7×10^{-12} M (0.41 ng/ml)。

人工程抗体的 EC_{50} 值显示约 10 倍改善, 尽管在 EC_{50} 值中, 包括居中值在内, 有可能获得约 10 倍-约 60 倍的改善。

实施例 3 -人工程抗人 IL-6 抗体的结合动力学

ELISA 分析证实了纯化自这些宿主细胞的抗体以浓度依赖方式结合 IL-6。在该情况下, 测定抗体对其相关抗原(表位)的亲和力。利用 BIAcore 分析和 KinExA 3000 仪器获得定量结合常数。结果显示一些人工程单克隆抗体的亲和力非常高, 具有 1×10^{-9} - 3×10^{-14} 的 K_D 。

进行使用了抗人 IL-6 单克隆抗体(AME-A9, AME-A16, AME-18a, AME-20b, AME-22a 和 AME-23a)以及作为阳性对照的 CNTO 328 的酶免疫测定(EIA)检测 IL-6 与可溶性 IL-6 受体—sIL-6R 的结合。可溶性人 IL-6 受体—sIL-6R 以及重组人 IL-6 获得自 R&D Systems (Minneapolis, MN) (商品目录号分别为 227-SR-025 和 206-IL-010)。山羊抗人 IgG-辣根过氧化物酶连接的(H+L 链)获得自 Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA) (商品目录号 109-035-003)。过氧化氢和 OPD 片获得自 Sigma (St. Louis, MO) (商品目录号分别为 H-1009 和 P-8287)。

sgp80/TL-6/抗 IL-6 mAb 复合物形成的酶联免疫测定

在 4°C 下用 sIL-6R($10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 溶于 PBS 中, $100\text{ }\mu\text{l/孔}$)包被 Costar EIA 平板(Corning/Costar, Acton, MA) (商品目录编号 9018)过夜。用含有 0.02% (v/v) Tween 20 的 0.15M 盐水洗涤平板, 并在室温下用溶于 PBS 中的 1% (w/v) BSA($200\text{ }\mu\text{l/孔}$)封闭孔 1 小时。再次洗涤孔, 接着在室温下顺次与溶于 PBS 中的 200 ng/ml 人 IL-6 ($100\text{ }\mu\text{l/孔}$)温育 1 小时。由 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 起始浓度以 10 倍连续稀释将抗体添加到所有的孔中, $100\text{ }\mu\text{l/孔}$, 在室温下温育 1 小时。洗涤后, 在室温下用山羊抗人 IgG (H+L)-HRP-缀合物($10\text{ }\mu\text{g/ml}$ in PBS)温育孔 30 分钟。洗涤孔, 并添加 $100\text{ }\mu\text{l/孔}$ 的柠檬酸盐-磷酸盐底物溶液(0.1M 柠檬酸和 0.2M 磷酸钠, 0.01% H_2O_2 和 1 mg/ml OPD), 在室温下温育 15 分钟。通过添加 $25\text{ }\mu\text{l/孔}$ 的 4N 硫酸停止反应并通过自动 ELISA 平板阅读仪(Molecular Devices Spectromax Plus, Sunnyvale, CA)读出 OD_{490} 。

在室温下将 200 ng/ml IL-6($100\text{ }\mu\text{l}$)与起始于 $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的 10 倍连续稀释的抗体($100\text{ }\mu\text{l}$)温育 1 小时, 以测试与 hIL-6 单克隆抗体或 CNTO

328 预温育的 IL-6 的效果。然后在室温下将该预温育混合物与 sIL-6R 温育 1 小时,并在室温下使用山羊抗人 IgG (H+L)-HRP-缀合物(10 $\mu\text{g/ml}$,溶于 PBS 中)温育 30 分钟,检测 sIL-6R/IL-6/抗人 IL-6 复合物。其他测定条件与之前段落中所述的相同。

之前的研究已显示当 CNTO 328 为根据 EIA 平板内部技术报告所包被的 sIL-6R 捕捉时,其能检测 IL-6。此外,利用 EIA, AME-A9、AME-A16、AME-18a、AME-20b、AME-22a 和 AME-23a 能检测 IL-6 以剂量依赖方式与 sgp80(sIL-6R)的结合。根据 CNTO 328 评估每个人工程抗-IL-6 抗体。然而,IL-6 和这些抗 hIL-6 单克隆抗体的任何一种预保温,消除了 sIL-6R 与 IL-6 结合的能力。

测定抗 IL-6 IgGs 的动力学常数

使用 Sapidyne 制造的 KinExA 3000 仪器测定结合动力学。简言之,将人 IL-6 共价偶联于 alzactone 珠子上,并在仪器上检测游离的 IgG 与珠子的结合。以测量 K_D ,于 0.1% BSA, PBS 中,在 20°C 下温育含有 0.5、1 或 5 pM 恒定浓度的 IgG 与减少的连续稀释的人 IL-6 的单个试管 3-4 天。对于每次 K_D 测定使用了总共 13 个试管。例如,使用 5 pM 恒定浓度的嵌合抗 IL-6 抗体,并将单个试管与 0-200 pM 的 IL-6 温育。以类似方式进行其他 IgGs 的温育。温育后,根据厂商使用说明,在 KinExA 3000 仪器上测定每个平衡的样品中的游离的 IgG。如以下更详细的描述,使用 KinExA 3000 仪器通过 KinExA 3000 软件测定 K_D 值。

将 200 pM 的单种 IgGs 与 100-200 pM 的人 IL-6 混合以测定 k_{on} ,通过在 KinExA 3000 仪器上与共价偶联 alzactone 珠子的人 IL-6 的结合测定未结合的 IgG。随着时间过去进行一系列的测定。使用 KinExA 3000 软件,将所得到的数据用于计算 k_{on} 。通过使用公式 $K_D = k_{off}/k_{on}$ 计算 k_{off} 。抗 IL-6 IgGs 的动力学常数概示于表 7 中。

实施例 4: 体外鉴定抗 IL-6 抗体

进行体外研究以鉴定抗 IL-6 抗体的序列、表位特异性、亲和力以及生物活性。

人工程 mAb

序列分析证实了本发明的抗 IL-6 抗体(具体表现为不同的变体/克

隆)含有完整的人构架区。表 5a 显示了与嵌合抗 IL-6 抗体(描述于 PCT WO 04/039826)相比, 在本发明的抗 IL-6 抗体(在不同的抗体变体中)的 CDR1、2 和 3 的重链和轻链中总共有 10 个氨基酸残基改变。

表位特异性

本发明的抗 IL-6 抗体和嵌合抗 IL-6 抗体识别人 IL-6 上相似的表位。这些抗体不与获得自 R&D Systems #MAB-206 的商用小鼠抗人 IL-6 mAb 竞争, 暗示它们识别的表位是独特的, 不同于 R&D 抗 IL-6 mAb 的表位。本发明的抗 IL-6 抗体和嵌合抗 IL-6 抗体不与 R&D 大鼠抗-人 IL-6 mAb 竞争。

通过平板结合的抗 IL-6 mAb(小鼠抗人 IL-6 mAb, MAB-206, 仅用作作为平板结合的 mAb 来捕捉人 IL-6) (10 µg/ml)捕捉人 IL-6 (200 ng/ml), 并连续稀释本发明的抗 IL-6 抗体和嵌合抗 IL-6 抗体, 然后如沿着 X-轴所示添加到平板上。测通过沿着 Y-轴增加的 OD₄₉₀ 测定与 IL-6 的结合。本发明的抗 IL-6 抗体和嵌合抗 IL-6 抗体都显示剂量依赖的与 IL-6 的结合。

相反地, 本发明的抗 IL-6 抗体和嵌合抗 IL-6 抗体竞争性结合人 IL-6, 暗示这两个分子均具有 IL-6 上相似的结合表位。通过平板结合的 MAB-206 (10µg/ml)捕捉人 IL-6 (200 ng/ml)。然后添加如沿着 X-轴所示的连续稀释的本发明的抗 IL-6 抗体和 50 ng/ml 的生物素化的嵌合抗 IL-6 抗体到平板上。通过抗生物素蛋白链菌素-HRP 检测生物素化的嵌合抗 IL-6 抗体与 IL-6 的结合, 并测定为沿着 Y-轴的 OD₄₉₀ 读数。

此外, 人工程和嵌合抗体显示相似的结合 sIL-6/sIL-6R 复合物的特性(图 1)。 本发明的抗 IL-6 抗体结合 sIL-6/SIL-6R 复合物。可溶性 IL-6 受体(sIL-6R)以 10 µg/ml 浓度包被在平板上。然后以 200 ng/ml 浓度添加人 IL-6 到平板上。接着添加如沿着 X-轴所示的连续稀释的本发明的抗 IL-6 抗体或嵌合抗 IL-6 抗体到平板上, 并使用 HRP-抗人 IgG 检测与 IL-6/sIL- 6R 复合物的结合, 并测定为沿着 Y-轴的 OD₄₉₀ 读数。

在基于 7TD1(IL-6 依赖鼠杂交瘤细胞系)细胞增殖测定中, 使用产生自 LPS 和 IFN γ -刺激的不同物种的 PBMCs 的含 IL-6 的条件上清液进行交叉物种反应性测试以进一步证实上述发现。在刺激来自包括人、狨猴、恒河猴、黑猩猩、猕猴、狒狒、短尾猴和绢毛猴(cotton top

monkey)在内的多种灵长类物种的 7TD1 细胞增殖中,本发明的人工程抗体显示了中和条件上清液活性,与嵌合抗体相比还显示了相似的交叉物种反应性图谱(表 8)。

最后,当使用胰蛋白酶消化法进行表位作图时,观察到对于人工程和嵌合抗体,人 IL-6 上相同的结合表位,其位于跨越螺旋 D 的氨基酸残基 168-184(图 3)。近来突变分析证实了残基 179 和 182 是本发明抗体与 IL-6 结合所必需的。在人工程化抗 IL-6 抗体存在下,该表位(氨基酸残基 168-184)被鉴别为位于保留有氘的 IL-6 表面上。

生物活性

通过基于 7TD1 细胞的生物测定法测定人工程化抗 IL-6 抗体的 IL-6 中和效价。在 7TD1 细胞增殖测定中,与嵌合抗 IL-6 抗体相比人工程化抗 IL-6 抗体证实具有 10 倍更高的中和效价。在连续稀释的人工程化抗 IL-6 抗体或嵌合抗 IL-6 抗体或同种型对照 mAb 存在下,用 500 pg/ml 的 hIL-6 刺激 7TD1 细胞 72 小时。细胞增殖测定为如 Y-轴上所示的每秒计数。误差线代表复样的 SD。实心圆代表无 IL-6 的细胞;空心圆代表用 500 pg/ml 的 hIL-6 刺激的细胞。

人工程化抗 IL-6 抗体还抑制 IL-6-诱导的 U937 细胞单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)产生(图 3)和 IL-6/IL-1 β -诱导的 HepG2 人肝癌细胞血清淀粉样蛋白 A(SAA)产生(图 4)。图 3 证实了人工程化抗 IL-6 抗体抑制 IL-6 刺激的 U937 细胞 MCP-1 分泌。用 1 ng/ml 的 hIL-6 和连续稀释的人工程化抗 IL-6 抗体处理 5×10^5 个细胞/孔 72 小时。通过 ELISA 分析细胞培养物上清液中 MCP-1 的存在,分析重复三次。

图 4 显示了人工程化抗 IL-6 抗体抑制 IL-6 和 IL-1 β 刺激的 HepG2 细胞 SAA 分泌。在连续稀释的人工程化抗 IL-6 抗体存在下,用 100 ng/ml 的 hIL-6、200 ng/ml 的 sIL-6R 和 1 ng/ml 的 IL-1 β 刺激 2.25×10^5 个细胞 24 小时。然后通过 ELISA 分析细胞培养物上清液中 SAA 的存在。

IL-6 依赖的 Stat3 磷酸化

进行免疫沉淀测定以测试于在细胞表面上表达 gp130 的 THP-1 细胞中对 IL-6 依赖的 STAT3 磷酸化的作用来评估人工程化抗 IL-6 抗体阻断由 IL-6 结合 IL-6R 和 gp130 所引起的信号级联的能力。

对 mAbs 无菌过滤消毒并于 4℃ 下贮存在 PBS 中。使用来自 R&D

Systems (Minneapolis, MN)的重组人 IL-6 (206-IL-010)和 sIL-6R (227-SR-025)。RPMI 培养基(11875-085)、热灭活的胎牛血清(16000-069)、L-谷氨酰胺(25030-081)、非必需氨基酸(11140-050)和丙酮酸钠(11360-070)获得自 Invitrogen (Carlsbad, CA)。还使用了 TBS (10 mM Tris, pH7.5, 100 mM NaCl)。

经测试 THP-1(一种从研究细胞库(research cell banks)获得的人急性单核细胞性白血病细胞系)为支原体阴性且不含有细菌。在含有 10% 胎牛血清、2mM 谷氨酰胺和 1 mM 丙酮酸钠的 RPMI 培养基中培养这些细胞。传代培养细胞或当培养物达到大约 85%汇合时收获细胞。每 3 天细胞就按常规分裂为 1:5。

对于酪氨酸磷酸化,细胞在 T-225 烧瓶中生长至 80-90%汇合。弃去培养基并用无血清的新鲜培养基替换,温育过夜。在血清饥饿后,从每个烧瓶中收获细胞,压丸并将每种条件下终浓度 20×10^6 个细胞重悬于 0.5 ml 无血清培养基中。

将 RhIL-6 (0.1 $\mu\text{g/ml}$)与下列试剂:0.5 ml 单独的培养基、抗 IL-6 Ab (10 $\mu\text{g/ml}$)和 sIL-6R (0.2 $\mu\text{g/ml}$)在 37°C 下预温育 15 分钟。然后分别添加 sIL-6R(0.2 $\mu\text{g/ml}$)和抗 IL-6 Ab(10 $\mu\text{g/ml}$)到与抗 IL-6 Ab 和 sIL-6R 预温育的细胞中,在 37°C 下温育 15 分钟。接着细胞与作为阴性对照的培养基和 IL-6/Ab/sIL-6R 复合物结合,并在 37°C 下温育 6 分钟。在冰冷的 TBS 中洗涤细胞两次,并如 5.4 节所述的处理细胞粒状沉淀或贮存在 -70°C 下。

对于免疫沉淀反应,在含有全部蛋白酶抑制剂混合物片(1697498, Roche, Basel, Switzerland)的 1 ml 裂解缓冲液(50 mM Tris, pH7.5, 300 mM NaCl, 0.5% Triton-X-100) (T-9284, Sigma, St. Louis, MO)中溶解细胞粒状沉淀。涡旋细胞 30 秒并在 -70°C 下温育 20-60 分钟。13,000 rpm 离心 20 分钟除去细胞碎片。通过在定轨混合器上于 4°C 下与 2 μg 兔 IgG(15006, Sigma, St. Louis, MO)加 50 μl 蛋白 A 琼脂糖(SC-2001, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)温育 1 小时预清洁样品以减少非特异性背景染色。通过 2500 rpm 离心 5 分钟除去琼脂糖珠子。将澄清的裂解液转移到微型离心管中并在定轨混合器上于 4°C 下与抗 STAT3 (2 $\mu\text{g/ml}$) (SC-7179, Santa Cruz Biotechnology)温育过夜,之后添加 50 μl 蛋白 A 琼脂糖珠子并在定轨摇床上于 4°C 下温育 2 小时。通过 2500 rpm

离心 5 分钟收集琼脂糖珠子，并于 4℃下在冰冷的 TBS 中洗涤 5 次。然后，将琼脂糖珠子重悬于加 DTT 的 40 μ l Laemmli 样品缓冲液(NP0007-465030, Invitrogen, Carlsbad, CA)中，并在 95℃下加热 5 分钟。

在带有运行缓冲液(NP0002-465026, Invitrogen, Carlsbad, CA)的 3-8% NuPage Bis-Tris 凝胶(EA0375BOX, Invitrogen, Carlsbad, CA)上于 100 V 下跑 1 小时解析样品。在 30 V 下使用转移缓冲液(NP0006-465029, Invitrogen, Carlsbad, CA)跑 1 小时将蛋白转移到硝酸纤维素膜(LC2001, Invitrogen, Carlsbad, CA)上。于 4℃下在溶于 TBS-T 的 10% 脱脂乳粉(Nestle, Glendale, California)中封闭膜过夜。在室温下于 TBS-T 中洗涤几次后，在定轨摇床上于 4℃下将膜与在 TBS-T 中 1:1000 稀释的小鼠单克隆抗 p-STAT3 Ab (SC-8059, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)温育 4 小时。几次洗涤后，接着在定轨混合器上于室温下将膜与驴抗小鼠 IgG-HRP (1:1000) (SC-2318, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)温育 2 小时。几次洗涤后，根据厂商实验方案，使用 ECLplus 蛋白质印迹检测试剂和分析试剂盒(RPN2108, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)检测样品，并通过暴露于 ECL 胶片得以显象。接着，通过将膜于 100℃下浸没于 100 mM DTT, 2% SDS, 62.5% mM Tris-HCl, pH 6.7 中搅拌 30 分钟，剥离 Ab。然后在 TBS-T 中洗涤膜并用 10%脱脂乳粉封闭过夜。于 4℃下用溶于 TBS-T 中的抗 STAT3 (1:1000) (SC-7179, Santa Cruz Biotechnology)洗涤并温育膜 2 小时，洗涤 5 次，之后与山羊抗兔 IgG-HRP (1:1000) (SC2030, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)温育 1 小时，并使用 ECLplus 检测。所有的膜都毫无例外地被剥离了 Ab 并用 STAT3 重标记以证实 STAT3 蛋白的存在。

结果显示人工程化抗 IL-6 抗体阻断了 IL-6-介导的 stat3 磷酸化—IL-6 信号通路中一种关键的组成部分(图 5A 和 5B)。人工程化抗 IL-6 抗体(AME-19A)抑制了 IL-6/sIL-6R-诱导的 stat3 磷酸化。在 THP-1 细胞中检测到了重组人 IL-6/sIL-6R-诱导的 stat3 磷酸化(图 5B)。添加 10 μ g/ml 的人工程化抗 IL-6 抗体(AME-19A)或嵌合抗 IL-6 抗体完全抑制了 stat3 磷酸化(图 5B)。图 5A 显示了相应于不同的人工程化抗 IL-6 克隆在所有样品中存在着相似量的未被磷酸化的 stat3 蛋白。在此使

用的 CNTO328(或 328)指嵌合的人-鼠抗体(也称为野生型(WT)), 150 指克隆 AME-22a, 143 指克隆 AME-23a, 140 指克隆 AME-20b, 136 指克隆 AME-19a, 130 指克隆 AME-18a, 106 指克隆 AME-A16, 104 指克隆 AME-A9。

人工程化抗 IL-6 抗体的体内有效性

在两个不同的体内模型中评估人工程化抗 IL-6 抗体的有效性。首先, 在小鼠的人 IL-6-诱导的基质胶血管发生测定中测试并比较人工程和嵌合抗 IL-6 抗体的效果。200 ng/ml 的人 IL-6 包括在基质胶栓中。将两个基质胶栓塞入每只裸小鼠中。6 只小鼠的组接受 1、3 或 6 mg/kg 人工程或嵌合抗 IL-6 抗体的静脉注射。还将 PBS 或同种型对照 mAb 施用于对照组。第 7 天拔去基质胶栓并通过基质胶栓中血红蛋白含量、微血管长度和微血管数量测定血管发生。通过测定所有三个参数, 结果显示人 IL-6 (PBS 组)刺激了基质胶栓模型中的血管发生。

人工程化抗 IL-6 抗体(AME-19A)抑制了基质胶栓中微血管的平均数量。此外, 人工程化抗 IL-6 抗体(AME-19A)抑制了基质胶栓中微血管的平均长度。同样, 人工程化抗 IL-6 抗体(AME-19A)抑制了基质胶栓中的血红蛋白水平。

此外, 人工程(AME-19A)和嵌合抗 IL-6 抗体都剂量依赖性地抑制裸小鼠中 IL-6-介导的血管发生。最终, 在最高测试剂量 6mg/kg 下, 在抑制 IL-6-诱导的血管发生中人工程和嵌合抗 IL-6 抗体显示了可比较的活性。尽管如通过血管长度和血管数量所测定的, 在 3 mg/kg 下嵌合抗 IL-6 抗体明显抑制了人 IL-6-诱导的血管发生, 但在这些剂量下, 人工程和嵌合抗 IL-6 抗体之间没有检测到统计学上显著差异。

开发了一种额外的体内模型用于进一步评估人工程化抗 IL-6 抗体对 Balb/C 小鼠中人 IL-6-诱导的急性期反应物—血清淀粉样蛋白 A (SAA)的作用。在静脉注射施用 5 μ g/kg 的人 IL-6 之前 4 小时, 小鼠接受腹腔注射施用的 0.01、0.5 或 5 mg/kg 的人工程化抗 IL-6 抗体(图 6)。PBS 和同种型对照 mAb 用作为对照。在 IL-6 注射后 16 小时测定血清 SAA 水平。人工程和嵌合抗 IL-6 抗体在 0.5 和 5 mg/kg 下都明显地抑制了 Balb/C 小鼠中人 IL-6-诱导的 SAA 产生, 在测试的最低剂量下人工程化抗 IL-6 抗体明显地抑制了 SAA 产生。然而, 在所有三种测试剂量下, 人工程和嵌合抗 IL-6 抗体之间没有观察到统计学上显著

差异(图 6)。

图 6 显示了人工程化抗 IL-6 抗体抑制人 IL-6-诱导的 SAA 产生。每一个点代表 每只动物的 SAA 平均值, 线代表每组中所有数据点的平均值。进行成对比较, 并使用 Tukey's 95%联合置信区间, 以便控制总体 I 型误差(** $p < 0.001$, * $p < 0.05$)。

实施例 5 -抗 IL-6 mAb 的治疗理论依据

类风湿性关节炎. 抗 IL-6 mAb 对胶原诱导的关节炎(CIA)—一种类风湿性关节炎动物模型的作用

临床前体内疾病模型

在多种体内模型中业已靶向了 IL-6。在标准鼠模型使用大鼠抗小鼠 IL-6 抗体, 或在灵长类动物模型和人/小鼠 SCID 模型中使用人源化抗 IL-6R(80kDa) mAb (MRA; Chugai)。在鼠胶原诱导的关节炎(CIA)中, 如果较早使用(用胶原免疫后第 0 或 3 天), 则抗 IL-6 有效地预防了疾病, 但在之后的时间点使用则无效。在其中人滑液组织被移植到免疫缺陷型小鼠中的人/小鼠 SCID 移植模型中, MRA 处理导致组织移植收缩并减少炎症细胞和破骨细胞。在恒河猴 CIA 中, MRA 抑制了关节炎发展, 并改善了急性期测量值。

已在 CIA 模型中评估了替代物抗小鼠 IL-6 mAb 对疾病发展的作用。结果显示, 如明显降低的疾病严重程度所反映的, 在疾病诱导前以 1 mg/小鼠/周腹腔注射施用抗小鼠 IL-6 明显地抑制了胶原诱导的关节炎的发展。用处于弗氏完全佐剂(FCA)中的 100 μ g II 型牛胶原皮内注射尾部, 在 8 周龄 DBA/1 LacJ 小鼠中诱导关节炎。每日临床监测小鼠疾病发作。在 CIA 诱导 2 天前, 腹腔注射施用 1 mg/小鼠的抗 IL-6 mAb 或同种型对照 mAb, 此后每周注射一次。基于肿胀、红斑和关节变形确定关节炎得分。

组织病理学数据证实了每周腹腔注射一次抗小鼠 IL-6 mAb 明显地改善了胶原诱导的关节炎参数的临床观察。与对照 mAb 处理的动物相比, 在抗小鼠 IL-6 处理的小鼠中所有被检查的关节炎参数包括炎症反应(滑膜炎和血管翳形成)和侵蚀改变(侵蚀和整个关节结构)都显著地得到改善。抗 IL-6 mAb 在组织病理学水平上抑制了关节炎。基于滑膜厚度对滑膜炎打分; 基于相对于关节间隙的血管翳程度对血管

髌形成打分；以及基于侵入软骨和软骨下骨的程度对侵蚀打分。

在用抗小鼠 IL-6 mAb 处理的小鼠中软骨基质蛋白的损失明显减少。通过甲苯胺蓝染色对在研究末期(第 53 天)获得自对照和抗 IL-6 mAb 处理的动物的代表性关节切片检查软骨基质。

微-CT 分析支持了在个体关节中在疾病进展的水平上抗小鼠 IL-6 治疗起作用的临床观察。与抗小鼠 IL-6 处理动物关节中占优势的轻度软组织炎症改变相比,对典型的 3D CT 图像直接观察显示了发生在同种型对照 mAb 处理组中显著的侵蚀改变。使用对照 mAb 处理的代表性动物和抗小鼠 IL-6 mAb 处理的动物进行实验。

狼疮. 在 NZB/W F1 小鼠中抗 IL-6 的作用

临床前体内疾病模型

鼠模型存在着 SLE, 且这些与人疾病密切相似。对 MRL/lpr 和 NZB/W F1 品系的研究证实了与人疾病密切相似的 B 细胞过度增殖, 自身抗体产生和免疫复合物沉积。在 NZB/W F1 小鼠中抗 IL-6 mAb 显示能有效地抑制自身抗体产生、降低蛋白尿并改善动物生存。

已在 NZB/W F1 小鼠中评估了替代物抗小鼠 IL-6 mAb 对狼疮发病的作用。初步结果证实了以 1 mg/小鼠/周腹腔注射施用抗小鼠 IL-6 mAb 22 周抑制了抗 dsDNA 自身抗体——一种在该疾病模型中主要的病原性自身抗体的产生(图 7)。与盐水和对照 Ab 处理的动物相比,在整个研究中抗 IL-6 mAb 处理的动物中抗 dsDNA 自身抗体水平始终如一地更低。

如上所讨论的,图 7 显示了在 NZB/W F1 小鼠中通过抗 IL-6 mAb 抑制了抗 dsDNA 自身抗体产生。使每种样品的个体 O.D.值对阳性对照血清归一化并表示为%阳性对照。每个点代表每种样品的%阳性对照,线代表每组中所有数据点的平均值。显著差异表示为 $*p<0.01$ 。

此外,当对小亚组的动物进行检查时,抗 IL-6 mAb 抑制了 B-细胞增殖并减少了肾损害。虽然在研究末期不同处理组之间的 T 细胞增殖没有显著差异,但随着时间的过去,特别是在 34 周后,与盐水处理的小鼠相比,在抗 IL-6 mAb 处理的小鼠中抗 IgM 和抗 CD40 诱导的 B-细胞增殖降低。该结果与上述报道的减少的抗 dsDNA 自身抗体产生相一致,暗示了对于抗 IL-6 mAb 处理,自身反应 B 细胞可能是直接的主要的靶点。

组织病理学分析显示该研究中的动物能分为3类肾病严重程度组(轻度、中度和重度)(表9)。NZB/W F1小鼠中的肾病病理学显示了肾小球基底膜中混合性淋巴样增生以及免疫复合物沉积。

用抗IL-6 mAb处理的动物发展为不严重的肾病。在抗IL-6 mAb处理的动物中不存在血管周围混合性淋巴样增生和蛋白沉积,但用盐水和对照Ab处理的动物则发展为中度和重度血管周围混合性淋巴样增生和蛋白沉积。此外,与其他两个处理组相比在抗IL-6 mAb处理的动物中肾小球基底膜中存在轻度免疫复合物沉积。因为这些细胞在SLE病理中其关键的作用,故进行了进一步的抗IL-6 mAb对B、T和巨噬细胞功能作用的机制分析。

II 型糖尿病

业已显示IL-6在与肥胖症相关的胰岛素抵抗力发展中起重要作用。然而,迄今为止所得到的体外和体内数据既支持又反对了其在胰岛素抵抗力中潜在作用。

体外实验

使用胰岛素敏感组织体外模型(对于脂肪组织3T3 L1细胞、对于肝细胞HepG2细胞、对于骨骼肌C2C12细胞)以及胰岛素抵抗力和T2DM的体内模型例如db/db小鼠,已进行实验以更好地理解IL-6可能具有的对胰岛素信号传导和胰岛素生物学效应以及功能例如葡萄糖摄取、基因调节和有关机制的作用。

体外数据暗示在肝脏中IL-6主要对胰岛素信号传导起作用。HepG2细胞的IL-6处理导致对胰岛素诱导的Akt磷酸化的抑制。该IL-6对胰岛素信号传导的抑制作用为抗IL-6抗体所阻断。已暗示肝脏中葡萄糖代谢改变和胰岛素作用是驱动胰岛素抵抗力和T2D发展的原因。检查了IL-6对3T3 L1细胞(脂肪细胞系)和C2C12(骨骼肌细胞系)中胰岛素信号传导的作用,以确定T2D中IL-6的机制。

3T3 L1. 使用3T3 L1小鼠脂肪细胞系进行实验。在90%分化的3T3 L1细胞中,评估了IL-6对胰岛素诱导的葡萄糖摄取的作用。在这些实验中,用10 ng/ml的TNF α 处理24小时始终如一地抑制了胰岛素诱导的葡萄糖摄取,而20 ng/ml的IL-6则没有任何作用。这些数据暗示IL-6对脂肪组织的活性并非IL-6介导的胰岛素抵抗力的主要机制,脂肪组织可能是之后干扰肝脏和肌肉中胰岛素敏感性的IL-6

的主要来源。使用来自皮下脂肪库的分化的初级人脂肪细胞获得了相同的数据。使用来自内脏脂肪库人初级脂肪细胞测试了 IL-6 对葡萄糖摄取的作用，因为对于与胰岛素抵抗力有关的肥胖症，脂肪库可能是更相关的。

HepG2. 选择 HepG2 细胞作为肝脏组织体外代表物。HepG2 细胞是其中之前业已显示 IL-6 对胰岛素信号传导的作用的人肝癌细胞系。在实验中，20 ng/ml 的 IL-6 阻断了胰岛素诱导的 Akt 磷酸化——一种胰岛素信号传导通路中的关键激酶，在温育 60 分钟后观察到具有最大的作用；与科学文献中所报道的结果相一致。

在 rh IL-6 (20 ng/ml) 温育 30、60、90 和 120 分钟后，测定 10 cm 平皿中亚汇合的 HepG2 细胞上的 Akt 磷酸化。在温育的最后 5 分钟期间，添加 0.5 nM、1 nM 和 5 nM 胰岛素以诱导 Akt 磷酸化。使用改良的 RIPA 裂解缓冲液溶解细胞，并利用 Ser-Phospho-Akt ELISA 测定 Akt 磷酸化。利用 pAkt 和 Akt ELISA 试剂盒(BioSource)获得结果。在 IL-6 处理的第 60 分钟，在生理学浓度的胰岛素(0.5-1 nM)存在下，与对照组相比，Akt 磷酸化被抑制~50%。使用 Pierce BCA 蛋白测定试剂盒定量蛋白浓度。

IL-6 抗体的作用

测定了人工程化抗 IL-6 抗体抑制 IL-6 对胰岛素诱导的 Akt-磷酸化作用的能力。在 HepG2 细胞中 20 μ g/ml 的人工程化抗 IL-6 抗体能抑制 IL-6 作用。图 8A 和 8B 显示了在人工程化抗 IL-6 抗体存在或不存在下 IL-6 对胰岛素诱导的 Akt 磷酸化的作用。

在顶上的图中(图 8A)，数据为平均值 $\pm$ SEM. (*显著，与(+)胰岛素、IL-6 相比， $P=0.029$ ；**显著，与(+)胰岛素+IL-6 相比， $P=0.02$)。用 20 ng/ml 的 IL-6 处理亚汇合的 HepG2 细胞 60 分钟。在处理最后 5 分钟期间，添加 1 nM 胰岛素并使用改良的 RIPA 缓冲液溶解细胞。通过检测 Akt 的 Ser 473 磷酸化的 ELISA 分析样品。所有数据均对通过 ELISA 测定的总 Akt 归一化。AME-19a 处理能恢复正常的 Akt 信号传导。

在底下的图中(图 8B)，显示了代表性的蛋白质印迹。顶上的条带包括用 IL-6 (20 ng/ml, 60 分钟，用 1 nM 胰岛素，5 分钟)、AME-19a (20 μ g/ml $\pm$ IL-6 (20 ng/ml, 60 分钟)，用 1 nM 胰岛素，5 分钟)或缓

冲液处理的样品。用抗磷酸 Ser/Akt 抗体(上部区域) (pS473, Biosource) 探测印迹。底下的条带(剥离下上述印迹并用来自 BioSource 的抗 Akt 重探测)显示了每道中加载了等量蛋白。

方法: 在 100 mm 组织培养皿中培养 HEPG2 细胞直至汇合。在 DMEM-1%BSA 中使细胞饥饿过夜。在 IL-6 添加前, 对细胞温育 AME-19a (20 ug/ml)约 30 分钟。在添加到细胞前, 温育 IL-6 (20 ng/ml) +/- AME-19a (20 ug/ml)约 30 分钟。于 37°C 下对细胞温育样品 60 分钟; 然后添加 1 nM 胰岛素(终浓度)至细胞, 在室温下温育 5 分钟。马上用冰冷的 PBS 漂洗 3 次来洗涤细胞。冷冻平板直至用于裂解为止。使用 ELISA 试剂盒(BioSource and Sigma)测定磷酸基 Akt 和总 Akt。

参考文献: JJ Senn, PJ Kover, IA Nowak 和 RA Mooney. Interleukin 6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes*. 51:3391-3399, 2002。

原代大鼠肝细胞

原代肝细胞是一种更相关的适合于测试 IL-6 和抗 IL-6 抗体(或其他 IL-6 拮抗剂)对胰岛素信号传导作用以及胰岛素对肝葡萄糖产生作用的体外系统。在 5 ng/ml IL-6 存在或不存在下用胰岛素处理分离的细胞, 并使用 ELISA 测定和蛋白质印迹分析测定胰岛素受体、IRS-1(图 12A)和 Akt(图 12B)的磷酸化, 来测定胰岛素、IL-6 和/或 IL-6 mAb 处理的大鼠肝细胞中 PI3 激酶(PDK)活化。此外, 检查 IL-6 对胰岛素刺激的 IRS1/p85 缔合的作用(图 11A 和 B)。该实验进行如下:

在 6 孔胶原包被的平板中将原代大鼠肝细胞(~2 个月大的)于 Hepatocyte 培养基中平衡过夜。第二天, 在 DMEM-1% BSA-penn strep 中使细胞饥饿 6 小时; 然后在 37°C 下与 hIL-6 (5 ng/ml); 抗 IL-6 抗体(AME-19a) (20 ng/ml)或抗 IL-6 抗体(AME-19a) +hIL-6 温育 90 分钟。在添加上述组合前用抗 IL-6 抗体(AME-19a)预处理细胞 1 小时。在添加到细胞前该组合也进行预温育。添加 5 nM 胰岛素(来自 BioSource)至细胞, 温育 5 分钟; 然后抽出细胞并马上用 BioSource 抽提缓冲液+蛋白酶抑制剂裂解。离心溶胞产物, 1:10 稀释上清液并用于 ELISAs (来自 Biosource)测试。

IRS1/p85 缔合:

将等量的蛋白(45µg)与 2µg 抗 IRS-1 多克隆抗体(来自 Upstate, 产

品#06-248)温育过夜。然后用蛋白 A 珠子免疫沉淀样品 1 小时,并用 3x 样品缓冲液洗脱用于 SDS-PAGE。接着在 4-12% SDS-Page 凝胶上跑 IP 样品,然后转移到膜上用于蛋白质印迹分析。膜用以下来探测:(1) 对于 IRS-1 缔合的 p85,即活化的 PI3K(如图 11A 所示),用 1:100 稀释的 p85 mAb(来自 Upstate,产品#05-217);和(2) 对于作为加载对照的总 IRS-1(如图 11B 所示),用 1:600 稀释的 IRS-1 mAb(来自 BD Biosciences,产品#611395)。

数据显示 IL-6 处理导致减少的胰岛素诱导的 IR、IRS-1 和 Akt 磷酸化。当用抗 IL-6 抗体(克隆 AME-19a)预处理细胞时,该 IL-6 的作用消失了。此外,IL-6 抑制了胰岛素诱导的 p85(PI3K 亚基)与 IRS-1 的缔合。同样,通过用抗 IL-6 抗体预处理也抑制了该 IL-6 的作用。

体内实验

在动物中还没有进行过 IL-6 对胰岛素敏感性作用的广泛测试。为了评估抗 IL-6 治疗是否会改善胰岛素敏感性和 T2DM,用商用抗小鼠 IL-6 抗体(获得自 R&D Systems)处理高脂饮食的 db/db 小鼠和 C57/B16 雄性小鼠。

db/db 小鼠

使用不同年龄的 db/db 小鼠测试抗 IL-6 处理的效果。8-10 周龄的小鼠具有高胰岛素血症和胰岛素抵抗力的特征,因此代表了早期疾病,而 12-14 周龄小鼠除高胰岛素血症之外还具有升高的葡萄糖水平,因此代表了晚期 T2DM。在腹膜内葡萄糖耐量试验(ipGTT)中,这两个年龄组的小鼠都用于测试抗 IL-6 治疗改善胰岛素敏感性和甘油对照的能力。

由于瘦蛋白受体中存在突变,因此 db/db 小鼠具有无功能的瘦蛋白信号传导。随着小鼠长大这些小鼠发展为肥胖症、高胰岛素血症和胰岛素抵抗力,当小鼠 6-8 周龄时,检测到最先出现的症状。已用 5 mg/kg 抗 IL-6 mAb 处理了两组不同年龄的小鼠—8 和 12 周龄,并在处理后第 1 和 7 天进行了腹膜内葡萄糖耐量试验(ipGTT)。处理程序如图 15 中所示。

在 8 周龄动物中,用抗 IL-6 mAb 处理并不对 GTT 过程中葡萄糖清除率起作用。在 12 周龄动物中抗 IL-6 mAb 处理导致改善的葡萄糖耐量(GT),尽管作用并不是统计学上显著的($p=0.063$)。处理后的第 7

天观察到了该 GTT 改善。此外, 分析了研究完成前后的血清样品中的脂肪细胞因子和脂连蛋白分布。IL-6、TNF α 和 MCP-1 的水平低于检测水平。一并考虑该数据以及来自 ipGTT 的结果, 可暗示: db/db 动物并不是用于研究抗 IL-6 对胰岛素抵抗力作用的好模型; 并且对于 IL-6 在胰岛素抵抗力和 T2DM 发展中所起到可能的作用, IL-6 的组织水平更加相关。

饮食诱导的肥胖症(DIO)-用于肥胖症和胰岛素抵抗力的动物模型

喂给 C57/B1 雄性小鼠含有 60%脂肪的食物 20-35 周。它们发展为肥胖症(平均体重为 50.5 g)并增加了空腹血糖水平(FBG >145 mg/dl)。此外, 它们具有受损的 GT。用 10 mg/kg 鼠抗 IL-6 Ab (R&D Systems)处理 DIO 动物。总的来说, 在 3 周内它们接受了 50 mg/kg 抗 IL-6 mAb。在最初 2 次给药后(第 5 天)、第 4 次给药(第 12 和 16 天)后以及第 5 次给药(第 23 天)进行 ipGTT。与此同时, 采血用于脂肪细胞因子和脂连蛋白的测量。

在第 5 和 12 天抗 IL-6 处理不能改善葡萄糖耐量; 然而, 当在第 16 和 23 天进行时, 观察到葡萄糖清除率和葡萄糖偏移水平都得到改善。在 GTT 期间在 39、60 和 90 分钟该改善达到统计学上显著。

在另一组实验中, 用 10 和 20 mg/kg 抗 IL-6 Ab 和 20 mg/kg IgG 同种型对照通过腹膜内途径每周处理 DIO 动物一次(在第 1 周内给药 2 次, 在之后的 4 周每周给药 1 次)。已进行了 HOMA-IR(在处理 2、4 和 6 周后)、ipGTT、ipITT 和脂肪细胞因子分布(在处理的第 6 周)。

对抗 IL-6 Ab 处理的 DIO 动物进行 HOMA-IR 分析:

在这些研究中, 用 10 和 20 mg/kg 鼠抗 IL-6 Ab 和同种型对照处理的 DIO 动物中空腹血糖和胰岛素水平都降低了。对动物抽血并分别使用痕量/DMA 葡萄糖(ox) (thermo Electron Corp)和超灵敏大鼠胰岛素 Elisa (Crystal Chem)测定空腹葡萄糖和胰岛素水平。这些值被用于测定 HOMA-IR。HOMA-IR 指数反映了胰岛素敏感性的情况, 并且其与压板(clamp)研究的结果非常相关。通过公式: (空腹葡萄糖(mM) X 空腹胰岛素(mIU/Lit))/22.5 计算 HOMA-IR(图 13A、B 和 C)。

在处理 2、4 和 6 周后观察到 HOMA-IR 的改善(图 13A-C 显示了处理 6 周后的数据)。在研究末期, 进行 ipGTT 和 ipITT。在这两个测试中, 当与同种型处理的动物相比时, 抗 IL-6 处理(20mg/ml)明显地

改善了葡萄糖偏移和清除率。

来自对照和抗 IL-6 处理的动物的血清样品的脂肪细胞因子和细胞因子分析显示随同着 MCP-1 和抵抗素水平减少的趋势, IL-6 中和导致循环 IL-6 和 TNF α 水平的减少。在另一组数据中, 用抗 IL-6 处理增加了脂连蛋白水平。

进行了来自处理和对照组肝样品的组织学分析。用油红 O 染色样品来测定肝实质中脂质含量。响应于鼠抗 IL-6 抗体的处理 DIO 动物中肝脂质含量下降。

染色揭示了在未处理的动物中 34% 的载体处理的肝样品是脂质相关的, 而在 20 mg/kg 抗 IL-6 处理的动物中则只有 8% (图 14A-F)。图 14A 和 D 为对照组; 图 14B 和 E 为未处理的 DIO 动物; 以及图 14C 和 F 为抗 IL-6 处理的动物。增加的脂质肝含量与胰岛素抵抗力和 II 型糖尿病的发展相关。因此, 可以设想 IL-6 中和通过影响肝脂质代谢导致胰岛素敏感性和 T2DM 改善。这些数据综合起来强有力地暗示了 IL-6 在 II 型糖尿病病理中的作用, 以及中和 IL-6 能改善胰岛素敏感性。

额外的研究

监测了在存在或不存在人工程化抗 IL-6 抗体下, IL-6 对胰岛素刺激的 IRS1 磷酸化、与 p85/PI3K 的关系、胰岛素受体 (IR) 磷酸化、糖原合成以及涉及 HepG2 细胞中 SOCS3 和 STAT 信号传导的作用。额外的实验研究了 IL-6 对葡萄糖诱导的从胰岛分泌胰岛素的作用。迄今为止所公布的数据描述了 IL-6 对从大鼠胰岛分泌胰岛素的抑制和刺激作用。在葡萄糖存在或不存在下, 用 IL-6 和人工程化抗 IL-6 抗体 (AME-19a) 处理新鲜分离的大鼠胰岛 (来自 Liefscann)。测定了在不同的处理下分泌自胰岛的胰岛素水平。

C2C12. C2C12 细胞被用于研究胰岛素对骨骼肌的作用。进行实验以检查 IRS1 和 Glut4 表达, 胰岛素诱导的 IRS 1 磷酸化以及 IL-6 对脂连蛋白作用的影响。

优点:

通过本发明的 IL-6 抗体对 IL-6 活性的抑制可具有显著的治疗优点, 因为其能改善胰岛素敏感性和代谢控制而无现有药物的副作用。此外, 当前的治疗很少控制全身性炎症—被认为是 T2DM、相关的糖

尿病并发症的内因。象本发明 IL-6 抗体的治疗剂，除增加胰岛素敏感性之外，应该能抑制全身性炎症并阻止糖尿病并发症的发展。

患 T2DM 的患者数量不断增长，预计到 2025 年达到 3 亿。抗 IL-6 抗体可用作为单一疗法或与其他早已存在的 OAD，例如磺酰脲、双胍(如 Metformin)，噻唑烷二酮类、氯茴苯酸(如瑞格列奈)、 α -葡萄糖苷酶抑制剂(如阿卡波糖)联合使用。此外，可与胰岛素或其他治疗剂例如改善胰岛素敏感性和糖血控制以及避免与胰岛素处理相关的低血糖事件的治疗剂联合使用。还可预期的是除在 T2D 和代谢综合征患者中改善胰岛素敏感性和调节葡萄糖水平之外，抗 IL-6 治疗会对在这些患者中所经常观察到的 CV 改变具有有益的作用。参见

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

显然除之前的说明书和实施例所详尽描述的之外，亦可实施本发明。根据上述教导可以进行本发明诸多的修饰和改变，并因此落入所附加的权利要求的范围内。

表 1-轻链 CDRs

SEQ ID NO	CDR 名称 *	克隆	序列
SEQ ID NO:1	CDRL1	33	SASHSVSYMY

SEQ ID NO	CDR 名称 *	克隆	序列
SEQ ID NO:2	CDRL1	33	AGTGCCAGCCATAGTGTAAGTTACATGTAC
SEQ ID NO:3	CDRL1	34	SASISVSYMY
SEQ ID NO:4	CDRL1	34	AGTGCCAGCATTAGTGTAAGTTACATGTAC
SEQ ID NO:5	CDRL1	35	SARSSVSYMY
SEQ ID NO:6	CDRL1	35	AGTGCCCGGTCAAGTGTAAGTTACATGTAC
SEQ ID NO:7	CDRL1	36	SASYSVSYMY
SEQ ID NO:8	CDRL1	36	AGTGCCAGCTATAGTGTAAGTTACATGTAC
SEQ ID NO:9	CDRL1	37	SASSSVFYMY
SEQ ID NO:10	CDRL1	37	AGTGCCAGCTCAAGTGTAATTTTACATGTAC
SEQ ID NO:11	CDRL1	39	SGSSYVSYMY
SEQ ID NO:12	CDRL1	39	AGTGCCAGCTCATATGTAAGTTACATGTAC

SEQ ID NO	CDR 名称 *	克隆	序列
SEQ ID NO:13	CDRL1	40	SALSSVSYMY
SEQ ID NO:14	CDRL1	40	AGTGCCCTGTCAAGTGTAAGTTACATGTAC
SEQ ID NO:15	CDRL1	A9	SASSSVSYMY
SEQ ID NO:16	CDRL1	A9	AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTAC
SEQ ID NO:17	CDRL2	41	DFSNLAS
SEQ ID NO:18	CDRL2	41	GACTTTTCCAACCTGGCTTCT
SEQ ID NO:19	CDRL2	43	DLSNLAS
SEQ ID NO:20	CDRL2	43	GACCTGTCCAACCTGGCTTCT
SEQ ID NO:21	CDRL2	44	DMSNLAS
SEQ ID NO:22	CDRL2	44	GACATGTCCAACCTGGCTTCT
SEQ ID NO:23	CDRL2	46	DTSNLTS

SEQ ID NO	CDR 名称 *	克隆	序列
SEQ ID NO:24	CDRL2	46	GACACATCCAACCTGACGTCT
SEQ ID NO:25	CDRL2	48	DTSELAS
SEQ ID NO:26	CDRL2	48	GACACATCCGAGCTGGCTTCT
SEQ ID NO:27	CDRL2	A9	DTSNLAS
SEQ ID NO:28	CDRL2	A9	GACACATCCAACCTGGCTTCT
SEQ ID NO:29	CDRL3	49	MQWSGYPYT
SEQ ID NO:30	CDRL3	49	ATGCAGTGGAGTGGTTACCCATACACG
SEQ ID NO:31	CDRL3	50	CQWSGYPYT
SEQ ID NO:32	CDRL3	50	TGTCAGTGGAGTGGTTACCCATACACG
SEQ ID NO:33	CDRL3	52	SCWSGYPYT
SEQ ID NO:34	CDRL3	52	TCTGTGTGGAGTGGTTACCCATACACG

SEQ ID NO	CDR 名称 *	克隆	序列
SEQ ID NO:35	CDRL3	A9	SQWSGYPYT
SEQ ID NO:36	CDRL3	A9	TCTCAGTGGAGTGGTTACCCATACACG
SEQ ID NO:138	CDRL3	Alt.	QQWSGYPYT

*除 CDRH1 为 Kabat 和 Chothia 定义之和外, CDRs 为 Kabat 定义。

表 2-重链 CDRs

SEQ ID NO	CDR 名称 *	克隆	序列
SEQ ID NO:37	CDRH1	4	GFTFSSFALS
SEQ ID NO:38	CDRH1	4	GGATTCACCTTTAGTAGCTTTGCCCTTTCT
SEQ ID NO:39	CDRH1	5	GFTFSPFAMS
SEQ ID NO:40	CDRH1	5	GGATTCACCTTTAGTCCTTTGCCATGTCT
SEQ ID NO:41	CDRH1	6	GFQFSSFAMS
SEQ ID NO:42	CDRH1	6	GGATTCACCTTTAGTAGCTTTGCCATGTCT
SEQ ID NO:43	CDRH1	8	GFTTSSFAMS
SEQ ID NO:44	CDRH1	8	GGATTCACCACTAGTAGCTTTGCCATGTCT

SEQ ID NO	CDR 名称 *	克隆	序列
SEQ ID NO:45	CDRH1	Q + P	GFQFSPFAMS
SEQ ID NO:46	CDRH1	Q + P	GGATTCCAGTTTAGTCCTTTTGCCATGTCT
SEQ ID NO:47	CDRH1	A9	GFTFSSFAMS
SEQ ID NO:48	CDRH1	A9	GGATTCACCTTTAGTAGCTTTGCCATGTCT
SEQ ID NO:49	CDRH2	10	KASSGGSYTYYPDTVTVTG
SEQ ID NO:50	CDRH2	10	AAAGCGAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGA CACTGTGACGGGC
SEQ ID NO:51	CDRH2	11	KISSGGSYEYYPDTVTVTG
SEQ ID NO:52	CDRH2	11	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACGAGTACTATCCTGA CACTGTGACGGGC
SEQ ID NO:53	CDRH2	12	KISSGGSYYYYYPDTVTVTG
SEQ ID NO:54	CDRH2	12	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACTATTACTATCCTGA CACTGTGACGGGC
SEQ ID NO:55	CDRH2	14	KISSGGSWTYYYPDTVTVTG
SEQ ID NO:56	CDRH2	14	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTGGACCTACTATCCTGA CACTGTGACGGGC
SEQ ID NO:57	CDRH2	16	KISPGGSYTYYPDTVTVTG
SEQ ID NO:58	CDRH2	16	AAAATTAGTCCGGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGA CACTGTGACGGGC

SEQ ID NO	CDR 名称 *	克隆	序列
SEQ ID NO:59	CDRH2	P + W + S (18a, 19a)	KISPGGSWTYYSDTVTG
SEQ ID NO:60	CDRH2	P + W + S (18a, 19a)	AAAATTAGTCCGGGTGGGAGTTGGACCTACTATTCTGA CACTGTGACGGGC
SEQ ID NO:61	CDRH2	A9	KISSGGSYTYYPDTV TG
SEQ ID NO:62	CDRH2	A9	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGA CACTGTGACGGGC
SEQ ID NO:113	CDRH2	Alt.	EISSGGSYTYYPDTV TG
SEQ ID NO:63	CDRH2	17	KISSGGSYTYFPDTV TG
SEQ ID NO:64	CDRH2	17	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTTTCCTGA CACTGTGACGGGC
SEQ ID NO:65	CDRH2	19	KISSGGSYTYYPDTVAG
SEQ ID NO:66	CDRH2	19	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGA CACTGTGGCTGGC
SEQ ID NO:67	CDRH2	20	KISSGGSYTYYYDDTVTG
SEQ ID NO:68	CDRH2	20	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATGATGA CACTGTGACGGGC
SEQ ID NO:69	CDRH2	21	KISSGGSYTYYSDTV TG

SEQ ID NO	CDR 名称 *	克隆	序列
SEQ ID NO:70	CDRH2	21	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATTCTGA CACTGTGACGGGC
SEQ ID NO:71	CDRH2	22	KISSGGSYTYYPDTVTP
SEQ ID NO:72	CDRH2	22	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGA CACTGTGACGCCG
SEQ ID NO:73	CDRH2	23	KISSGGSYTYYPDTDG
SEQ ID NO:74	CDRH2	23	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGA CACTGATACGGGC
SEQ ID NO:75	CDRH2	P + S (20b, 23a)	KISPGGSYTYYSDTVIG
SEQ ID NO:76	CDRH2	P + S (20b, 23a)	AAAATTAGTCCGGGTGGGAGTTACACCTACTATTCTGA CACTGTGACGGGC
SEQ ID NO:77	CDRH2	P + W + D (22a)	KISPGGSWTYYDDTVIG
SEQ ID NO:78	CDRH2	P + W + D (22a)	AAAATTAGTCCGGGTGGGAGTTGGACCTACTATGATGA CACTGTGACGGGC
SEQ ID NO:79	CDRH3	25	QLWGSYALDY
SEQ ID NO:80	CDRH3	25	CAGTTATGGGGGTCGTATGCTCTTGACTAC
SEQ ID NO:81	CDRH3	26	QLWGYALDT

SEQ ID NO	CDR 名称 *	克隆	序列
SEQ ID NO:82	CDRH3	26	CAGTTATGGGGGTACTATGCTCTTGACACG
SEQ ID NO:83	CDRH3	29	QLWGTYYALDY
SEQ ID NO:84	CDRH3	29	CAGTTATGGGGGACTTATGCTCTTGACTAC
SEQ ID NO:85	CDRH3	30	QLWGNYYALDY
SEQ ID NO:86	CDRH3	30	CAGTTATGGGGGAATTATGCTCTTGACTAC
SEQ ID NO:87	CDRH3	31	QLWGYYALDF
SEQ ID NO:88	CDRH3	31	CAGTTATGGGGGTACTATGCTCTTGACTTT
SEQ ID NO:89	CDRH3	32	QLWGYYALDI
SEQ ID NO:90	CDRH3	32	CAGTTATGGGGGTACTATGCTCTTGACATT
SEQ ID NO:91	CDRH3	A9	QLWGYYALDY
SEQ ID NO:92	CDRH3	A9	CAGTTATGGGGGTACTATGCTCTTGACTAC
SEQ ID NO:114	CDRH3	Alt.	GLWGYYALDY

*除 CDRH1 为 Kabat 和 Chothia 定义之和外，CDRs 为 Kabat 定义。

表 3-来自个体 CDR 文库的突变

克隆	CDRH1		克隆	CDRL1
4	M34L		33	S27H
5	S31P		34	S27I
6	T28Q		35	S26R
8	F29T		36	S27Y
			37	S30F
克隆	CDRH2		38	S27I
10	I51A		39	A25G,S28Y
11	T57E		40	S26L
12	T57Y			
14	Y56W		克隆	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			

			克隆	CDRL3
克隆	CDRH3		49	Q89M
25	Y99S		50	Q89C
26	Y102T		52	Q90C
27	Y99S			
29	Y99T			
30	Y99N			
31	Y102F			
32	Y102I			

表 4-包括于组合文库中的突变

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

表 5A
阳性文库克隆

CDR-->	轻链			重链					
	L1	L2	L3	H1	H2			H3	
WT--> CNT0328	S	T	Q	T	S	E	S	Y	P V
Clone	27	51	89	28	31	50	52a	56	60 63
AME-A9			S			K		Q	
AME-18			S			K	P	Q	
AME-18a		F	M	Q	P	K	P	W	S
AME-19a	I	M	M		P	K	P	W	S
AME-20b	I	M	M	Q		K	P	S	
AME-22a	Y	F	M	Q	P	K	P	W	D
AME-23a	Y	M	M	Q		K	P	S	

表 5B-人工程化抗 IL-6 抗体克隆和相应的 CDRs

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

表 6-EC₅₀ 值

克隆	EC ₅₀ 值
CNTO328	2.7×10^{-11} M
AME-19a	2.7×10^{-12} M (10- 倍改善)

表 7-抗 IL-6 IgG 的动力学常数

克隆	抗体浓度 (pM)	K_D (pM)	改善比率 (与嵌合ab 相比)	k_{on} (M^{-1} sec^{-1})	改善比率	$k_{off} (sec^{-1})$ (计算的)	改善比率
嵌合 抗体	5	3	1	4.4×10^6	1	1.3×10^{-5}	1
AME-16	1	0.83	3.6	1×10^6	0.22	8.3×10^{-7}	15.7
AME-18a	0.5	0.12	25	2×10^7	4.4	2.4×10^{-6}	5.4
AME-19a	0.5	0.037	81.1	5.5×10^6	1.2	2×10^{-7}	65
AME-20b	1	0.78	3.8	4.7×10^6	1	3.7×10^{-6}	3.5
AME-22a	1	0.18	16.7	6×10^6	1.3	1.1×10^{-6}	11.8
AME-23a	1	0.006	500	7.4×10^6	1.6	4.4×10^{-8}	295

表 8-人工程和嵌合抗体的交叉物种反应性

	物种	抑制(嵌合和人工程的)
交叉反应	人	+
	绒猴	+
	恒河猴	+
	黑猩猩	+
	猕猴	+
	狒狒	+
	短尾猴	+
	绢毛猴	+
未知的	兔	N/D
无反应	狗	-
	小鼠	-
	大鼠	-
	豚鼠	-
	Yucatan 微型猪	-

人工程和嵌合抗体的交叉物种反应性。人工程和嵌合抗体能中和为来自人、狨猴(Marmoset)、恒河猴(Cynomolgous)、黑猩猩(Chimp)、猕猴(Rhesus)、狒狒(Baboon)、短尾猴(Pig-Tail)和绢毛猴(Cotton Top)的 PBMCs 的条件上清液所刺激的 7TD1 细胞增殖。在中和测定中“+”阳性；在中和测定中“-”阴性；N/D，未测定。

表 9-抗 IL-6 mAb 处理对 NZB/W F1 小鼠中肾病理学的影响

*重度-血管周围混合性淋巴样细胞增生、肾小球系膜细胞过多、蛋白沉积、肾小球基底膜免疫复合物沉积

中度-中度血管周围混合性淋巴样细胞增生、中度肾小球系膜细胞过多、肾小球基底膜免疫复合物沉积、无蛋白沉积

轻度-轻度肾小球系膜细胞过多、轻度肾小球基底膜免疫复合物沉积、无血管周围混合性淋巴样细胞增生、无蛋白沉积

处理组	重度 *	中度 *	轻度 *
盐水 (n=10)	60% 或 6/10	20% 或 2/10	20% 或 2/10
大鼠IgG (n=10)	70% 或 7/10	30% 或 3/10	0 或 0/10
R&D 抗小鼠 IL-6 (n=10)	10% 或 1/10	30% 或 3/10	60% 或 6/10

表 10-克隆的可变区序列

SEQ ID NO	克隆	重(H)或轻(L)链V区	序列
93	A9	L 链 AA	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVS YMWYQQKPGQAPRLLIYDTENLASGIPAR FSGSGSGTDFTLTISGLEPEDFAVYYCSQW SGYPYTFGGGTKVEIK
94		L 链 核苷酸	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG3GA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAA GTTACATGTACT GGTACCAACAGAAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGACACA TCCAACTGGCTTCTGGCATCCAGCCAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGG GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAG TTTATTACTGTTCTCAGTGGAGTGGTTACCCATACACGTTCCGGCGGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA
95		H 链 AA	EVQLVDSGGGLVQPQGSRLRLSCAASGFTFS SPFAMSWVRQAPGKGLEWVAKISGGGFTYY PDVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARQLWGYYALDYWGQGITTVTVSS
96		H 链 核苷酸	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCTTTGCCA TGTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGCCAAA ATTAGTAGTGTTGGGAGTTACACCTACTATCCTGACACTGTGACGGGCCG ATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAATGA ACAGCCTGAGAGGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACAGTTA TGGGGGTACTATGCTCTTGACTACTGGGGCCAAAGGACCACGGTCACCGT CTCCTCA
97	19A	L 链 AA	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASISVS YMWYQQKPGQAPRLLIYDMSNLASGIPAR FSGSGSGTDFTLTISGLEPEDFAVYYCMQW SGYPYTFGGGTKVEIK

98		L 链 核苷酸	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGCCAGCATTAGTGTAAAGTTACATGTACT GGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGACATG TCCAACCTGGCTTCTGGCATCCAGCCAGGTTCACTGGCACTGGGTCTGG GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAG TTTATTACTGTATGCACTGGAGTGGTTACCCATACACGTTCCGGCGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA
99		H 链 AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS PFAMSWVRQAPGKLEWVAKISPGGSWYY SDTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARQLWGYYALDINGQGTTVTVSS
100		H 链 核苷酸	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTCCTTTTGCCA TGTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAA ATTAGTCCGGGTGGGAGTTGGACCTACTATTCTGACACTGTGACGGGCCG ATTCAACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACAGTTA TGGGGGTACTATGCTCTTGACATTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGT CTCCTCA
101	23A	L 链 AA	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASYSVS YMWYQQKPGQAPRLLIYDMENLASGIPAR FSGSGSGTDFTLTISGLEPEDFAVYYCMQW SGYPYTPGGGTKVEIK
102		L 链 核苷酸	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGCCAGCTATAGTGTAAAGTTACATGTACT GGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGACATG TCCAACCTGGCTTCTGGCATCCAGCCAGGTTCACTGGCACTGGGTCTGG GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATTTTGCAG TTTATTACTGTATGCACTGGAGTGGTTACCCATACACGTTCCGGCGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA
103		H 链 AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPQS SFAMSWVRQAPGKLEWVAKISPGGSYTTY SDTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARQLWGYYALDFWGGGTTVTVSS

104		H 链 核苷酸	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTGGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCAATTAGTAGCTTTGCCA TGTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCAAA ATTAGTCCGGGTGGGAGTTACACCTACTATTCTGACACTGTGACGGGCCG ATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTGCAAATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGACAGTTA TGGGGGTACTATGCTCTTGACTTTTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGT CTCCTCA
116	AMB-16	L 链 AA	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVS YMYWYQQKPGQAPRLLIYDTNMLASGIPAR FSGSGSDTDFLTITISLEPEDFAVYYCSQW SGYPYTFGGGTKVEIK
117		L 链 核苷酸	ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGA TACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCTGTCTTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCTCCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAAAT TACATGTACTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT CTATGACACATCCAACCTGGCTTCTGGCATCCAGCCAGGTTCAAGTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAA GATTTGCAAGTTTATTACTGTTCTCAGTGGAGTGGTTACCCATACAGTT CGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAA
118		H 链 AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SFAMSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSYTTY PDTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAD TAVYYCARQLWGYYALDYWGQOTTVTVSS
119		H 链 核苷酸	ATGGAGTTTGGCCTGAGCTGGGTTTTCCTTGTGCTATTTAGAAGGTGT CCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAOCCTCTGGATTACCTTTAGTAGC TTTGCCATGTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGT GGCCAAAATTAGTCCCGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGACACTGTGA CGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAG ACAGTTATGGGGTACTATGCTCTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGG TCACCGTCTCCTCA
120	AMB-18a	L 链 AA	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVS YMYWYQQKPGQAPRLLIYDFENLASGIPAR FSGSGSDTDFLTITISLEPEDFAVYYCMQW SGYPYTFGGGTKVEIK

121		L 链 核苷酸	ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCTCTGCTACTCTGGCTCCCAGA TACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCACTGCCAGCTCAAAGTGAAGT TACATGTACTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT CTATGACTTCTCCAACCTGGCTTCTGGCATCCAGCCAGGTTCACTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAA GATTTTGCACTTTATTACTGTATGCACTGGAGTGGTTACCCATACAGTT CGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
122		H 链 AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGQFS PFAMSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWYY SDTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAD TAVYYCARQLWGYYALDIWGQGTFTVSS
123		H 链 核苷酸	ATGGAGTTTGCCCTGAGCTGGGTTTCTCTTGTGCTATTTAGAAAGTGT CCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCAGTTTATGCC TTTGCCATGTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGT GGCCAAAATTAGTCCCGTGGGAGTTGGACCTACTATAGCGACACTGTGA CGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAG ACAGTTATGGGGTACTATGCTCTTGACATTGGGGCCAAGGGACCACGG TCACCCTCTCCTCA
124	AME-20b	L 链 AA	EIVLTQSPATLSLSPGSRATLSCSASISVS YMYWYQKPGQAPRLLIYDMSNLASGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCMQW SGYPYTFGGGTKVEIK
125		L 链 核苷酸	ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCTCTGCTACTCTGGCTCCCAGA TACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCACTGCCAGCATTAGTGAAGT TACATGTACTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT CTATGACATGTCCAACCTGGCTTCTGGCATCCAGCCAGGTTCACTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAA GATTTTGCACTTTATTACTGTATGCACTGGAGTGGTTACCCATACAGTT CGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
126		H 链 AA	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGQFS SFAMSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSYTTY SDTVTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAD TAVYYCARQLWGYYALDIWGQGTFTVSS

127		H 链 核苷酸	ATGGAGTTTGGCCTGAGCTGGGTTTTCCTTGTGCTATTTTAGAAGGTGT CCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCAGTTTAGTAGC TTTGCCATGTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGT GGCCAAAATTAGTCCCGGTGGGAGTTACACCTACTATAGCGACACTGTGA CGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAG ACAGTTATGGGGTACTATGCTCTTGACATTTGGGGCCAAGGGACCACGG TCACCGTCTCCTCA
128	AME-22a	L 链 AA	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHSYSVS YMYWYQQKPGQAPRLLIYDFENLASGIPAR FSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCMQW SGYFYTFGGOTKVEIK
129		L 链 核苷酸	ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTCTTCCTCCTGCTACTCTGGCTCCCAGA TACCACCGGAGAAATTGTGTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGCCAGCTACAGTGTAACT TACATGTACTGGTACCAACAGAACTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCAT CTATGACTTCTCCAACCTGGCTTCTGGCATCCAGCCAGGTTCACTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCTAGAGCCTGAA GATTTGCACTTTATTACTGTATGCAGTGGAGTGGTTACCCATACACGTT CGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
130		H 链 AA	EVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCAASGQFES PFAMSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYY FDYDTGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAD TAVYYCARQLWGYALDFWGQGTFTVTVSS
131		H 链 核苷酸	ATGGAGTTTGGCCTGAGCTGGGTTTTCCTTGTGCTATTTTAGAAGGTGT CCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTGGTCCAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCAGTTTAGTCCC TTTGCCATGTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGGGT GGCCAAAATTAGTCCCGGTGGGAGTTGGACCTACTATCCTGACACTGACA CGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACTGTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAG ACAGTTATGGGGTACTATGCTCTTGACTTCTGGGGCCAAGGGACCACGG TCACCGTCTCCTCA

表 11-具有标记的交错分布的 CDR 序列的人轻链构架区 L6 的氨基酸序列

(FRL1 - SEQ ID NO:105) CDRL1 (FRL2 - SEQ ID NO:106) CDRL2
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCHSYSVS
YMYWYQQKPGQAPRLLIYDFENLASGIPAR
FSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCMQW
SGYFYTFGGOTKVEIK

(FRL3 - SEQ ID NO:107) CDRL3 (FRL4 - SEQ ID NO:108)
GIPARFSGSGSGTDFTLTISLSLEPEDFAVYYCMQW
SGYFYTFGGOTKVEIK

表 12-具有标记的交错分布的 CDR 序列的人重链构架区 VH3-7 的氨基酸序列

(FRH1 - SEQ ID NO:109) CDRH1 (FRH2 - SEQ ID NO:110)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASXXXXXXXXXXWVRQAPGKGLEWVA

CDRH2 (FRH3 - SEQ ID NO:111)
XXXXXXXXXXXXXXXXXXRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

CDRH3 (FRH4 - SEQ ID NO:112)
XXXXXXXXXXWGQTTVTVSS

表 13-CDR 序列

SEQ ID NO:	CDR	AA 序列 *
132	CDRL1	<u>SX₁X₂X₃X₄</u> VX ₅ YMY
133	CDRL2	D <u>X₆SX₇LX₈</u> S
134	CDRL3	<u>X₉X₁₀</u> WSGYPYT
135	CDRH1	GFX ₁₁ <u>X₁₂SX₁₃FAX₁₄</u> S
136	CDRH2	K <u>X₁₅SX₁₆</u> GG <u>SX₁₇X₁₈</u> Y <u>X₁₉X₂₀</u> DT <u>X₂₁X₂₂X₂₃</u>
137	CDRH3	QLWG <u>X₂₄</u> YALD <u>X₂₅</u>

*X表示任何具有示于表 1 和 2 和表 3、4、5A 和 8 的 SEQ ID NOS: 1-92 中所披露的序列中的例证的、非限制的氨基酸取代的适合的氨基酸。此外，X 可具有下列值：

X₁ = A 或 G

X₂ = S 或 R

X₃ = H、I、S 或 Y

X₄ = S 或 Y

X₅ = S 或 F

$X_6 = \text{F、L、M 或 T}$

$X_7 = \text{N 或 E}$

$X_8 = \text{A 或 T}$

$X_9 = \text{M、C 或 S}$

$X_{10} = \text{Q 或 C}$

$X_{11} = \text{T 或 Q}$

$X_{12} = \text{F、S 或 T}$

$X_{13} = \text{S 或 P}$

$X_{14} = \text{L 或 M}$

$X_{15} = \text{A 或 I}$

$X_{16} = \text{S 或 P}$

$X_{17} = \text{Y 或 W}$

$X_{18} = \text{T、E 或 Y}$

$X_{19} = \text{Y 或 F}$

$X_{20} = \text{P、S、D 或 F}$

$X_{21} = \text{V 或 D}$

$X_{22} = \text{T 或 A}$

$X_{23} = \text{G 或 P}$

$X_{24} = \text{S、Y、T 或 N}$

$X_{25} = \text{Y、T、F 或 I}$

SEO ID NO: I15-IL-6 蛋白的氨基酸序列

MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQ
IRYILDGISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCQSGFNEETCL
VKIITGLLEFEVYLEYLQNRFESEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITTPD
PTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM

<110> Centocor, Inc.
Applied Molecular Evolution, Inc.

<120> 抗-IL-6抗体、组合物、方法及应用

<130> CEN5094 PCT

<140> PCT/US2006/016457

<141> 2006-04-28

<150> 60/676,498

<151> 2005-04-29

<150> 60/677,319

<151> 2005-05-03

<160> 138

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

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

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> 智人

<400> 2

agtgccagcc atagtgtaag ttacatgtac

30

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

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

<210> 4

<211> 30

<212> DNA

<213> 智人

<400> 4

agtgccagca ttagtgtaag ttacatgtac

30

<210> 5

<211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 5
 Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
 1 5 10

<210> 6
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 6
 agtgcccggt caagtgtgtaag ttacatgtac 30

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 7
 Ser Ala Ser Tyr Ser Val Ser Tyr Met Tyr
 1 5 10

<210> 8
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 8
 agtgccagct atagtgtgtaag ttacatgtac 30

<210> 9
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 9
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Phe Tyr Met Tyr
 1 5 10

<210> 10
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 10
 agtgccagct caagtgtatt ttacatgtac 30

<210> 11
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 11
 Ser Gly Ser Ser Tyr Val Ser Tyr Met Tyr
 1 5 10

<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> 智人

<400> 12
agtggcagct catatgtaag ttacatgtac 30

<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13
Ser Ala Leu Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 14
<211> 30
<212> DNA
<213> 智人

<400> 14
agtgccctgt caagtgtaag ttacatgtac 30

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 16
<211> 30
<212> DNA
<213> 智人

<400> 16
agtgccagct caagtgtaag ttacatgtac 30

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17
Asp Phe Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 18
<211> 21
<212> DNA
<213> 智人

<400> 18 gacttttcca acctggettc t	21
<210> 19 <211> 7 <212> PRT <213> 智人	
<400> 19 Asp Leu Ser Asn Leu Ala Ser 1 5	
<210> 20 <211> 21 <212> DNA <213> 智人	
<400> 20 gacctgtcca acctggettc t	21
<210> 21 <211> 7 <212> PRT <213> 智人	
<400> 21 Asp Met Ser Asn Leu Ala Ser 1 5	
<210> 22 <211> 21 <212> DNA <213> 智人	
<400> 22 gacatgtcca acctggettc t	21
<210> 23 <211> 7 <212> PRT <213> 智人	
<400> 23 Asp Thr Ser Asn Leu Thr Ser 1 5	
<210> 24 <211> 21 <212> DNA <213> 智人	
<400> 24 gacacatcca acctgacgtc t	21
<210> 25 <211> 7 <212> PRT	

<213> 智人	
<400> 25	
Asp Thr Ser Glu Leu Ala Ser	
1 5	
<210> 26	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 26	
gacacatccg agctggcttc t	21
<210> 27	
<211> 7	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 27	
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser	
1 5	
<210> 28	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 28	
gacacatcca acctggcttc t	21
<210> 29	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 29	
Met Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr	
1 5	
<210> 30	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 30	
atgcagtgga gtggttacct atacacg	27
<210> 31	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 31	
Cys Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr	
1 5	

<210> 32	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 32	
tgtcagtgga gtggttacct atacacg	27
<210> 33	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 33	
Ser Cys Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr	
1 5	
<210> 34	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 34	
tctgtgtgga gtggttacct atacacg	27
<210> 35	
<211> 9	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 35	
Ser Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr	
1 5	
<210> 36	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 36	
tctcagtgga gtggttacct atacacg	27
<210> 37	
<211> 10	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 37	
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala Leu Ser	
1 5 10	
<210> 38	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 智人	
<400> 38	
ggattcacct ttagtagctt tgccttttct	30

<210> 39
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 39
Gly Phe Thr Phe Ser Pro Phe Ala Met Ser
1 5 10

<210> 40
<211> 30
<212> DNA
<213> 智人

<400> 40
ggattcacct ttagtccttt tgccatgtct 30

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 41
Gly Phe Gln Phe Ser Ser Phe Ala Met Ser
1 5 10

<210> 42
<211> 30
<212> DNA
<213> 智人

<400> 42
ggattccagt ttagtagctt tgccatgtct 30

<210> 43
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43
Gly Phe Thr Thr Ser Ser Phe Ala Met Ser
1 5 10

<210> 44
<211> 30
<212> DNA
<213> 智人

<400> 44
ggattcacca ctagtagctt tgccatgtct 30

<210> 45
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 45

Gly Phe Gln Phe Ser Pro Phe Ala Met Ser
1 5 10

<210> 46
<211> 30
<212> DNA
<213> 智人

<400> 46
ggattccagt ttagtccttt tgccatgtct 30

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 47
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala Met Ser
1 5 10

<210> 48
<211> 30
<212> DNA
<213> 智人

<400> 48
ggattcacct ttagtagctt tgccatgtct 30

<210> 49
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49
Lys Ala Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
1 5 10 15
Gly

<210> 50
<211> 51
<212> DNA
<213> 智人

<400> 50
aaagcgagta gtggtgggag ttacacctac tatcctgaca ctgtgacggg c 51

<210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51
Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Glu Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
1 5 10 15
Gly

<210> 52
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 52
 aaaattagta gtggtgggag ttacgagtac taccctgaca ctgtgacggg c 51

<210> 53
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 53
 Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly

<210> 54
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 54
 aaaattagta gtggtgggag ttactattac taccctgaca ctgtgacggg c 51

<210> 55
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 55
 Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly

<210> 56
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 56
 aaaattagta gtggtgggag ttggacctac taccctgaca ctgtgacggg c 51

<210> 57
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 57
 Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly

<210> 58
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 58
 aaaattagtc cgggtgggag ttacacctac tatcctgaca ctgtgaoggg c 51

<210> 59
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 59
 Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly

<210> 60
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 60
 aaaattagtc cgggtgggag ttggacctac tattctgaca ctgtgaoggg c 51

<210> 61
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 61
 Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly

<210> 62
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 62
 aaaattagta gtggtgggag ttacacctac tatcctgaca ctgtgacggg c 51

<210> 63
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 63
 Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Phe Pro Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly

<210> 64

<211> 51
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 64
 aaaattagta gtggtgggag ttacacctac tttcctgaca ctgtgacggg c 51

<210> 65
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 65
 Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Ala
 1 5 10 15
 Gly

<210> 66
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 66
 aaaattagta gtggtgggag ttacacctac tctcctgaca ctgtggctgg c 51

<210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 67
 Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asp Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly

<210> 68
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 68
 aaaattagta gtggtgggag ttacacctac tatgatgaca ctgtgacggg c 51

<210> 69
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 69
 Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly

<210> 70
 <211> 51

<212> DNA

<213> 智人

<400> 70

aaaattagta gtggtgggag ttacacctac tattctgaca ctgtgacggg c 51

<210> 71

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 71

Lys	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Val	Thr
1				5				10						15	
Pro															

<210> 72

<211> 51

<212> DNA

<213> 智人

<400> 72

aaaattagta gtggtgggag ttacacctac tattctgaca ctgtgacggc g 51

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 73

Lys	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Thr	Asp	Thr
1				5				10						15	
Gly															

<210> 74

<211> 51

<212> DNA

<213> 智人

<400> 74

aaaattagta gtggtgggag ttacacctac tattctgaca ctgatacggg c 51

<210> 75

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 75

Lys	Ile	Ser	Pro	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Asp	Thr	Val	Thr
1				5				10						15	
Gly															

<210> 76

<211> 51

<212> DNA

<213> 智人

<400> 76

aaaattagtc cgggtgggag ttacacctac tattctgaca ctgtgacggg c 51

<210> 77

<211> 17

<212> PRT

<213> 智人

<400> 77

Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Asp Asp Thr Val Thr

1 5 10 15

Gly

<210> 78

<211> 51

<212> DNA

<213> 智人

<400> 78

aaaattagtc cgggtgggag ttggacctac tatgatgaca ctgtgacggg c 51

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 79

Gln Leu Trp Gly Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 80

<211> 30

<212> DNA

<213> 智人

<400> 80

cagttatggg ggtcgtatgc tcttgactac 30

<210> 81

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 81

Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Thr

1 5 10

<210> 82

<211> 30

<212> DNA

<213> 智人

<400> 82

cagttatggg ggtactatgc tcttgacacg 30

<210> 83
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 83
 Gln Leu Trp Gly Thr Tyr Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 84
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 84
 cagttatggg ggacttatgc tottgactac 30

<210> 85
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 85
 Gln Leu Trp Gly Asn Tyr Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 86
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 86
 cagttatggg ggaattatgc tottgactac 30

<210> 87
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 87
 Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Phe
 1 5 10

<210> 88
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 88
 cagttatggg ggtactatgc tottgacttt 30

<210> 89
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 89

Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Ile
1 5 10

<210> 90
<211> 30
<212> DNA
<213> 智人

<400> 90
cagttatggg ggtactatgc tcttgacatt 30

<210> 91
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 91
Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 92
<211> 30
<212> DNA
<213> 智人

<400> 92
cagttatggg ggtactatgc tcttgactac 30

<210> 93
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人

<400> 93
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
85 90 95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 94
<211> 318
<212> DNA
<213> 智人

<400> 94

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagecacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgtact ggtaccaaca gaaacctggc 120
caggctccca ggctcctcat ctatgacaca tccaacctgg ctcttgccat cccagccagg 180
ttcagtggca gtgggtcttg gacagacttc actctacca tcagcagcct agagcctgaa 240
gattttgcag tttattactg ttctcagtgg agtggttacc catacacgtt cggcggaggg 300
accaaggtgg agatcaaa                                     318

```

<210> 95

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<400> 95

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20           25           30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35           40           45
Ala Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50           55           60
Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85           90           95
Ala Arg Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100           105           110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 96

<211> 357

<212> DNA

<213> 智人

<400> 96

```

gaggtgacgc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agctttgcc tgtcttgggt ccgccaggct 120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtggccaaa attagtagtg gtgggagtta cacctactat 180
cctgacactg tgacgggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagacagtta 300
tgggggtact atgctcttga ctactggggc caagggacca cggtcacctg ctctctca 357

```

<210> 97

<211> 106

<212> PRT

<213> 智人

<400> 97

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ile Ser Val Ser Tyr Met
 20           25           30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35           40           45
Asp Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50           55           60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65           70           75           80

```


Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 98
 <211> 318
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 98
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gtgccagcat tagtgtaagt tacatgtact ggtaccaaca gaaacctggc 120
 caggctoccca ggctcctcat ctatgacatg tccaacctgg cttctggcat cccagccagg 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctacca tcagcagcct agagcctgaa 240
 gattttgcag tttattactg tatgcagtgg agtggttacc catacacgtt cggcggaggg 300
 accaaggtgg agatcaaa 318

<210> 99
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 99
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Pro Phe
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 100
 <211> 357
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 100
 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt cdttttgcca tgtcttgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaaa attagtccgg gtggggagttg gacctactat 180
 tctgacactg tgacgggccc attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagacagtta 300
 tgggggtact atgctcttga catttggggc caagggacca cggtcaccgt ctcctca 357

<210> 101
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 101

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Tyr Ser Val Ser Tyr Met
          20           25           30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
          35           40           45
Asp Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
          65           70           75           80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
          85           90           95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100           105

```

<210> 102

<211> 318

<212> DNA

<213> 智人

<400> 102

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
ctctcctgca gtgccageta tagtgtaagt tacatgtact ggtaccaaca gaaacctggc 120
caggctccca ggctcctcat ctatgacatg tccaacctgg cttctggcat cccagccagg 180
ttcagtggca gtgggtcttg gacagacttc actctcacca tcagcagcct agagcctgaa 240
gattttgcag tttattactg tatgcagtgg agtggttacc catacacgtt cggcggaggg 300
accaaggtgg agatcaaa                                     318

```

<210> 103

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<400> 103

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Gln Phe Ser Ser Phe
          20           25           30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45
Ala Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
          50           55           60
Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
          65           70           75           80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95
Ala Arg Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
          100           105           110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 104

<211> 357

<212> DNA

<213> 智人

<400> 104

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctgggggggtc cctgagaçtc 60
 tçctgtgeag cctctggatt ccagtttagt agçtttgcca tçtçttgggt ccgccaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtggccaaa attagtcçgg gtgggagtta cacctactat 180
 tctgacactg tgacggggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaata ga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagacagtta 300
 tgggggtact atgctçttga cttttggggc caagggacca cggtcaccgt ctçtca 357

<210> 105

<211> 23

<212> PRT

<213> 智人

<400> 105

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys

20

<210> 106

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 106

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr

1

5

10

15

<210> 107

<211> 32

<212> PRT

<213> 智人

<400> 107

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

1

5

10

15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys

20

25

30

<210> 108

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 108

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1

5

10

<210> 109

<211> 25

<212> PRT

<213> 智人

<400> 109

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20

25

<210> 110
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 110
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

<210> 111
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 111
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Glu
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 112
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 112
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 113
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 113
 Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly

<210> 114
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 114
 Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 115
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 115

```

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu
 1          5          10          15
Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro
 20          25          30
Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr
 35          40          45
Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile
 50          55          60
Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser
 65          70          75          80
Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala
 85          90          95
Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu
100          105          110
Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr
115          120          125
Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln
130          135          140
Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn
145          150          155          160
Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu
165          170          175
Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His
180          185          190
Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala
195          200          205
Leu Arg Gln Met
210

```

<210> 116

<211> 106

<212> PRT

<213> 智人

<400> 116

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1          5          10          15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20          25          30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35          40          45
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50          55          60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65          70          75          80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 85          90          95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100          105

```

<210> 117

<211> 378

<212> DNA

<213> 智人

<400> 117

```

atggaagccc cagcgcagct tctcttctctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

```

```

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctectgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgtact ggtaccaaca gaaacctggc 180
caggtcccca ggctcctcat ctatgacaca tccaacctgg cttctggcat ccagccagg 240
ttcagtgcca gtgggtctgg gacagacttc actctacca tcagcagcct agagcctgaa 300
gattttgcag tttattactg ttctcagtgg agtggttacc catacacgtt cggcggaggg 360
accaaggtgg agatcaaa 378

```

<210> 118

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<400> 118

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
 20          25          30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35          40          45
Ala Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50          55          60

Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85          90          95
Ala Arg Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100          105          110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115

```

<210> 119

<211> 414

<212> DNA

<213> 智人

<400> 119

```

atggagtttg gcctgagctg ggttttcctt gttgctatatt tagaagggtgt ccagtgtgag 60
gtgcagctgg tggagctctgg gggaggcttg gtccagcctg gggggtcctt gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac ctttagtagc tttgccatgt cttgggtccg ccagggtcca 180
gggaaggggc tggagtgggt ggccaaaatt agtcccgggtg ggagttacac ctactatcct 240
gacactgtga cgggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc actgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag acagttatgg 360
gggtactatg ctcttgacta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 414

```

<210> 120

<211> 106

<212> PRT

<213> 智人

<400> 120

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1          5          10          15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20          25          30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35          40          45
Asp Phe Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50          55          60

```

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 121
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 121
 atggaagccc cagcgcagct tctcttcctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgtact ggtaccaaca gaaacctggc 180
 caggctccca ggctcctcat ctatgacttc tccaacctgg cttctggcat cccagccagg 240
 ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctacca tcagcagcct agagcctgaa 300
 gattttgcag tttattactg tatgcagtgg agtggttacc catacacgtt cggcggaggg 360
 accaaggtgg agatcaaa 378

<210> 122
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 122
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Gln Phe Ser Pro Phe
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 123
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 123
 atggagtttg gcctgagctg gggttttcctt gttgctattt tagaaggtgt ccagtgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtccagcctg ggggggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcca gtttagtccc ttggccatgt cttgggtccg ccaggctcca 180
 gggaaggggc tggagtgggt ggccaaaatt agtcccgtg ggagttggac ctactatagc 240
 gacactgtga cgggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc actgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag acagttatgg 360
 gggctactatg ctcttgacat ttggggccaa gggaccacg tcaccgtctc ctca 414

<210> 124

<211> 106

<212> PRT

<213> 智人

<400> 124

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1           5           10           15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ile Ser Val Ser Tyr Met
          20           25           30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
          35           40           45
Asp Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
          50           55           60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65           70           75           80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
          85           90           95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
          100           105

```

<210> 125

<211> 378

<212> DNA

<213> 智人

<400> 125

```

atggaagccc cagcgcagct tctcttctct ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
gaaatttgtg tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gtgccagcat tagtgtaagt tacatgtact ggtaccaaca gaaacctggc 180
caggctccca ggctcctcat ctatgacatg tccaacctgg cttctggcat ccagccagg 240
ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctacca tcagcagcct agagcctgaa 300
gattttgcag tttattactg tatgcagtgg agtgggtacc catacacgtt cggcggaggg 360
accaaggtgg agatcaaa                               378

```

<210> 126

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<400> 126

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Gln Phe Ser Ser Phe
          20           25           30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45
Ala Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
          50           55           60
Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85           90           95
Ala Arg Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly
          100           105           110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 127

<211> 414

<212> DNA

<213> 智人

<400> 127

```

atggaggtttg gcctgagctg ggttttccct gttgctatatt tagaagggtgt ccagtgtgag 60
gtgcagctgg tggagctctg gggaggcttg gtccagcctg gggggtcct gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcca gtttagtagc tttgccatgt ctgggtccg ccaggctcca 180
gggaaggggc tggagtgggt ggccaaaatt agtcccgggt ggagttacac ctactatagc 240
gacactgtga cgggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc actgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag acagttatgg 360
gggtactatg ctcttgacat ttggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 414

```

<210> 128

<211> 106

<212> PRT

<213> 智人

<400> 128

```

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1             5             10             15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Tyr Ser Val Ser Tyr Met
      20             25             30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
      35             40             45
Asp Phe Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
      50             55             60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
      65             70             75             80
Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
      85             90             95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100             105

```

<210> 129

<211> 378

<212> DNA

<213> 智人

<400> 129

```

atggaagccc cagcgcagct tctcttccct ctgctactct ggctcccaga taccactgga 60
gaaatttgtt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
ctctcctgca gtgccagcta cagtgttaagt tacatgtact ggtaccaaca gaaacctggc 180
caggctccca ggctcctcat ctatgaattc tccaacctgg cttctggcat ccagctcagg 240
ttcagtgcca gtgggtcttg gacagacttc actctcacca tcagcagcct agagcctgaa 300
gattttgcag ttattactg tatgcagtgg agtggttacc catacacgtt cggcggaggg 360
accaaggtgg agatcaaa 378

```

<210> 130

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<400> 130

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1             5             10             15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Gln Phe Ser Pro Phe
      20             25             30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35             40             45

```

```

Ala Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Asp
 50          55          60
Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
          85          90          95
Ala Arg Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
          100          105          110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 131
 <211> 414
 <212> DNA
 <213> 智人

```

<400> 131
atggagtttg gcctgagctg ggttttcctt gttgctatth tagaaggtgt ccagtgtgag 60
gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtccagcctg ggggggtccct gagactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcca gtttagtccc tttgccatgt cttgggtccg ccagggtcca 180
gggaaggggc tggagtgggt ggccaaaatt agtcccgggt ggagttggac ctactatcct 240
gacactgaca cgggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc actgtatctg 300
caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag acagttatgg 360
gggtactatg ctcttgactt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 414

```

<210> 132
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> unsure
 <222> (2) (3) (4) (5) (7)
 <223> 其中, Xaa可以是天然存在的20中氨基酸中的任意一种。

```

<400> 132
Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Tyr Met Tyr
 1          5          10

```

<210> 133
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<220>
 <221> unsure
 <222> (2) (4) (6)
 <223> 其中, Xaa可以是天然存在的20中氨基酸中的任意一种。

```

<400> 133
Asp Xaa Ser Xaa Leu Xaa Ser
 1          5

```

<210> 134
 <211> 9

<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> unsure
<222> (1) (2)
<223> 其中, Xaa可以是天然存在的20中氨基酸中的任意一种。

<400> 134
Xaa Xaa Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 135
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> unsure
<222> (3) (4) (6) (9)
<223> 其中, Xaa可以是天然存在的20中氨基酸中的任意一种。

<400> 135
Gly Phe Xaa Xaa Ser Xaa Phe Ala Xaa Ser
1 5 10

<210> 136
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> unsure
<222> (2) (4) (8) (9) (11) (12) (15) (16) (17)
<223> 其中, Xaa可以是天然存在的20中氨基酸中的任意一种。

<400> 136
Lys Xaa Ser Xaa Gly Gly Ser Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Asp Thr Xaa Xaa
1 5 10 15
Xaa

<210> 137
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<220>
<221> unsure
<222> (5) (10)
<223> 其中, Xaa可以是天然存在的20中氨基酸中的任意一种。

<400> 137
Gln Leu Trp Gly Xaa Tyr Ala Leu Asp Xaa
1 5 10

<210>	138
<211>	9
<212>	PRT
<213>	智人

<400> 138
Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
1 5

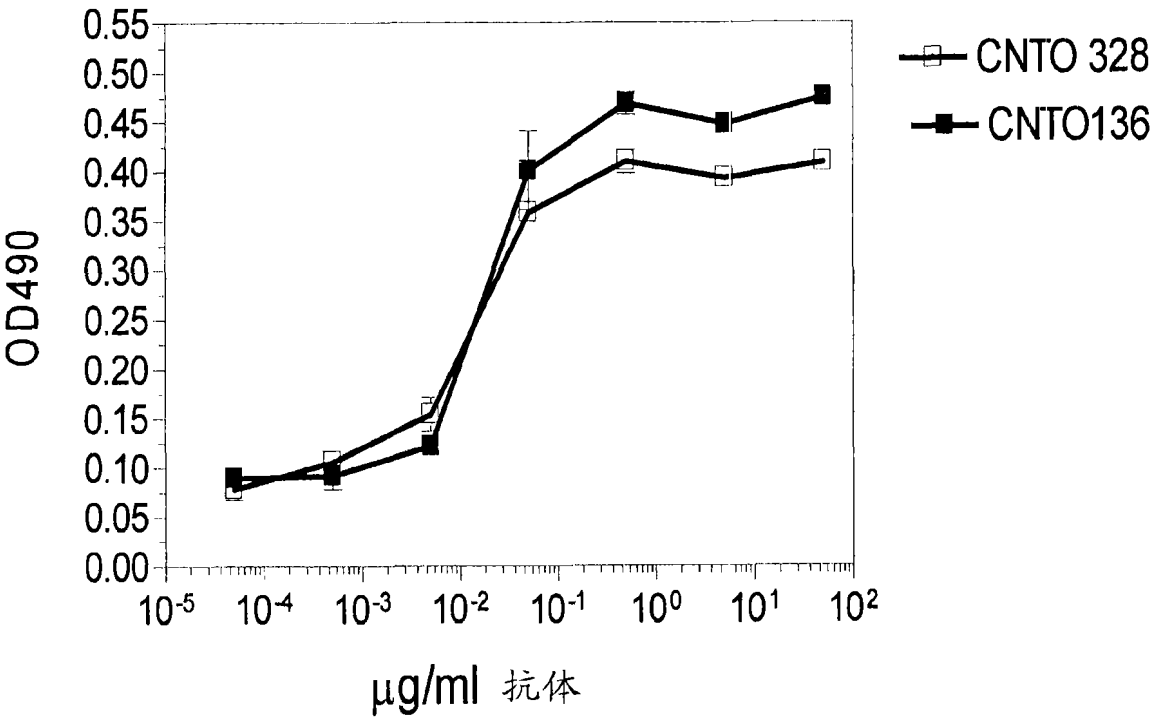
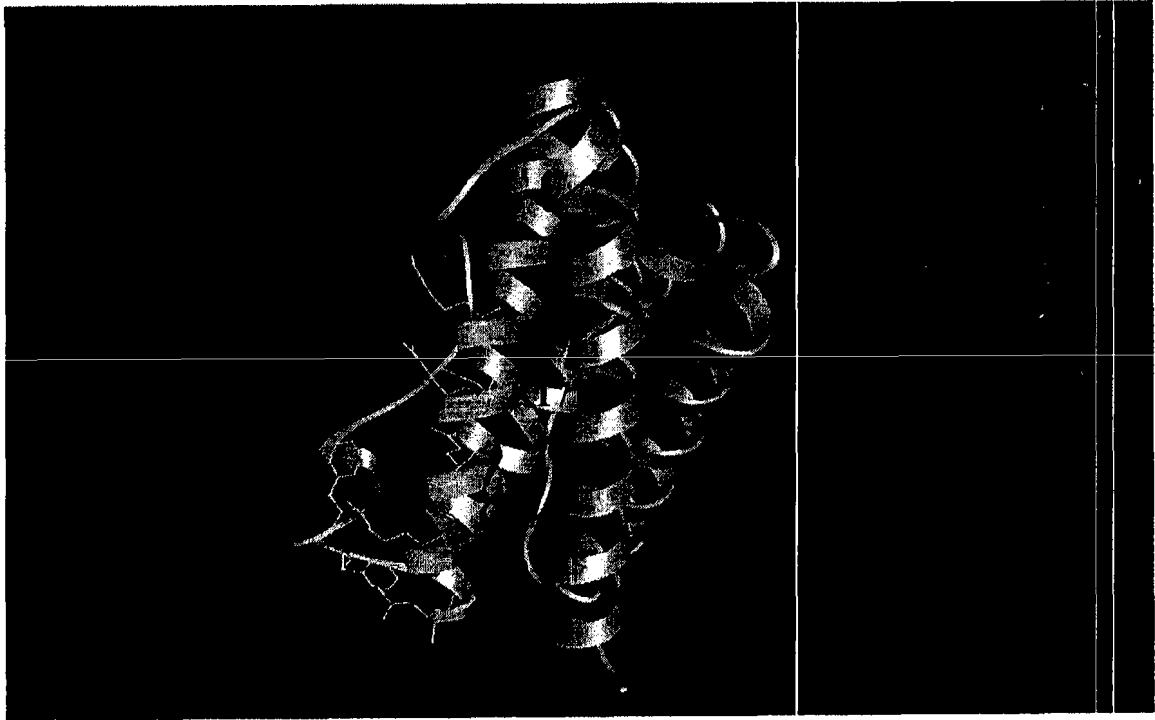


图 1



¹⁶⁸RSFKEFLQSSLRALRQM¹⁸⁴

图 2

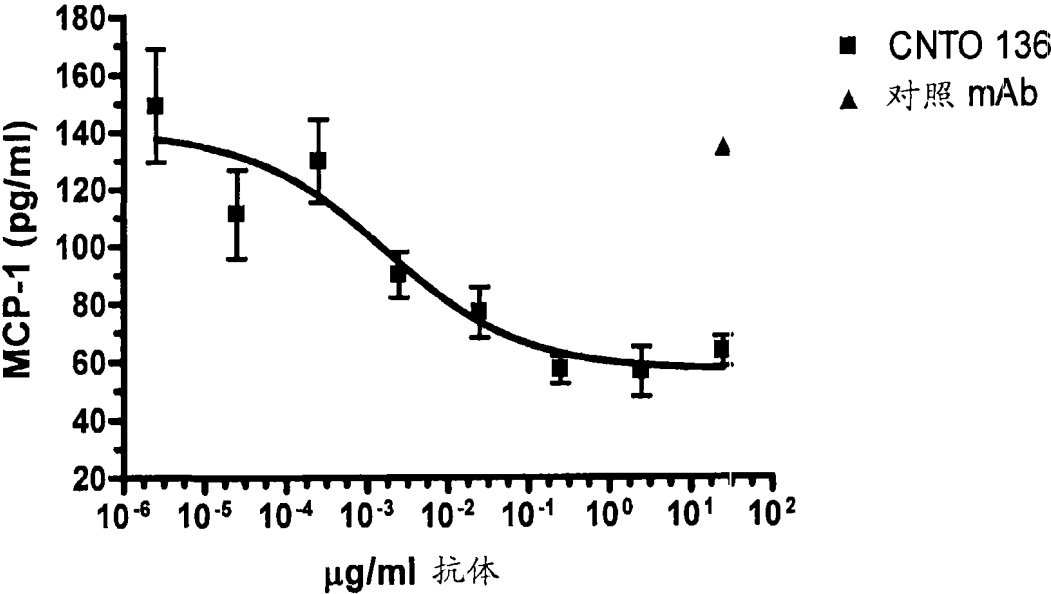


图 3

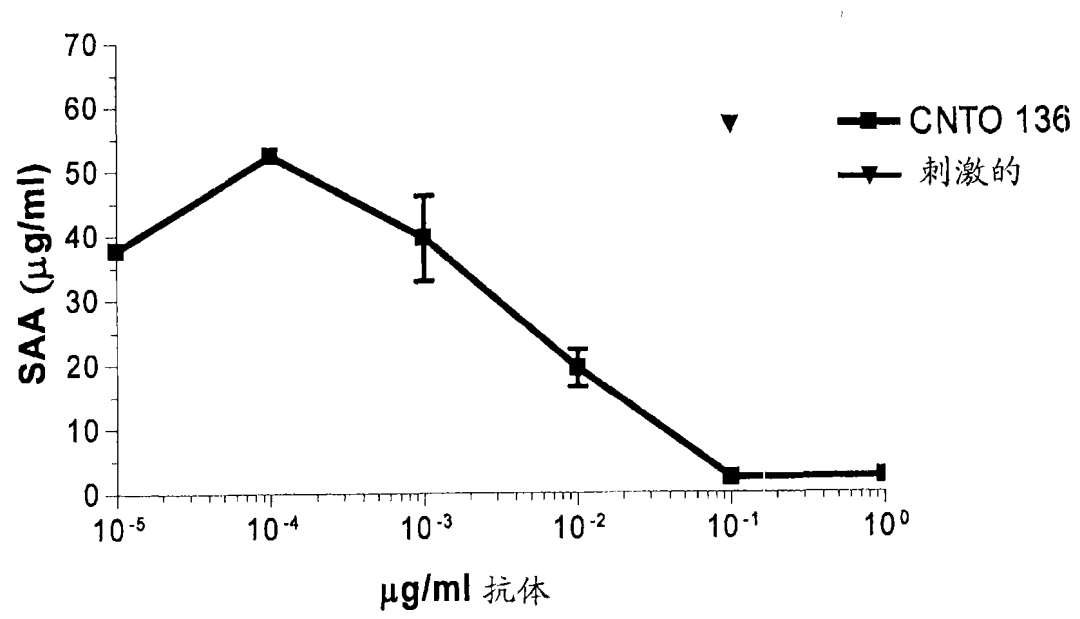


图 4

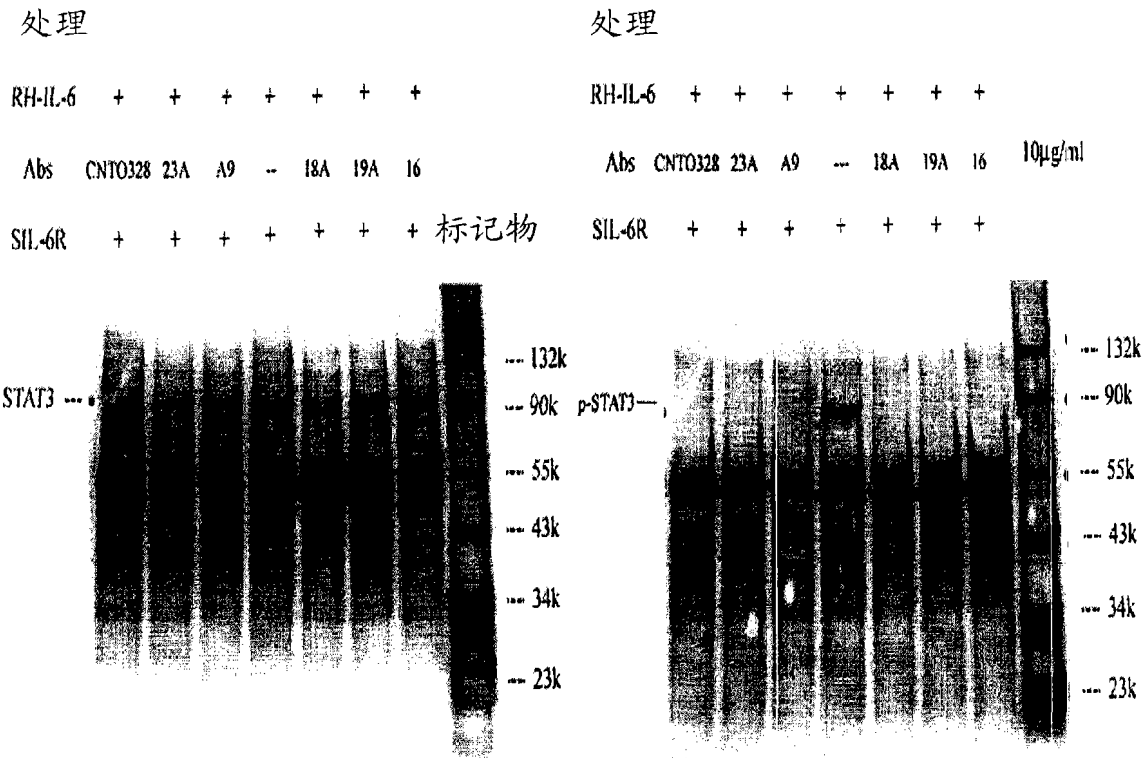


图 5

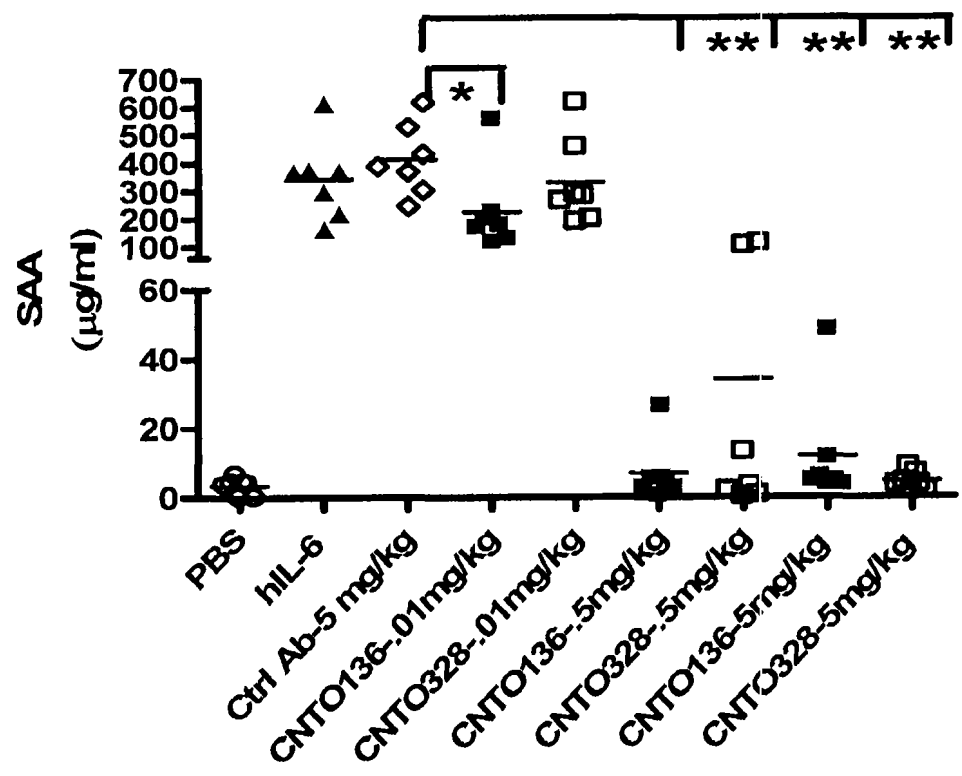


图 6

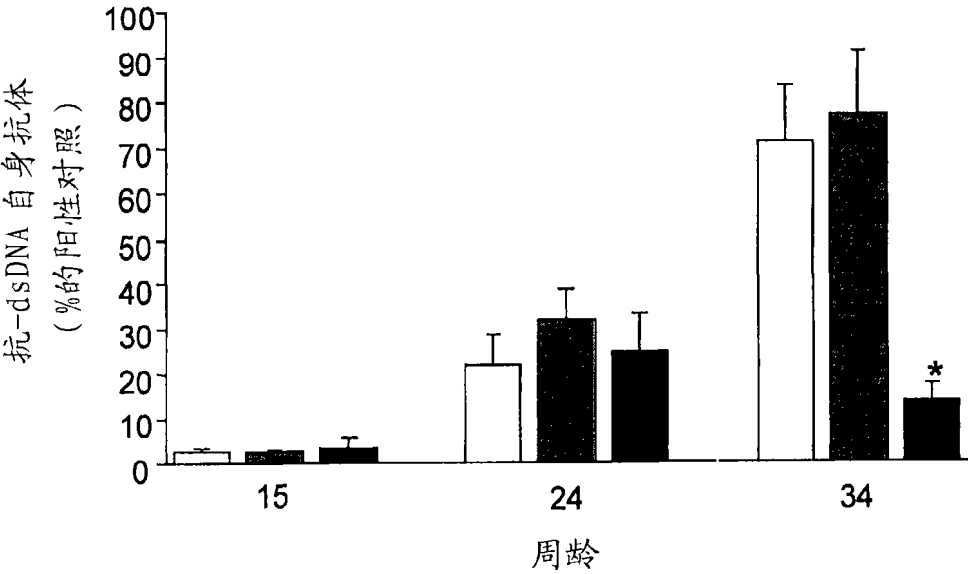


图 7

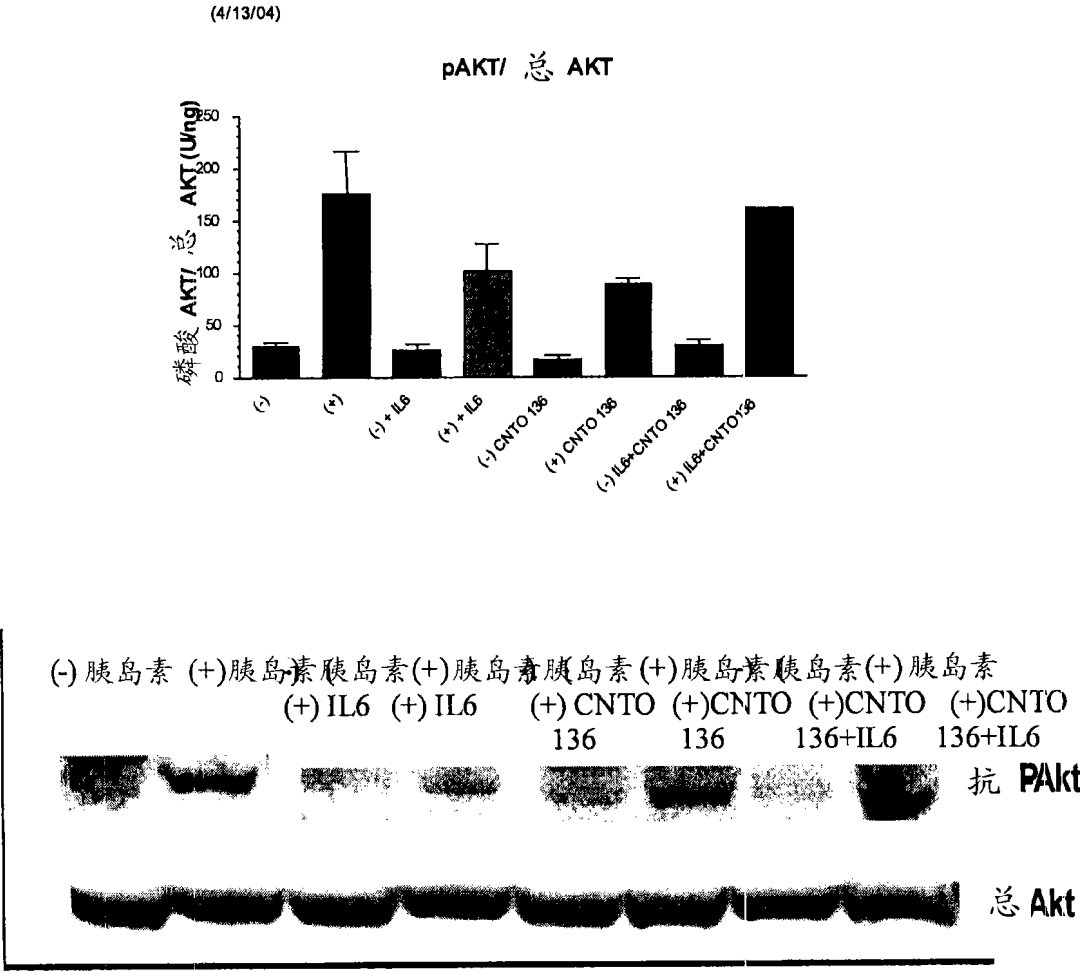


图 8

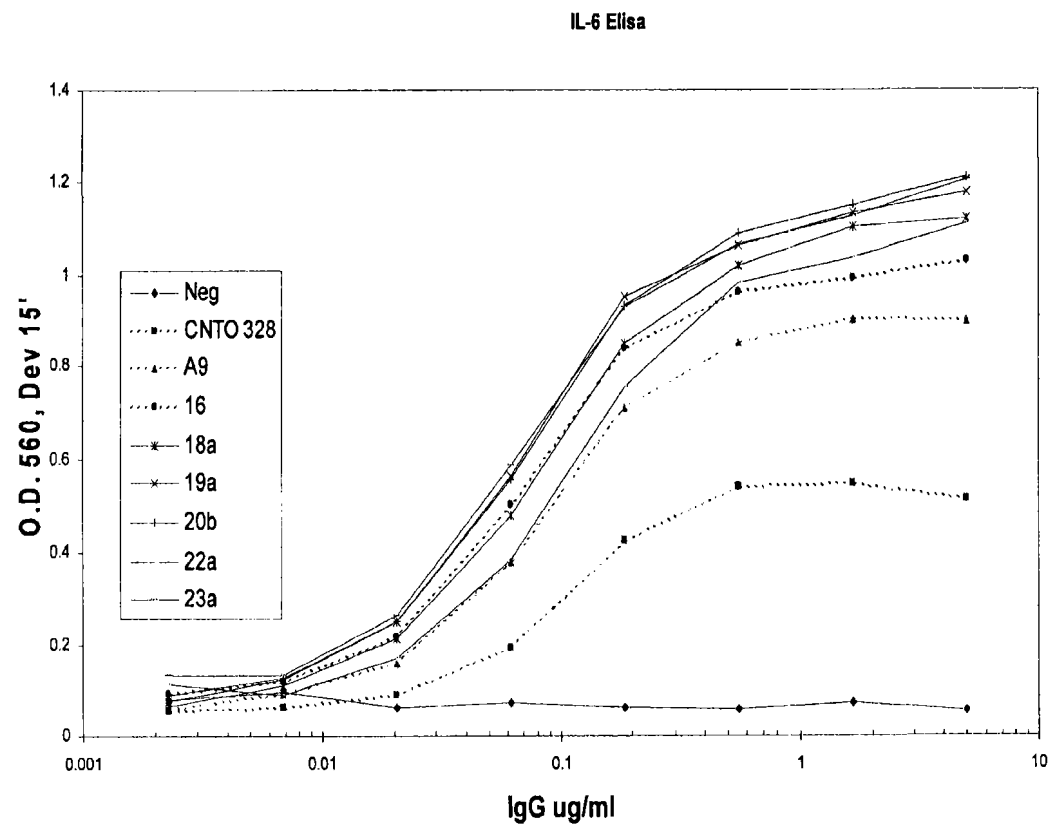


图 9

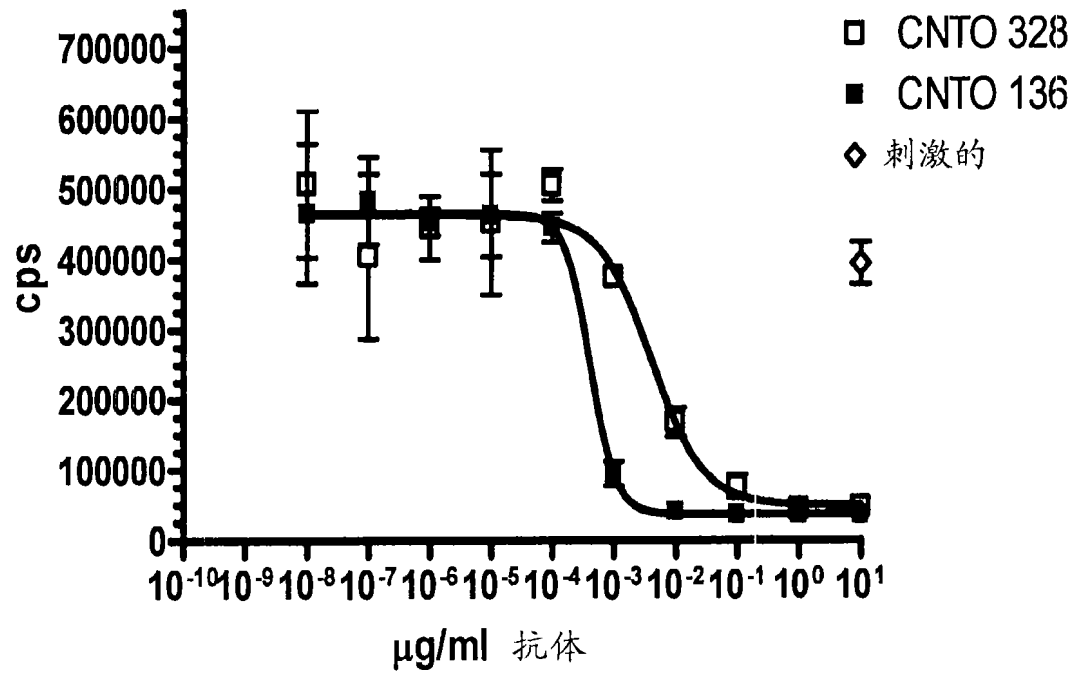


图 10

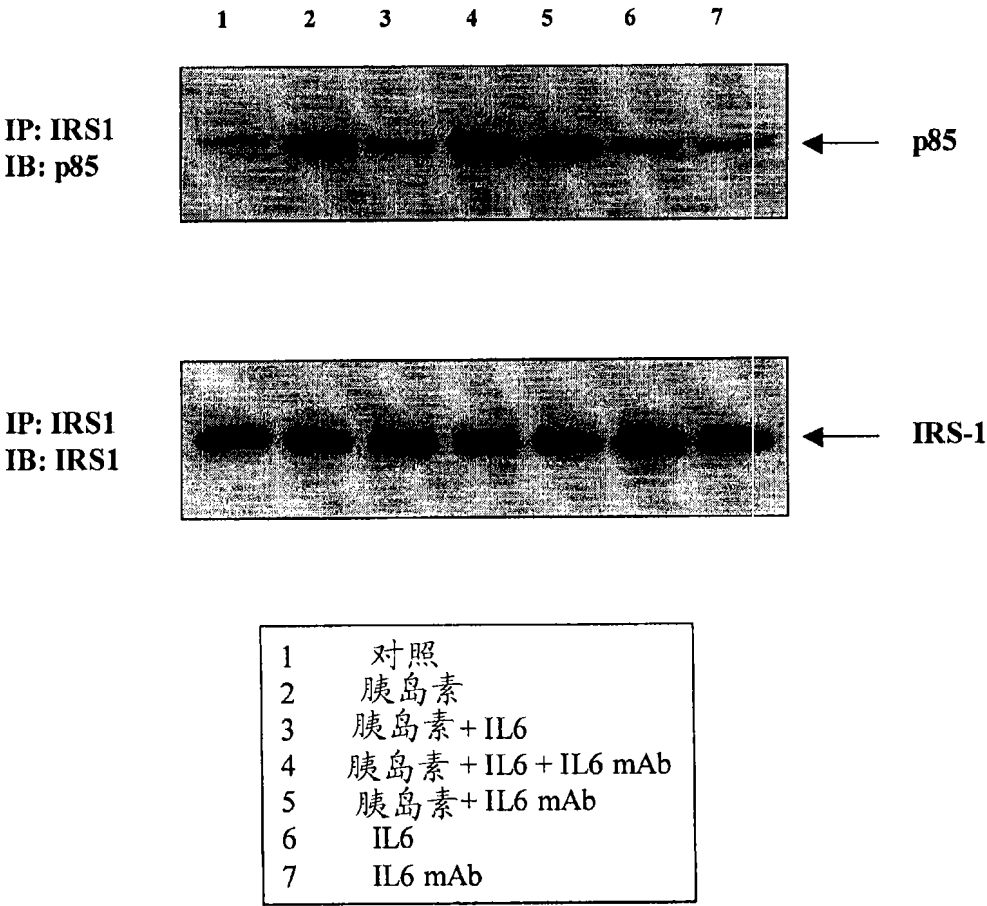


图 11

IL-6 对IR磷酸化的影响

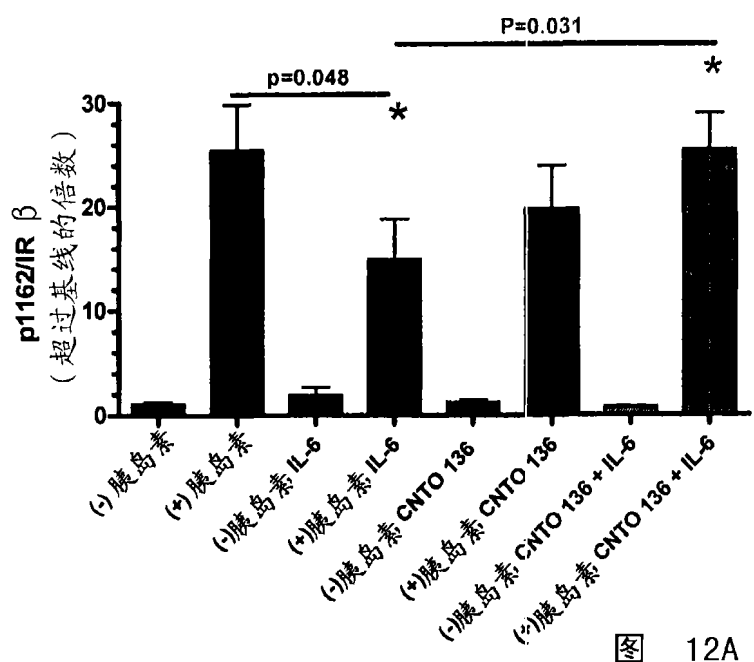


图 12A

IL-6 对AKT磷酸化的影响

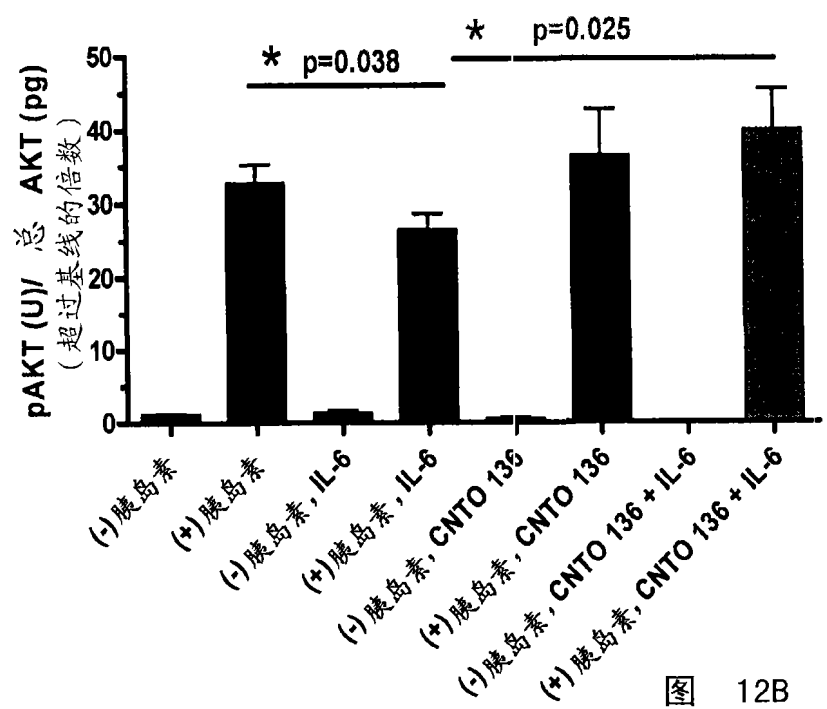


图 12B

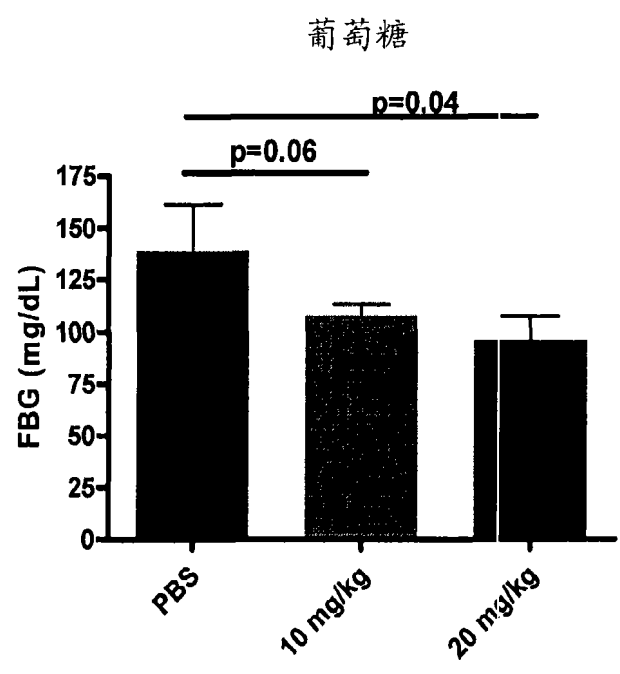


图 13A

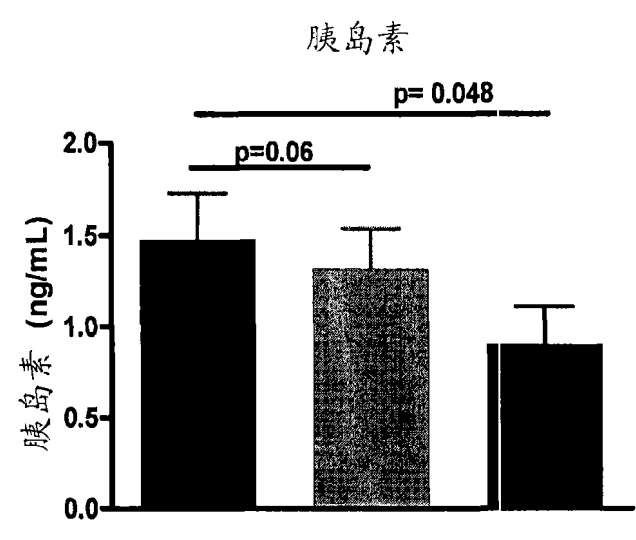


图 13B

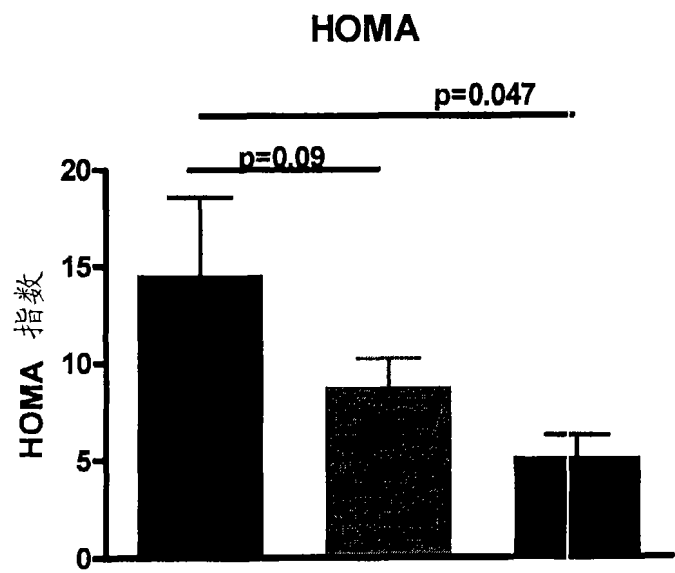


图 13C

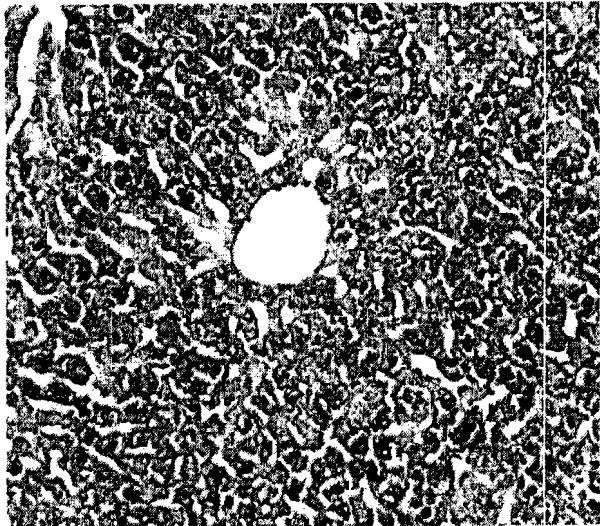


图 14A

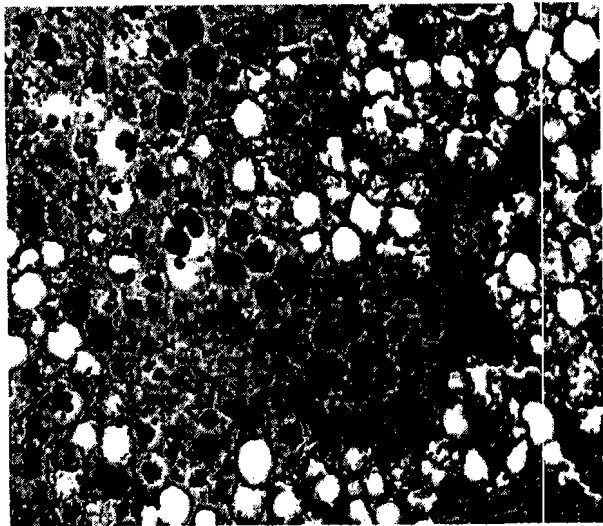


图 14B

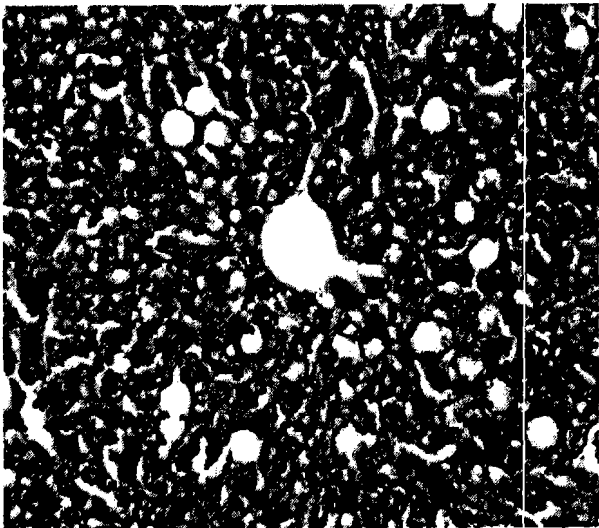


图 14C

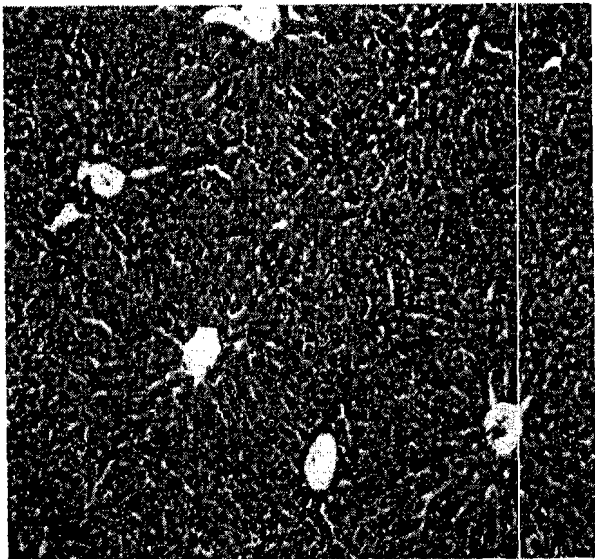


图 14D

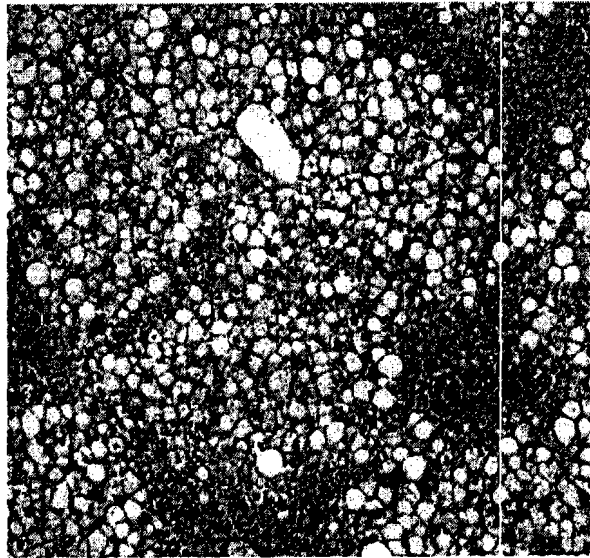


图 14E

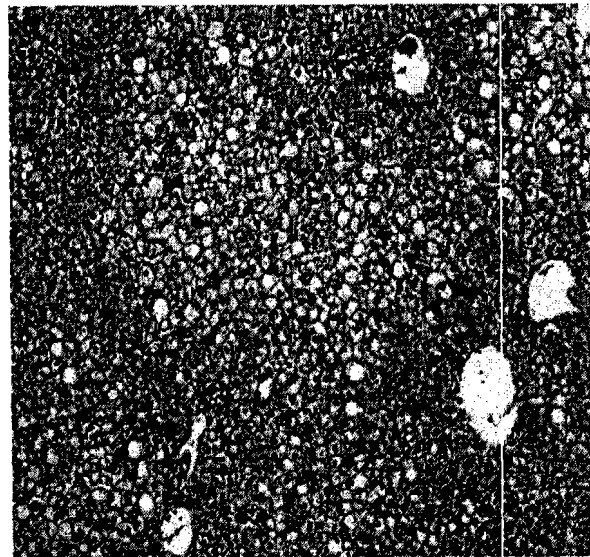


图 14F

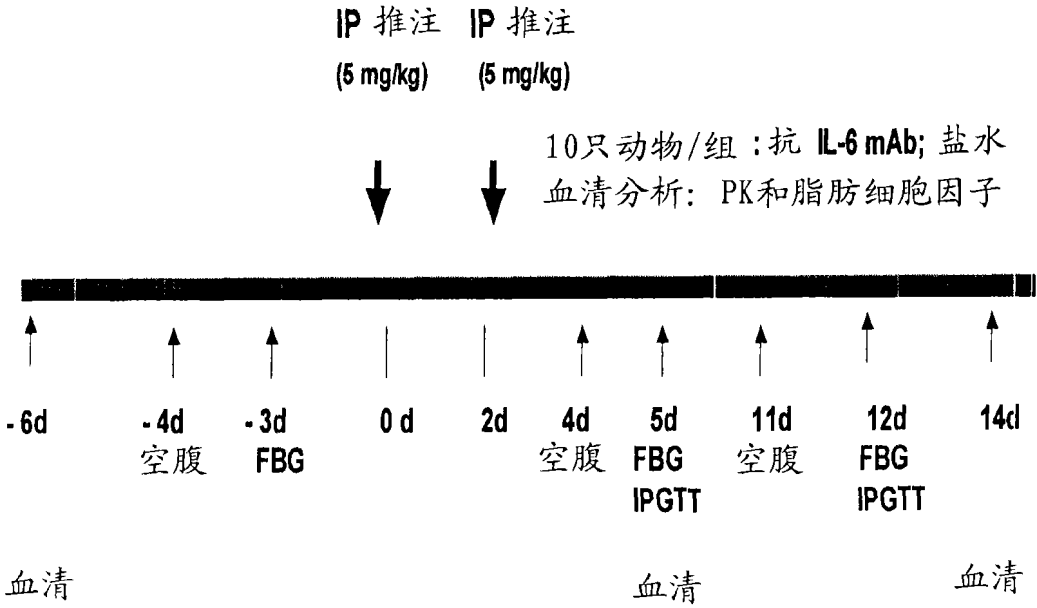


图 15

专利名称(译)	抗IL - 6抗体、组合物、方法及应用		
公开(公告)号	CN101415819A	公开(公告)日	2009-04-22
申请号	CN200680024037.1	申请日	2006-04-28
[标]申请(专利权)人(译)	森托科尔公司		
申请(专利权)人(译)	森托科尔公司 应用分子发展公司		
当前申请(专利权)人(译)	森托科尔公司 应用分子发展公司		
[标]发明人	Y陈 D加德纳 D M 克赖特 M W 拉克 B梁 D J 希利 R W 斯威特 SH谭 J杨 DM马奎斯 EM史密斯 AP瓦塞罗特		
发明人	Y·陈 D·加德纳 D·M·克赖特 M·W·拉克 B·梁 D·J·希利 X·Y·R·宋 V·斯托贾诺韦-苏苏里 R·W·斯威特 S·H·谭 S·J·吴 J·杨 D·M·马奎斯 E·M·史密斯 A·P·瓦塞罗特		
IPC分类号	C12N5/10 C12N15/12 C12N15/13 C12N15/63 A61K39/395 G01N33/53 G01N33/567		
CPC分类号	C07K2317/34 C07K2317/21 C07K2317/565 C07K2317/92 A61K2039/505 C07K2317/24 C07K16/248 C07K2316/96 A61P1/02 A61P1/16 A61P3/04 A61P3/10 A61P5/50 A61P7/00 A61P9/00 A61P9/10 A61P9/12 A61P11/00 A61P11/02 A61P13/00 A61P13/12 A61P17/00 A61P19/00 A61P19/02 A61P19/04 A61P19/08 A61P19/10 A61P25/00 A61P25/28 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/00 A61P31/04 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/02 A61P37/04 A61P37/06 A61P37/08 C07K2317/73 C07K2317/76 A61K2039/54 C07K2317/33 C07K2317/56 C07K2317/567		
代理人(译)	郭文洁 梁谋		
优先权	60/676498 2005-04-29 US		

其他公开文献 CN101415819B

外部链接 [Espacenet](#) [SIPO](#)

摘要(译)
一种抗IL - 6抗体、包括编码至少一种抗IL - 6抗体的分离的核酸、载体、宿主细胞、转基因动物或植物，及其具有应用于诊断和/或治疗组合物、方法和装置的制备和使用的方法。

CDR-->	轻链			重链			
	L1	L2	L3	H1	H2	H3	
WT--> CNTC328	S	T	Q	T	S E S	Y P V	G Y
Clone	27	51	89	28	31 5052a	56 60 83	86 102
AME-A9			S		K		Q
AME-18			S		K P		Q
AME-18a	F	M	Q	P	K P	W S	Q I
AME-19a	I	M		P	K P	W S	Q I
AME-20b	I	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