УКРАЇНА

(19) UA (11) 80091 (13) C2

(51) МПК (2006)
A61K 39/395
A61P 19/02 (2007.01)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ ВЛАСНОСТІ

ОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) ЗАСІБ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ДИТЯЧИХ ХРОНІЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ І ЗАСІБ ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ХВОРОБИ СТІЛЛА, ЩО МІСТЯТЬ АНТИТІЛА ДО IL-6 АБО ДО ЙОГО РЕЦЕПТОРА

1

(21) 2003109818
(22) 02.04.2002
(24) 27.08.2007
(86) PCT/JP02/03312, 02.04.2002
(31) 2001-103627
(32) 02.04.2001
(33) JP
(31) 2001-109131
(32) 06.04.2001
(33) JP
(46) 27.08.2007, Бюл. №13, 2007р.
(72) Єсізакі Казуюкі, JP, Нісімото Норіхіро, JP, Івамото Масахіро, JP, Мінота Сейдзі, JP, Єкота Сумпей, JP, Міямає Такако, JP
(73) ТУГАІ СЕЙЯКУ КАБУСІКІ КАЙСЯ, JP
(56) WO 99/48523 A2, 30.09.1999
EP 783893 A1, 16.07.1997
WO 98/13383 A1, 02.04.1998
WO 96/18648 A1, 20.06.1996
G. CARROLL ET AL.: 'Antagonism of the IL-6 cytokine subfamily- a potential strategy for more effective therapy in rheumatoid arthritis' INFLAMM. RES. vol. 47, 1998, pages 1 - 7, XP002115636
DANIEL WENDLING ET AL.: 'Treatment of severe rheumatoid arthritis by anti-interleukin 6 monoclonal antibody' THE JOURNAL OF RHEUMATOLOGY vol. 20, 1993, pages 259 - 262, XP002917899
M.J. ELLIOTT ET AL.: 'Suppression of fever and the acute-phase response in a patient with juvenile chronic arthritis treated with monoclonal antibody to tumour necrosis factor-alpha (cA2)' BRITISH JOURNAL OF RHEUMATOLOGY vol. 36, 1997, pages 589 - 593, XP002953580
OEN K. ET AL.: 'Interleukin 6 and autoantibodies in juvenile rheumatoid arthritis' J. RHEUMATOL. vol. 20, no. 11, 1993, pages 1949 - 1956, XP002953581
LEPORE L. ET AL.: 'Study of IL-2, IL-6, TNF alpha, IFN gamma and beta in the serum and synovial fluis of patients with juvenile chronic arthritis' CLIN. EXP. THEUMATOL. vol. 12, no. 5, 1994, pages 561 - 565, XP002953582
ROONEY M. ET AL.: 'Inflammatory cytokine responses in juvenile chronic arthritis' BR. J. RHEUMATO. vol. 34, no. 5, 1995, pages 454 - 460, XP002953583

2

TAKE H. ET AL.: 'Successful treatment with aurranofin in a patient with elderly-onset Still's disease' J. MED. vol. 25, no. 6, 1994, pages 393 - 397, XP002953584

(57) 1. Застосування антитіл до рецептора інтерлейкіну-6 (IL-6R) або антитіл до інтерлейкіну-6 (IL-6) для одержання терапевтичного засобу для лікування дитячих хронічних артритних захворювань.

2. Застосування за п. 1, де антитіло до рецептора IL-6 є моноклональним антитілом до рецептора IL-6.

3. Застосування за п. 2, де антитіло до рецептора IL-6 є моноклональним антитілом до рецептора IL-6 людини.

4. Застосування за п. 2, де антитіло до рецептора IL-6 є моноклональним антитілом до рецептора IL-6 миші.

5. Застосування за будь-яким з пп. 1-4, де антитіло до рецептора IL-6 є рекомбінантним антитілом.

6. Застосування за п. 3, де антитіло до рецептора IL-6 людини являє собою антитіло PM-1.

7. Застосування за п. 4, де антитіло до рецептора IL-6 миші являє собою антитіло MR 16-1.

8. Застосування за будь-яким з пп. 1-3, де антитіло до рецептора IL-6 є химерним антитілом, гуманізованим антитілом або антитілом людини до рецептора IL-6.

9. Застосування за п. 8, де гуманізоване антитіло до рецептора IL-6 являє собою гуманізоване антитіло PM-1.

10. Застосування за будь-яким з пп. 1-9, де дитячі хронічні артритні захворювання являють собою: за класифікацією ARA - системні, багатосуглобові і малосуглобові; за класифікацією EULAR - системні, багатосуглобові і олігосуглобові; за класифікацією ILAR - системні, багатосуглобові (RF-позитивні), багатосуглобові (RF-негативні), олігоартрит і розширений олігоартрит; за класифікацією авторів даного винаходу - первинні дитячі хронічні артритні захворювання (синдром SPRASH, ідіопатичні дитячі хронічні артритні захворювання - a) позитивні на ревматоїдний фактор (RF-позитивний тип), b) позитивні на антиядерні антитіла (ana-позитивний тип), c) RF/ANA-негативний тип).

11. Застосування за будь-яким з пп. 1-9, де дитячі хронічні артритні захворювання являють собою: за

(19) UA (11) 80091 (13) C2

класифікацією ARA - системні і багатосуглобові; за класифікацією EULAR - системні і багатосуглобові; за класифікацією ILAR - системні, багатосуглобові (RF-позитивні), багатосуглобові (RF-негативні) і розширений олігоартрит; за класифікацією авторів даного винаходу - первинні дитячі хронічні артритні захворювання (синдром SPRASH, ідіопатичні дитячі хронічні артритні захворювання - а) позитивні на ревматоїдний фактор (RF-позитивний тип), b) позитивні на антиядерні антитіла (ana-позитивний тип).

12. Застосування за будь-яким з пп. 1-9, де дитячі хронічні артритні захворювання являють собою: за класифікацією ARA - системні і багатосуглобові; за класифікацією EULAR - системні і багатосуглобові; за класифікацією ILAR - системні, багатосуглобові (RF-позитивні) і розширений олігоартрит; за класифікацією авторів даного винаходу - первинні дитячі хронічні артритні захворювання (синдром SPRASH, ідіопатичні дитячі хронічні артритні захворювання - а) позитивні на ревматоїдний фактор (RF-позитивний тип).

13. Застосування антитіл до IL-6R або антитіл до IL-6 для одержання терапевтичного агента для лікування хвороби Стілла.

14. Застосування за п. 13, де антитіло до рецептора IL-6 є моноклональним антитілом до рецептора IL-6.

15. Застосування за п. 14, де антитіло до рецептора IL-6 є моноклональним антитілом до рецептора IL-6 людини.

16. Застосування за п. 14, де антитіло до рецептора IL-6 є моноклональним антитілом до рецептора IL-6 миші.

17. Застосування за будь-яким з пп. 13-16, де антитіло до рецептора IL-6 є рекомбінантним антитілом.

18. Застосування за п. 15, де антитіло до рецептора IL-6 людини являє собою антитіло PM-1.

19. Застосування за п. 16, де антитіло до рецептора IL-6 миші являє собою антитіло MR 16-1.

20. Застосування за будь-яким з пп. 13-15, де антитіло до рецептора IL-6 є химерним антитілом, гуманізованим антитілом або антитілом людини до рецептора IL-6.

21. Застосування за п. 20, де гуманізоване антитіло до рецептора IL-6 являє собою гуманізоване антитіло PM-1.

22. Застосування за будь-яким з пп. 13-21, де хвороба Стілла являє собою дорослу форму хвороби Стілла.

23. Застосування за будь-яким з пп. 13-21, де хвороба Стілла являє собою дитячу форму хвороби Стілла.

Даний винахід стосується лікарського засобу для "захворювань, споріднених з дитячим хронічним артритним захворюванням", що включає як активний інгредієнт антагоніст інтерлейкіну-6 (IL-6). Захворювання, споріднені з дитячим хронічним артритним захворюванням, включають власне дитячі хронічні артритні захворювання, хворобу Стілла та їм подібні.

Цитокін IL-6 називають стимулюючим B-клітини фактором-2 (BSF2) або (3-інтерфероном. IL-6 був відкритий як фактор диференціювання, відповідальний за активацію лімфоїдних B-клітин [Hirano T. et al., Nature (1986) 324, 73-76]. Після цього було виявлено, що він є багатофункціональним цитокіном, що впливає на функції різних клітин [Akira S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78]. Повідомлялося, що IL-6 індукує дозрівання лімфоїдних T-клітин [Lotz M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258].

IL-6 здійснює свою біологічну активність за допомогою двох білків на поверхні клітини. Одним з них є ліганд-зв'язуючий білок, рецептор IL-6, молекулярна вага якого складає близько 80 кД, з яким зв'язується IL-6 [Taga T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981; Yamasaki K. et al., Science (1987) 241, 825-828]. Рецептор IL-6 існує не тільки в мембрано-зв'язаній формі, яка пронизує клітинну мембрану та експресується на ній, але також у вигляді розчинного рецептора IL-6, який в основному складається з позаклітинної частини.

Іншим білком є не зв'язуючий ліганди мембранний білок gpl30 з молекулярною вагою близько 130 кД, що бере участь у передачі сигналу. IL-6 і рецептор IL-6 утворюють комплекс IL-6/рецептор IL-6, з яким зв'язується gpl30, і наступним чином біологічна активність IL-6 передається всередину клітини [Taga et al., Cell (1983) 58, 573-581].

Антагоністи IL-6 - це речовини, що інгібують передачу біологічних активностей IL-6. До цього часу відомі антитіла до IL-6, антитіла до рецептора IL-6, антитіла до gpl30, перебудований IL-6, часткові пептиди IL-6 або рецептора IL-6 і т.п.

Антитіла до рецептора IL-6 описані у ряді оглядів (Novick D. et al., Hybridoma (1991) 10, 137-146; Huang Y.W. et al., Hybridoma (1993) 12., 621-630; International Patent Application WO 95-09873; French Patent Application FR 2694767; United States Patent US 5216128). Гуманізоване антитіло PM-1 було одержане шляхом уведення ділянки комплементарності (CDR) мишачого антитіла PM-1 (одного з антитіл до рецептора IL-6, Hirata et al., J. Immunology (1989), 143, 2900-2906) в антитіло людини ([International Patent Application WO 92-19759].

Дитячі хронічні артритні захворювання в основному представлені хронічними артритами, що виникають до 16-річного віку, які є найбільш поширеними захворюваннями з колагенових захворювань, що виникають у дітей. На відміну від ревматоїдного артриту (RA) у дорослих вони не вважаються однорідним захворюванням і представлені кількома типами, тому їх звичайно розглядають, як захворювання, відмінні від ревматоїдного артриту у дорослих.

Стосовно дитячих хронічних артритних захворювань в Японії застосовується назва "юнацький ревматоїдний артрит" відповідно до діагностичних критеріїв Сполучених Штатів, тоді як в Європі в основному застосовують термін "юнацький хронічний артрит". Нещодавно стали застосовувати і такі терміни, як ідіопатичний хронічний артрит (ICA) та юнацький ідіопатичний артрит (ЛА).

Типи дитячих хронічних артритних захворювань класифікували різним способом. Відповідно до Американської колегії ревматології (ACR), вони, тобто артритні захворювання, що виникають у дітей до 16 років і тривають протягом 6 тижнів та більше, поділяються на 3 типи: 1) системні, 2) багатосуглобові, 3) малосуглобові [JRA Criteria Subcommittee of the Diagnostic and Therapeutic Committee of the American Rheumatism Association, Arthritis Rheum 20 (Suppl): 195, 1977]. В Європі Європейська ліга проти ревматизму (EULAR) склала класифікацію, яка хоча й відрізняється від вищенаведеної класифікації ARA тим, що тривалість артриту складає 3 місяці і більше та тим, що з неї виключені артрити, викликані псоріазом, анкілозивним спондилітом та ін., проте вона визнає ті ж 3 типи захворювань [Bulletin 4, Nomenclature and Classification of Arthritis in Children. Basel, National Zeitung AG, 1977].

Нещодавно була зроблена спроба перегляду класифікації і Міжнародна ліга Асоціацій з ревматології (ILAR) запропонувала у 1995 р. проект класифікації дитячих ідіопатичних артритних захворювань [Fink CW, Proposal for the development of classification criteria for idiopathic arthritides of childhood. J. Rheumatol., 22: 1566 (1995)), а у 1997р. цей варіант був висунутий як проект ILAR (Southwood TR, Classifying childhood arthritis, Ann. Rheum. Dis. 56: 79 (1997)]. Ця класифікація передбачає поділ на 1) системний артрит, 2) RF-позитивний поліартрит, 3) RF-негативний поліартрит, 4) олігоартрит, 5) розширений олігоартрит, 6) артрит, зв'язаний з ентезитом, 7) псоріазний артрит і 8) інші.

Крім того, автори даного винаходу пропонували спосіб класифікації дитячих хронічних артритних захворювань на:

1) первинні дитячі хронічні артритні захворювання, у тому числі:

(1) синдром SPRASH (гострі напади лихоманки, перикардит, висип, артрит, спленомегалія, гепатомегалія). Розпочинається з підвищення температури при розслабленні і появи висипань, спостерігається серозит та гепатомегалія з одночасним або відстроченим виникненням артриту, хоча іноді артрит й не спостерігається;

(2) ідіопатичні дитячі хронічні артритні захворювання. Відсутнє основне захворювання, головна патологія - артрит;

a) позитивні на ревматоїдний фактор (RF-позитивний тип)

b) позитивні на антиядерні антитіла (ANA-позитивний тип)

c) RF/ANA-негативний тип;

2) вторинні дитячі хронічні артритні захворювання. Артрит може супроводити первинні спадкові або неспадкові захворювання [Shunpei Yokota, "Advances in recent therapeutic methods for chronic arthritides diseases of childhood", Rheumatism, 39: 860 (1999)].

Повідомлялося, що у дитячих хронічних артритних захворюваннях відіграють роль різні цитокіни. Зокрема, вважають, що з цим захворюванням пов'язані порушення балансу запальних цитокінів IL-1, IL-6, IL-12, TNF-α і протизапальних цитокінів IL-Ira (антагоніст рецептора IL-1), IL-10, IL-13, sTNFR (розчинний рецептор TNF).

Для лікування дитячих хронічних артритних захворювань застосовувалися нестероїдні протизапальні засоби, кортикостероїди, протиревматичні засоби (сполуки золота та ін.), імунодепресанти, метотрексат (MTX та ін.). Однак оскільки лікувальні ефекти відрізняються у кожного пацієнта, слід очікувати розробки більш ефективних терапевтичних схем.

Хвороба Стілла, вперше описана британським педіатром Стіллом у 1897р., має клінічну картину, чітко відмінну від ревматоїдного артриту у дорослих, і являє собою захворювання, що зустрічається і у дітей, і у дорослих (особливо у підлітків), при цьому основні симптоми -лихоманка, еритема, артрит, серозит і т.п. Виникаючий у дорослих тип називають дорослою формою хвороби Стілла. При хворобі Стілла аналіз на ревматоїдний фактор звичайно негативний.

У дітей хвороба Стілла є іншою назвою юнацького ревматоїдного артриту системного типу (він же юнацький ревматоїдний артрит (JRA), юнацький хронічний артрит (JCA), юнацький ідіопатичний артрит (ЛА)), який являє собою хронічний артрит, що виникає у дітей до 16 років. Як причини хвороби Стілла називали такі екологічні фактори, як віруси, такі фактори організму, як антигени HLA, і імунологічні розлади, проте етіологія все ще залишається незрозумілою.

Хвороба Стілла у дорослих і хвороба Стілла у дітей вважаються майже однаковими захворюваннями, хоча й спостерігаються незначні відмінності у клінічній картині, разом з віком виникнення хвороби. Хвороба Стілла у дітей означає JRA системного типу, як описано вище. Проте JRA і ревматоїдний артрит (RA) у дорослих відрізняються клінічно за багатьма ознаками і розглядаються як різні захворювання, тому хвороба Стілла у дорослих часто розглядається як особливе незалежне захворювання серед ревматичних хвороб.

Діагностичні критерії хвороби Стілла у дорослих відомі в описанні Yamaguchi [Journal of Rheumatology 19(3): 424-30, 1992), Reginato (Seminars in Arthritis & Rheumatism 17(1): 39-57, 1987], Gush (Rheumatology Grand Rounds, University of Pittsburgh Medical Center; Jan. 30, 1984), Goldman (Southern Medical Journal 73: 555-563, 1980] та ін.

Що стосується взаємозв'язку між хворобою Стілла і цитокінами, то були повідомлення про зв'язок з такими цитокінами, як IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF-α, IFN-γ, а такі запальні цитокіни, як IL-1, IL-6, TNF-α, IFN-γ, вважаються залученими в патологію хвороби Стілла.

Стосовно IL-6 було повідомлення de Benedetti et ai. про те, що рівень IL-6 підвищується при хво-

робі Стілла у дітей (Arthritis Rheum. 34: 1158, 1991), а у сироватці дітей, що страждають на хворобу Стілла, виявлено високий вміст комплексу IL-6/розчинний рецептор IL-6 (sIL-6R) і спостерігається кореляція між рівнем цього комплексу і рівнем С-реактивного білка (CRP) [J. Clin. Invest. 93: 2114, 1994]. Крім того, Rooney et ai. повідомляли, що рівні IL-6 і TNF-a у плазмі підвищуються у дітей, що страждають на хворобу Стілла [Br. J. Rheumatol. 34: 454, 1995].

Як спосіб лікування хвороби Стілла застосовувалися нестероїдні протизапальні засоби, кортикостероїди, протиревматичні засоби (сполуки золота та ін.), імунодепресанти, композиції γ-глобуліну, метотрексат (MTX та ін.). Однак оскільки лікувальні ефекти відрізняються у кожного пацієнта, слід продовжити розробку більш ефективних терапевтичних схем.

Отже, даний винахід передбачає новий терапевтичний засіб для захворювань, споріднених дитячим хронічним артритним захворюванням, причому даний засіб належить до іншого типу, ніж традиційні терапевтичні засоби для захворювань, споріднених дитячим хронічним артритним захворюванням. Відповідно до даного винаходу захворювання, споріднені дитячим хронічним артритним захворюванням, включають власне дитячі хронічні артритні захворювання і хворобу Стілла.

Після інтенсивного та всебічного дослідження цих проблем автори даного винаходу виявили, що антагоніст інтерлейкіну-6 (IL-6) має лікувальний ефект при захворюваннях, споріднених дитячим хронічним артритним захворюванням, і створили даний винахід.

Отже, даний винахід передбачає терапевтичний засіб для захворювань, споріднених дитячим хронічним артритним захворюванням, що включає антагоніст інтерлейкіну-6 (IL-6) як активного інгредієнта.

Зокрема, даний винахід передбачає терапевтичний засіб для дитячих хронічних артритних захворювань, що включає антагоніст інтерлейкіну-6 (IL-6) як активного інгредієнта.

Даний винахід також передбачає терапевтичний засіб для хвороби Стілла, що включає антагоніст інтерлейкіну-6 (IL-6) як активного інгредієнта.

Вищезазначений антагоніст IL-6 переважно є антитілом до рецептора IL-6, переважно моноклональним антитілом до рецептора IL-6 людини або моноклональним антитілом до рецептора IL-6 миші. Як приклад моноклонального антитіла до рецептора IL-6 людини можна навести антитіло PM-1, а як моноклональне антитіло до рецептора IL-6 миші можна навести антитіло MR 16-1.

Вказане антитіло переважно являє собою химерне антитіло, гуманізоване антитіло або антитіло людини, наприклад, гуманізоване антитіло PM-1.

До дитячих хронічних артритних захворювань, які є предметом лікування за допомогою терапевтичного засобу даного винаходу, належать всі захворювання у вищенаведених класифікаціях ARA, EULAR і ILAR, а також у класифікації авторів даного винаходу. З подальшим прогресом у методах серологічної діагностики і прогресом у методах терапії класифікація типів дитячих хронічних артритних захворювань зараз піддається перегляду у всьому світі, можна сказати, вона знаходиться у стані невизначеності. Переважними предметами лікування за допомогою терапевтичного засобу даного винаходу є: за класифікацією ARA - системні, багатосуглобові і малосуглобові; за класифікацією EULAR - системні, багатосуглобові і олігосуглобові; за класифікацією ILAR - системні, багатосуглобові (RF-позитивні), багатосуглобові (RF-негативні), олігоартрит і розширений олігоартрит; за класифікацією авторів даного винаходу - первинні дитячі хронічні артритні захворювання (синдром SPRASH, ідіопатичні дитячі хронічні артритні захворювання - а) позитивні на ревматоїдний фактор (RF-позитивний тип), Ь) позитивні на антиядерні антитіла (ANA-позитивний тип), с) RF/ANA-негативний тип); а найбільш переважними предметами лікування є: за класифікацією ARA - системні і багатосуглобові; за класифікацією EULAR - системні і багатосуглобові; за класифікацією ILAR - системні, багатосуглобові (RF-позитивні), багатосуглобові (RF-негативні) і розширений олігоартрит; за класифікацією авторів даного винаходу - первинні дитячі хронічні артритні захворювання (синдром SPRASH, ідіопатичні дитячі хронічні артритні захворювання - а) RF-позитивний тип, b) ANA-позитивний тип). Ще більш переважними предметами лікування є: за класифікацією ARA - системні і багатосуглобові; за класифікацією EULAR - системні і багатосуглобові; за класифікацією ILAR - системні, багатосуглобові (RF-позитивні) і розширений олігоартрит; а за класифікацією авторів даного винаходу - первинні дитячі хронічні артритні захворювання (синдром SPRASH, ідіопатичні дитячі хронічні артритні захворювання - а) RF-позитивний тип).

Антагоністи IL-6 для даного винаходу можуть бути будь-якого походження, будь-якого типу і будь-якого виду, якщо тільки вони мають терапевтичний ефект на захворювання, споріднені дитячим хронічним артритним захворюванням.

Антагоністи IL-6 - це речовини, які блокують передачу сигналу від IL-6 і інгібують біологічну активність IL-6. Антагоністи IL-6 - це речовини, які переважно мають інгібувальну дію на зв'язування самого IL-6, зв'язування з рецептором IL-6 або з gpl3O. Як приклад антагоністів IL-6 можна навести антитіла до IL-6, антитіла до рецептора IL-6, антитіла до gp130, перебудований IL-6, розчинний перебудований рецептор IL-6, часткові пептиди IL-6 або рецептора IL-6, а також низькомолекулярні речовини, що мають схожу активність.

Антитіла до IL-6 для даного винаходу можна одержати у вигляді поліклональних або моноклональних антитіл, використовуючи один з відомих методів. Як антитіла до IL-6 для даного винаходу переважні моноклональні антитіла, особливо які походять від ссавців. Моноклональні антитіла, що походять від ссавців, включають антитіла, одержані у гібридомі, і антитіла, одержані методами генної інженерії в організмі хазяїна, трансформованого експресійним вектором, що містить ген антитіла. Такі антитіла за допомогою зв'язування IL-6 блокують зв'язування IL-6 з рецептором IL-6 і тим

самим блокують поширення біологічної активності IL-6 у клітині.

Приклади таких антитіл включають антитіло MH166 [Matsuda et al., Eur. J. Immunology (1998) 18, 951-956), або антитіло SK2 (Sato et al., The 21st General Meeting of the Japanese Society for Immunology, Gakujutu Kiroku (1991) 21, 166] та ін.

Гібридому, що продукує антитіла до IL-6, по суті можна створити одним з відомих методів, як описано нижче. Так, IL-6 використовують як сенситизуючий антиген для проведення імунізації стандартним методом імунізації, а одержані при цьому імунні клітини зливають з відомими батьківськими клітинами стандартним методом злиття клітин, після чого скринують клітини, що продукують моноклональне антитіло, стандартним методом скринування.

Зокрема, антитіла до IL-6 можна одержати наступним чином. Наприклад, IL-6 людини, що використовується як сенситизуючий антиген для одержання антитіл, можна одержати за допомогою гена або амінокислотної послідовності IL-6, які описані в [Eur. J. Biochem. (1987) 168, 543-550; J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541; Agr. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688].

Після уведення послідовності гена IL-6 у відомий експресійний вектор і трансформації придатних клітин хазяїна білок IL-6 можна виділити з клітин хазяїна або з супернатанта його культури одним з відомих методів і використати очищений білок IL-6 як сенситизуючий антиген. Як альтернатива можна використовувати злитий білок, що складається з білка IL-6 і ще одного білка як сенситизуючого антигена.

Антитіла до рецептора IL-6 для даного винаходу можна одержати у вигляді поліклональних або моноклональних антитіл, використовуючи один з відомих методів. Як антитіла до рецептора IL-6 для даного винаходу переважні моноклональні антитіла, особливо які походять від ссавців. Моноклональні антитіла, що походять від ссавців, включають антитіла, одержані у гібридомі, і антитіла, одержані методами генної інженерії в організмі хазяїна, трансформованого експресійним вектором, що містить ген антитіла. Такі антитіла за допомогою зв'язування IL-6 блокують зв'язування IL-6 з рецептором IL-6 і тим самим блокують поширення біологічної активності IL-6 у клітині.

Приклади таких антитіл включають антитіло MR16-1 [Tamura T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924-11928), антитіло PM-1 (Hirata Y. et al., J. Immunology (1989) 143, 2900-2906), антитіло AUK12-20, AUK64-7 або AUK146-15 (International Patent Application WO 92-19759] та ін. З них найбільш переважним є антитіло PM-1.

До речі, лінія клітин гібридоми, що продукує антитіло PM-1, була здана 12 липня 1988р. на міжнародне зберігання за умовами Будапештського договору у вигляді PM-1 в Міжнародний депозитарій патентованих організмів у Національному інституті промислової науки та технології [Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba City, Ibaraki Pref., 305-5466 Japan] як FERM BP-2998. Також і лінія клітин гібридоми, що продукує антитіло MR 16-1, була здана 13 березня 1997р. на міжнародне зберігання за умовами Будапештського договору у вигляді гібридоми пацюк/миша MR 16-1 в Міжнародний депозитарій патентованих організмів у Національному інституті промислової науки та технології [Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba City, Ibaraki Pref., 305-5466 Japan] як FERM BP-5875.

Гібридому, що продукує моноклональні антитіла до рецептора IL-6, по суті можна створити одним з відомих методів, як описано нижче. Так, рецептор IL-6 використовують як сенситизуючий антиген для проведення імунізації стандартним методом імунізації, а одержані при цьому імунні клітини зливають з відомими батьківськими клітинами стандартним методом злиття клітин, після чого скринують клітини, що продукують моноклональне антитіло, стандартним методом скринування.

Зокрема, антитіла до рецептора IL-6 можна одержати наступним чином. Наприклад, рецептор IL-6 людини, що використовується як сенситизуючий антиген для одержання антитіл, можна одержати за допомогою гена або амінокислотної послідовності рецептора IL-6, описаної в [European Patent Application No. EP 325474], а рецептор IL-6 миші можна одержати за допомогою гена або амінокислотної послідовності рецептора IL-6, описаних в [Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 3-155795].

Існує 2 типи рецепторів IL-6: рецептор IL-6, експресований на клітинній мембрані, і IL-6, відокремлений від клітинної мембрани розчинний рецептор IL-6, [Yasukawa et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676]. Розчинний рецептор IL-6 в основному складається з позаклітинної частини рецептора IL-6, зв'язаного з клітинною мембраною, і відрізняється від мембрано-зв'язаного рецептора IL-6 тим, що у нього відсутня трансмембранна частина або і трансмембранна частина, і внутріклітинна частина. Білок рецептора IL-6 може бути будь-яким з рецепторів IL-6, аби його можна було використовувати як сенситизуючий антиген для одержання антитіл до рецептора IL-6 для даного винаходу.

Після уведення гена, що кодує рецептор IL-6, у відомий експресійний вектор і трансформації придатних клітин хазяїна необхідний білок рецептора IL-6 можна виділити з клітин хазяїна або з супернатанта його культури одним з відомих методів і використовувати очищений при цьому білок рецептора IL-6 як сенситизуючого антигена. Як альтернатива можна використовувати клітини, що експресують білок рецептора IL-6, або злитий білок, що складається з білка рецептора IL-6 та ще одного білка, як сенситизуючого антигена.

Клітини Escherichia coli (E. coїї), що містять плазміду pIBIBSF2R, яка несе кДНК, що кодує рецептор IL-6 людини, були здані 9 січня 1989р. на міжнародне зберігання за умовами Будапештського договору у вигляді HB101-pIBIBSF2R в Міжнародний депозитарій патентованих організмів у Національному інституті промислової науки та технології Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba City, Ibaraki Pref., 305-5466 Japan як FERM BP-2232.

Антитіла до gpl30 для даного винаходу можна одержати у вигляді поліклональних або моноклональних антитіл, використовуючи один з відомих

методів. Як антитіла до gpl30 для даного винаходу переважні моноклональні антитіла, особливо які походять від ссавців. Моноклональні антитіла, що походять від ссавців, включають антитіла, одержані у гібридомі, і антитіла, одержані методами генної інженерії в організмі хазяїна, трансформованого експресійним вектором, що містить ген антитіла. Такі антитіла за допомогою зв'язування gpl30 блокують зв'язування gpl30 з комплексом IL-6/рецептор IL-6 і тим самим блокують поширення біологічної активності IL-6 у клітині.

Приклади таких антитіл включають антитіло AM64 [Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 3-219894), антитіло 4B11 і антитіло 2H4 (US 5571513)], антитіло B-S12 і антитіло B-P8 [Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 8-291199] та ін.

Гібридому, що продукує антитіла до gpl30, по суті можна створити одним з відомих методів, як описано нижче. Так, gpl30 використовують як сенситизуючий антиген для проведення імунізації стандартним методом імунізації, а одержані при цьому імунні клітини зливають з відомими батьківськими клітинами стандартним методом злиття клітин, після чого скринують клітини, що продукують моноклональне антитіло, стандартним методом скринування.

Зокрема, антитіла до рецептора IL-6 можна одержати наступним чином. Наприклад, gpl30, що використовується як сенситизуючий антиген для одержання антитіл, можна одержати за допомогою гена або амінокислотної послідовності gpl30, описаних у [Європейській патентній заявці № EP 411946].

Послідовність гена gpl30 можна вбудувати у відомий експресійний вектор і використовувати цей вектор для трансформації придатних клітин хазяїна. З клітин хазяїна або з супернатанта його культури можна виділити білок gpl30 одним з відомих методів і використати очищений білок IL-6 як сенситизуючого антигена. Як альтернатива можна використовувати клітини, що експресують gpl30, або злитий білок, що складається з білка gpl30 та ще одного білка як сенситизуючого антигена.

Переважно ссавців для імунізації сенситизуючим антигеном обирають з урахуванням їх сумісності з батьківськими клітинами, що використовуються для злиття клітин, і звичайно до них належать такі гризуни, як миші, пацюки і хом'яки, не обмежуючись лише ними.

Імунізацію тварин сенситизуючим антигеном проводять відомими методами. Наприклад, загальноприйнятий метод включає внутрішньочеревинне або підшкірне уведення сенситизуючого антигена ссавцю. Зокрема, сенситизуючий антиген, розбавлений і суспендований у необхідному обсязі фосфатного буфера (PBS) або фізіологічного розчину і т.д., змішують з відповідною кількістю поширеного ад'юванта, такого як повний ад'ювант Фрейнда. Після емульгування його переважно вводять ссавцю кілька разів через кожні 4-21 дня. Крім того, можна використовувати придатного носія при імунізації сенситизуючим антигеном.

Після імунізації і підтвердження підвищення рівня необхідних антитіл у сироватці відповідним методом виділяють імунні клітини з тварини і піддають злиттю. Як переважний приклад імунних клітин, що піддаються злиттю, можна відзначити клітини селезінки.

Батьківські клітини, з якими проводять злиття вищезазначених імунних клітин, - це клітини мієломи ссавців, до яких переважно належать різні відомі клітинні лінії, такі як P3x63Ag8.653 [Kearney J.F. et al., J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3x63Ag8U.I (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler G. and Milstein C, Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies D.H. et al., Cell (1976) 8,405-415), SP2/0 (Shulman M. et al., Nature (1978) 276, 269-270), FO (de St. Groth S.F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21), Sl94 (Trowbridge I.S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323), R210 (Galfre G. et al., Nature (1979) 217, 131-133) та ін.], які можна використовувати при необхідності.

Злиття між вищезазначеними імунними клітинами і клітинами мієломи по суті можна проводити відповідно до одного з відомих методів, наприклад, описаного у [Milstein et al. Kohler G. and Milstein C, Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46] та ін.

Зокрема, злиття вказаних клітин проводять у стандартному живильному середовищі за присутності, наприклад, прискорювача злиття клітин. Як прискорювач злиття клітин можна використовувати, наприклад, поліетиленгліколь (PEG), вірус Сендай (HVJ) та ін., і можна додати ад'ювант типу диметилсульфоксиду для підвищення ефективності злиття.

Переважно співвідношення між імунними клітинами і клітинами мієломи складає, наприклад, в 1-10 разів більше імунних клітин, ніж клітин мієломи. Приклади культуральних середовищ для злиття вказаних клітин включають, наприклад, середовище RPMI 1640 і культуральне середовище MEM, які придатні для вирощування вказаних клітинних ліній мієломи, а також стандартні культуральні середовища, що застосовуються для культивування клітин цього типу, з додаванням сироватки, наприклад, ембріональної телячої сироватки (FCS).

При злитті клітин задані кількості вказаних імунних клітин і клітин мієломи ретельно змішують у зазначеному культуральному середовищі, в яке доданий розчин PEG, попередньо підігрітий приблизно до 37°C, наприклад, розчин PEG з середньою молекулярною вагою від 1000 до 6000, в концентрації від 30 до 60% (ваг/об), і перемішують для одержання необхідних злитих клітин (гібридом). Потім, повторюючи по черзі додавання відповідного культурального середовища і центрифугування з видаленням супернатанта, можна позбутися тих засобів для злиття клітин, які небажані для зростання гібридоми.

Гібридому піддають селекції шляхом культивування у стандартному селективному середовищі, наприклад, культуральному середовищі HAT (воно містить гіпоксантин, аміноптерин і тимідин). Культивування у середовищі HAT звичайно продовжують протягом часу, достатнього для загибелі всіх клітин, окрім потрібної гібридоми (тобто клітин, що не злилися), звичайно від кількох днів до кількох тижнів. Виконується стандартний метод

граничного розведення, при цьому проводиться скринування та клонування гібридом, що продукують потрібне антитіло.

Разом з одержанням гібридоми шляхом імунізації тварини (не людини) антигеном також можна сенситизувати лімфоцити людини in vitro за допомогою потрібного антигенного білка або антиген-експресуючих клітин і одержати сенситизовані В-лімфоцити, потім провести злиття їх з клітинами мієломи, наприклад, лінії U266, що має здатність до постійного поділу, і одержати гібридому, що продукує потрібне антитіло людини, що має здатність до зв'язування з потрібним антигеном або антиген-експресуючими клітинами [Japanese Post-examined Patent Publication (Kokoku) 1-59878]. Крім того, трансгенну тварину з репертуаром генів антитіл людини можна імунізувати антигеном або антиген-експресуючими клітинами і одержати потрібне антитіло людини відповідно до вказаного методу [див. International Patent Applications WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735].

Одержані таким чином гібридоми, що продукують моноклональні антитіла, можна підростити у стандартному культуральному середовищі або зберігати протягом довгого часу у рідкому азоті.

Для того, щоб одержати моноклональні антитіла з гібридоми, можна застосувати метод, у якому гібридому культивують стандартним методом і одержують антитіла у вигляді супернатанта, або метод, у якому гібридому імплантують ссавцю, сумісному з даною гібридомою, і вирощують в ньому, а антитіла одержують у вигляді асцитів. Перший метод придатний для одержання антитіл високого ступеня чистоти, тоді як другий підходить для широкомасштабної продукції антитіл.

Наприклад, з гібридоми, що продукує антитіло до рецептора IL-6, можна одержати поліпептид способом, розкритим в [Japanese Unexammed Patent Publication (Kokai) No. 3-139293]. Можна скористатися способом, у якому гібридому, що продукує антитіло PM-1, яка була здана 12 липня 1988 р. на міжнародне зберігання за умовами Будапештського договору в Міжнародний депозитарій патентованих організмів у Національному інституті промислової науки та технології [Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba City, Ibaraki Pref., 305-5466 Japan] як FERM BP-2998, вводять внутрішньочеревинно мишам BALB/c для одержання асцитів, з яких можна виділити антитіло PM-1, або способом, у якому гібридому культивують у середовищі RPMI 1640, що містить 10% ембріональної телячої сироватки, 5% BM-Codimed HI (фірми Boehringer Mannheim), або у середовищі SFM для гібридом (фірми Gibco BRL), середовищі PFHM-II (фірми Gibco BRL) і т.п., з супернатанта якого можна виділити антитіло PM-1.

Відповідно до даного винаходу, як моноклональне антитіло можна використовувати рекомбінантне антитіло, одержане шляхом клонування гена антитіла з гібридоми, вбудовування цього гена у відповідний вектор, який вводиться в організм хазяїна для одержання рекомбінантного антитіла методами генної інженерії, наприклад, [див. Borrebaeck C.A.K. and Larrick J.W., Therapeutic Monoclonal Antibodies, published in the United Kingdom by Macmillan Publishers Ltd. 1990].

Зокрема, можна виділити мРНК, що кодує варіабельну зону (V-зону) антитіла, з клітин, що продукують дане антитіло, наприклад, гібридоми. Виділення мРНК здійснюється шляхом одержання тотальної РНК одним з відомих методів, наприклад, гуанідиновим методом з ультрацентрифугуванням [Chirgwin J.M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299], методом AGPC [Chomczynski P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159], після чого з тотальної РНК очищають мРНК за допомогою набору для очистки мРНК (фірми Pharmacia) і т.п. З іншого боку, можна одразу одержати мРНК за допомогою набору для очистки мРНК Quick Prep (фірми Pharmacia).

З одержаної таким чином мРНК можна синтезувати кДНК V-зони антитіла за допомогою зворотної транскриптази. Синтезувати кДНК можна за допомогою набору для синтезу першої нитки кДНК зі зворотною транскриптазою AMV і т.п. З іншого боку, для синтезу та ампліфікації кДНК можна використати набір 5'-Ampli Finder RACE (фірми Clontech) і метод 5'-RACE [Frohman M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932], у якому застосовується ПЦР. Потрібний фрагмент ДНК очищають з одержаного продукту ПЦР і лігують з ДНК вектором. Крім того, з нього конструюють рекомбінантний вектор і вводять його в E. coїї, колонії яких піддають селекції для одержання потрібного рекомбінантного вектора. Послідовність основ даної ДНК можна встановити відомим методом, наприклад, методом дидезоксіоснов.

Після одержання ДНК, що кодує V-зону необхідного антитіла, її можна лігувати з ДНК, що кодує константну зону (C-зону) потрібного антитіла, а потім вбудувати в експресійний вектор. З іншого боку, кодуючу V-зону антитіла ДНК можна вбудувати в експресійний вектор, що вже містить ДНК, кодуючу C-зону антитіла.

Для того, щоб одержати антитіло для використання у даному винаході, ген антитіла вбудовують в експресійний вектор так, щоб він експресувався під керуванням особливої регуляторної ділянки, наприклад, енхансера і/або промотору. Після цього експресійний вектор вводять шляхом трансформації в клітини хазяїна, які можуть експресувати антитіло.

Відповідно до даного винаходу, з метою зменшення гетерологічної антигенності щодо людини можуть застосовуватися штучно модифіковані рекомбінантні антитіла, такі як химерні антитіла, гуманізовані антитіла і антитіла людини. Такі модифіковані антитіла можна одержати відомими методами.

Химерні антитіла можна одержати шляхом лігування вже одержаної ДНК, що кодує V-зону антитіла, з ДНК, що кодує C-зону антитіла людини, а потім вбудувати в експресійний вектор і ввести в клітини хазяїна для вироблення в них антитіл [див. European Patent Application EP 125023 і International Patent Application WO 92-19759]. За допомогою цього відомого методу можна одержа-

ти химерні антитіла, які застосовують у даному винаході.

Плазміди, що містять V-зону L-ланцюга або V-зону H-ланцюга химерного антитіла PM-1, одержали назву pPM-к3 і pPM-hl, відповідно, і клітини E. coїї, що містять відповідні плазміди, були здані 11 лютого 1991р. на міжнародне зберігання за умовами Будапештського договору як NCIMB40366 і NCIMB40362 в Національну колекцію промислових та морських бактерій (NCIMB Limited).

Гуманізовані антитіла, які також називають перебудованими антитілами людини, одержують шляхом пересадження ділянки комплементарності (CDR) з антитіла ссавця (не людини), наприклад, антитіла миші, в CDR антитіла людини. Загальна технологія рекомбінантної ДНК для одержання таких антитіл також відома [див. European Patent Application EP 125023 і International Patent Application WO 92-19759].

Зокрема, послідовність ДНК, призначену для лігування CDR антитіла миші з каркасною ділянкою (FR) антитіла людини, синтезують з кількох окремих олігонуклеотидів, які частково перекривають один одного на кінцях. Одержану при цьому ДНК лігують з ДНК, що кодує C-зону антитіла людини, а потім вбудовують в експресійний вектор, який вводять в клітини хазяїна для одержання антитіл [див. European Patent Application EP 239400 і International Patent Application WO 92-19759].

Для лігування FR антитіла людини з CDR обирають такий CDR, який має придатний антигензв'язувальний сайт. При бажанні можна замінити амінокислоти в ділянці FR V-зони антитіла з тим, щоб CDR гуманізованого антитіла міг утворити відповідний антигензв'язувальний сайт [Sato K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856].

Як C-зону антитіла людини можна використовувати, наприклад, Cγ1, Cγ2, Cγ3 або Cγ4. C-зону антитіла людини також можна модифікувати для того, щоб поліпшити стабільність антитіла і його вироблення.

Химерні антитіла складаються з V-зони антитіла, що походить не з людини, і C-зони антитіла людини, а гуманізовані антитіла складаються з ділянки комплементарності (CDR) антитіла, що походить не з людини, і каркасної ділянки (FR) антитіла людини, при цьому їх антигенність в організмі людини зменшується, тому вони застосовні як антитіла для даного винаходу.

Як переважне втілення гуманізованого антитіла для даного винаходу можна відзначити гуманізоване антитіло PM-1 [див. International Patent Application WO 92-19759].

Як метод одержання антитіл людини, разом з описаними вище, відомий метод одержання антитіл людини за допомогою "кадрування". Наприклад, варіабельну зону антитіла людини експресують на поверхні фага методом фагового дисплея у вигляді одноланцюжкового антитіла (scFv) і проводять селекцію фага, що зв'язує антиген. Аналізуючи ген відібраного фага, можна ідентифікувати послідовність ДНК, що кодує варіабельну зону антитіла людини, яка зв'язується з антигеном. Після з'ясування послідовності ДНК того scFv, яке зв'язується з антигеном, цю послідовність можна використовувати для створення відповідного експресійного вектора і одержання антитіла людини. Такі методи вже відомі і їх можна знайти у [WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 і WO 95/15388].

Гени антитіл, створені як описано вище, можуть бути експресовані і одержані одним з відомих способів. У випадку клітин ссавців експресія може здійснюватися за допомогою ДНК, у якій функціонально зв'язані один із загальновживаних промоторів, експресований ген антитіла і сигнал пол і A по 3'-бік від нього, або за допомогою вектора, що містить її. Як промотор/енхансер можна відзначити, наприклад, найбільш ранній промотор/енхансер цитомегаловірусу людини.

Крім того, як промотор/енхансер, який можна використовувати для експресії антитіла для даного винаходу, можна відзначити промотори/енхансери таких вірусів, як ретровіруси, віруси поліоми, аденовіруси і вірус-40 мавп (SV40), і промотори/енхансери з клітин ссавців, такі як фактор елонгації людини 1α (HEF1α).

Наприклад, експресію можна легко здійснити за методом Mulligan et al. [Mulligan R.C. et al., Nature (1979) 277, 108-114], якщо застосовується промотор/енхансер SV40, і за методом Mizushima et al. [Mizushima S. and Nagata S., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322], якщо застосовується промотор/енхансер HEFla.

У випадку E. coli експресія може проводитися шляхом функціонального з'єднання одного із загальновживаних промоторів, сигнальної послідовності для секреції антитіла і екс пресованого гена антитіла з подальшою експресією. Як промотор можна відзначити, наприклад, промотор lacZ і промотор agaB. Можна використати метод Ward et al. [Ward E.S. et al., Nature (1989) 341, 544-546; Ward E.S. et al., FASEB J. (1992) 6, 2422-2427], якщо застосовується промотор lacZ, і метод Better et al. [Better M. et al., Science (1988) 240, 1041-1043], якщо застосовується промотор agaB.

Як сигнальна послідовність для секреції антитіл, якщо вони продукуються у периплазмі E. coїї, можна використовувати сигнальну послідовність реї B [Lei S.P. et al., J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383]. Після виділення антитіл, продукованих у периплазмі, структуру антитіл належним чином відновлюють перед застосуванням, наприклад, [див. WO 96-30394].

Як початок реплікації можна використовувати ті, що походять з SV40, вірусу поліоми, аденовірусів, вірусу бичачої папіломи (BPV) і т.п. Крім того, для ампліфікації числа копій гена в системі клітин хазяїна експресійні вектори можуть включати як селектовані маркери ген аміноглікозидтрансферази (APH), ген тимідинкінази (TK), ген ксантин-гуанін фосфорибозилтрансферази E. coїї (Ecogpt), ген дигідрофолатредуктази (dhfr) і т.п.

Для одержання антитіл для даного винаходу можна використовувати будь-які системи продукції, причому системи продукції для одержання антитіл включають системи продукції in vitro або in

vivo. Як систему продукції in vitro можна відзначити системи продукції, в яких застосовуються еукаріотичні клітини, і системи продукції, в яких застосовуються прокаріотичні клітини.

При використанні еукаріотичних клітин в системах продукції застосовуються клітини тварин, клітини рослин або клітини грибів. Відомі клітини тварин включають (1) клітини ссавців, такі як клітини CHO, клітини COS, клітини мієломи, ниркові клітини хом'яків (ВНК), клітини HeLa і клітини Vero; (2) клітини амфібій, такі як ооцити Xenopus; (3) клітини комах, такі як sf9, sf21 і Тп5. Відомі клітини рослин включають, наприклад, клітини з калюсних культур Nicotiana tabacum. Відомі клітини грибів включають дріжджові клітини, наприклад, з роду Saccharomyces, зокрема Saccharomyces cerevisiae, або нитчастих грибів, наприклад, з сімейства Aspergillus, зокрема Aspergillus niger.

При використанні прокаріотичних клітин в системах продукції застосовуються клітини бактерій. Відомі клітини бактерій включають Escherichia соїї і Bacillus subtilis.

При уведенні шляхом трансформації гена необхідного антитіла в ці клітини та культивуванні трансформованих клітин in vitro можна одержати антитіло. Культивування проводиться відомими методами. Так, як культуральне середовище для клітин ссавців можна використовувати DMEM, MEM, RPMI1640, IMDM і т.п., у поєднанні з додаванням сироватки типу ембріональної телячої сироватки (FCS). Крім того, антитіла можна одержувати in vivo, імплантуючи клітини, в які був уведений ген антитіла, у черевну порожнину тварини і т.д.

Як системи продукції in vivo можна відзначити системи, в яких застосовуються тварини, і системи, в яких застосовуються рослини. При використанні тварин в системах продукції застосовуються ссавці або комахи.

Із ссавців можна використовувати кіз, свиней, овець, мишей і корів [Vicki Glaser, Spectrum Biotechnology Applications, 1993]. З комах можна використовувати шовковичних черв'яків, а у випадку рослин - наприклад, тютюн.

Гени антитіл вводять у такі тварини і рослини, в яких їх продукують, а потім виділяють. Наприклад, гени антитіл вбудовують посеред гена, що кодує білок, який неодмінно виробляється у молоці, наприклад, козиний Р-казеїн, і одержують злиті гени. Фрагменти ДНК, що містять злитий ген, в який був вставлений ген антитіла, уприскують в козиний ембріон і вводять його козі. Потрібне антитіло одержують з молока, що виробляється трансгенною козою, народженою від тієї кози, що одержала ембріон або його потомство. Для того, щоб підвищити кількість молока, що містить необхідне антитіло, яке виробляється трансгенною козою, їй можна вводити гормони за потреби [Ebert K.N. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702].

При використанні шовковичних черв'яків їх інфікують бакуловірусом, у який був вставлений ген потрібного антитіла, і необхідне антитіло можна одержати з рідкого середовища організму шовковичного черв'яка [Maeda S. et al., Nature (1985) 315, 592-594]. Крім того, при використанні тютюну ген потрібного антитіла вбудовують в експресійний вектор для рослин, наприклад, pMON530, а потім вектор вводять у бактерію типу Agrobacterium tumefaciens. Потім бактерію використовують для інфікування тютюну типу Nicotiana tabacum для одержання потрібного антитіла з листя тютюну [Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138].

При одержанні антитіл в системі продукції in vitro або in vivo, як зазначено вище, ДНК, що кодує важкий ланцюг (Н-ланцюг) або легкий ланцюг (L-ланцюг) антитіла по окремості вбудовують в експресійний вектор, а клітини хазяїна трансформують одночасно, або ДНК, що кодує Н-ланцюг або L-ланцюг антитіла, вбудовують в один експресійний вектор і трансформують їм клітини хазяїна [див. International Patent Application WO 94-11523].

Антитіла для даного винаходу можуть являти собою фрагменти антитіл або їх модифіковані варіанти, якщо тільки вони переважно застосовуються у даному винаході. Наприклад, як фрагменти антитіл можна відзначити Fab, F(ab)2, Fv або одноланцюжкові Fv (scFv), у яких Fv ланцюгів Н і L сполучені через відповідний лінкер.

Зокрема, антитіла обробляють ферментом, наприклад, папаїном або пепсином, одержуючи фрагменти антитіл, або конструюють гени, що кодують ці фрагменти антитіл, а потім вбудовують в експресійний вектор, який експресують у відповідних клітинах хазяїна, наприклад, [див. Co M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better M. and Horwitz A.H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Plucktrun A. and Skerra A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird R.E. et al., TI BTECH (1991) 9, 132-137].

ScFv можна одержати шляхом лігування V-зони Н-ланцюга з V-зоною L-ланцюга антитіла. У scFv V-зона Н-ланцюга лігована з V-зоною L-ланцюга переважно через лінкер, більш прийнятно пептидний лінкер [Huston J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 5879-5883]. V-зона Н-ланцюга і V-зона L-ланцюга у scFv можуть походити з будь-якого з вищезазначених антитіл. Як пептидний лінкер для лігування цих V-зон можна використовувати будь-який одноланцюжковий пептид, наприклад, що складається з 12-19 амінокислотних залишків.

ДНК, що кодує scFv, можна одержати, використовуючи як матрицю ДНК, що кодує Н-ланцюг або V-зону Н-ланцюга даного антитіла, і ДНК, що кодує L-ланцюг або V-зону L-ланцюга даного антитіла, ампліфікуючи відрізок ДНК, що кодує необхідну амінокислотну послідовність з числа вказаних, методом ПЦР за допомогою пари праймерів, визначаючих обидва кінці її, а потім ампліфікуючи ДНК, що кодує відрізок пептидного лінкера, разом з парою праймерів, визначаючих, що обидва кінці даної ДНК будуть ліговані з Н-ланцюгом і L-ланцюгом, відповідно.

Після конструювання ДНК, що кодує scFv, можна одержати стандартними методами експресійний вектор і клітини хазяїна, трансформовані да-

ним вектором, після чого одержати scFv з клітин хазяїна стандартними методами.

Такі фрагменти антитіл можна одержати, створюючи їхні гени таким самим способом, як вказано вище, і здійснюючи їх експресію в клітинах хазяїна. "Антитіло" у даному винаході охоплює і ці фрагменти антитіл.

З числа модифікованих антитіл можна використовувати антитіла, зв'язані з різними молекулами типу поліетиленгліколю (PEG). "Антитіло" у даному винаході охоплює й ці модифіковані антитіла. їх можна одержати шляхом хімічної модифікації одержаних антитіл. Такі методи вже визнані у цій галузі.

Антитіла, експресовані та одержані, як описано вище, можна виділити з внутрішнього чи зовнішнього середовища клітин або хазяїна, а потім очистити до гомогенного стану. Виділення і очистка антитіл для даного винаходу може здійснюватися методом афінної хроматографії. З колонок, що застосовуються для афінної хроматографії, можна відзначити колонки з білком А і колонки з білком G. Приклади носіїв для колонок з білком А включають, наприклад, Hyper D, POROS, Sepharose F.F. (Pharmacia) і т.п. Крім того, можна використовувати загальновживані методи виділення і очистка білків без будь-якого обмеження.

Інші методи хроматографії, відмінні від афінної хроматографії, фільтри, гель-фільтрацію, висолювання, діаліз і т.д. можна обирати і комбінувати відповідним чином для виділення та очистка антитіл для даного винаходу. Хроматографія включає, наприклад, іонообмінну хроматографію, гідрофобну хроматографію, гель-фільтрацію і т.п. Ці різновиди хроматографії можна застосовувати у вигляді високоефективної рідинної хроматографії (HPLC). Також можна використовувати зворотнофазову HPLC (rpHPLC).

Концентрацію антитіл, одержаних як описано вище, можна визначити шляхом виміру поглинання або методом ELISA та ін. Так, при використанні вимірів поглинання одержані антитіла відповідним чином розбавляють буфером PBS(-) і вимірюють поглинання при 280нм, після чого проводять розрахунки, використовуючи коефіцієнт поглинання 1,35 OD при 1мг/мл. При використанні методу ELISA виміри проводять наступним чином. Так, у мікропланшет на 96 лунок (фірми Nunc) вносять по 100 мкл козиних антитіл проти IgG людини (фірми Tago), розбавлених до 1 мкг/мл у 0,1М бікарбонатному буфері, pH 9,6, і інкубують при 4°С для імобілізації антитіл. Після блокування додають по 100 мкл розбавлених антитіл для даного винаходу чи зразків, що містять антитіла, або IgG людини (фірми Cappeї) як стандарт, і інкубують при кімнатній температурі протягом 1 години.

Після відмивання додають 100мкл розбавленого у 5000 разів міченого лужною фосфатазою антитіла проти IgG людини (фірми BioSource) і інкубують при кімнатній температурі протягом 1 години. Після відмивання додають розчин субстрату і інкубують, після чого вимірюють поглинання при 405 нм на зчитувальному приладі для мікропланшетів Model 3550 (фірми Bio-Rad) і розраховують концентрацію даних антитіл.

Перебудований IL-6 для даного винаходу являє собою речовину, що має активність зв'язування з рецептором IL-6, але не викликає передачі біологічної активності IL-6. Так, незважаючи на те, що перебудований IL-6 конкурує з IL-6 за зв'язування з рецептором IL-6, він не поширює біологічну активність IL-6, тому перебудований IL-6 блокує передачу сигналів IL-6.

Перебудований IL-6 можна одержати уведенням мутацій шляхом заміни амінокислотних залишків в амінокислотній послідовності IL-6. Перебудований IL-6 можна одержати з IL-6 будь-якого походження, однак переважно він являє собою IL-6 людини, враховуючи антигенність і т.п.

Зокрема, можна встановити вторинну структуру амінокислотної послідовності IL-6 за допомогою однієї з відомих програм молекулярного моделювання типу WHATIF [Vriend et al., J. Moї. Graphics (1990) 8, 32-56] і оцінити вплив на неї всіх замін амінокислотних залишків. Після визначення придатних амінокислотних залишків можна ввести мутації, використовуючи вектор, що містить послідовність основ IL-6 людини, як матрицю для загальновживаного методу ПЦР з тим, щоб здійснити заміну амінокислот і тим самим одержати ген, що кодує перебудований IL-6. Його можна вбудувати відповідним чином у придатний експресійний вектор для одержання перебудованого IL-6 відповідно до вказаних вище методів експресії, виготовлення і очистки рекомбінантних антитіл.

Конкретні приклади перебудованих IL-6 розкриті у [Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93; Saviono et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367; WO 96-18648 і WO 96-17869].

Часткові пептиди IL-6 або часткові пептиди рецептора IL-6 для даного винаходу являють собою речовини, що мають активність зв'язування з рецептором IL-6 або IL-6, відповідно, але не викликають передачі біологічної активності IL-6. Так, часткові пептиди IL-6 або часткові пептиди рецептора IL-6 зв'язуються і захоплюють рецептор IL-6 або IL-6, відповідно, і таким чином специфічно інгібують зв'язування IL-6 або рецептора IL-6. В результаті цього вони не дозволяють передачу біологічної активності IL-6 і тим самим блокують передачу сигналів IL-6.

Часткові пептиди IL-6 або часткові пептиди рецептора IL-6 - це пептиди, що містять частину або всю амінокислотну послідовність, що бере участь у зв'язуванні IL-6 або рецептора IL-6, в амінокислотній послідовності IL-6 або рецептора IL-6. Такі пептиди звичайно містять 10-80 амінокислотних залишків, переважно 20-50 амінокислотних залишків, більш прийнятно 20-40 амінокислотних залишків.

Часткові пептиди IL-6 або часткові пептиди рецептора IL-6 визначаються ділянками, що беруть участь у зв'язуванні IL-6 або рецептора IL-6, в амінокислотній послідовності IL-6 або рецептора IL-6, і частину або усю цю амінокислотну послідовність можна одержати одним із загальновідомих методів, таких як методи генної інженерії або пептидного синтезу.

Для того, щоб одержати часткові пептиди IL-6 або часткові пептиди рецептора IL-6 методами

генної інженерії, послідовність ДНК, що кодує необхідний пептид, можна вбудувати в експресійний вектор таким чином, що їх можна буде одержати вказаними вище методами експресії, виготовлення і очистки рекомбінантних антитіл.

Для того, щоб одержати часткові пептиди IL-6 або часткові пептиди рецептора IL-6 методами пептидного синтезу, можна використовувати один із загальновживаних методів пептидного синтезу, наприклад, твердофазового синтезу або рідкофазового синтезу.

Зокрема, можна використовувати методи, описані в ["Zoku Iyakuhinno Kaihatsu, Vol. 14: Peptide Synthesis" edited Haruaki Yajima, Hirokawa Shoten, 1991]. З методів твердофазового синтезу можна використати метод, у якому амінокислоту, що відповідає С-кінцю синтезованого пептиду, приєднують до основи, не розчинної в органічних розчинниках, а потім проводять реакцію конденсації амінокислот, у яких а-аміногрупа і функціональна група бічного ланцюга були заблоковані відповідними захисними групами, одну за одною у напрямі від С-кінця до N-кінця, чергуючись з реакцією, у якій група, що блокує а-аміногрупу амінокислоти або пептиду, зв'язаного з смолою, піддається елімінації, і відбувається подовження ланцюга пептиду. Твердофазовий пептидний синтез орієнтовно поділяється на метод Boc і метод Fmoc залежно від типу захисних груп.

Після синтезу потрібного пептиду може проводитися реакція деблокування або реакція відщеплення пептидного ланцюга від основи. Для реакції відщеплення пептидних ланцюгів у методі Boc застосовується HF або трифторметансульфонова кислота, а у методі Fmoc звичайно застосовується TFA. У методі Boe смолу з блокованим пептидом обробляють HF за присутності анізолу. Після цього можна проводити елімінацію захисної групи і відщеплення від основи для одержання пептиду. Після його ліофілізації одержують неочищений пептид. З іншого боку, у методі Fmoc реакцію деблокування і реакцію відщеплення пептидного ланцюга від основи можна проводити способом, аналогічним вищеописаному.

Одержаний неочищений пептид можна піддати HPLC для його виділення та очищення. При елююванні можна використовувати розчинник вода-ацетонітрил, звичайно вживаний при очищенні білків, в оптимальних умовах. Збирають фракції, що відповідають пікам на хроматограмі, а потім ліофілізують. В очищених таким чином пептидних фракціях проводиться визначення молекулярної ваги методом мас-спектроскопії, аналіз амінокислотного складу або аналіз амінокислотної послідовності для їх ідентифікації.

Конкретні приклади часткових пептидів IL-6 і часткових пептидів рецептора IL-6 розкриті у [Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 2-188600, Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 7-324097, Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 8-311098 і U.S. Patent Publication US 5210075].

Інгібування активності сигнального шляху IL-6 антагоністами IL-6 даного винаходу можна оцінити загальновідомими методами. Зокрема, вирощують культуру IL-6-залежної лінії клітин мієломи людини (S6B45, KPMM2), Т-лімфоми Леннерта KT3 або IL-6-залежних клітин HN60, BSF2, до неї додають IL-6 і водночас, за присутності антагоніста IL-6, визначають включення міченого ^{3}H-тимідину IL-6-залежними клітинами. Як альтернатива можна додавати мічений ^{125}I-IL-6 одночасно з антагоністом IL-6, а потім для оцінки визначати кількість міченого ^{125}I-IL-6, що зв'язався з експресуючими IL-6 клітинами. У цих системах визначення разом з групою, у якій присутній антагоніст IL-6, також ставлять проби на негативний контроль, що не містять антагоніста IL-6, і порівнюють результати, одержані в обох групах, для оцінки інгібування активності IL-6 антагоністом IL-6.

Як показують наведені нижче приклади, оскільки спостерігалися терапевтичні ефекти при уведенні антитіл до рецептора IL-6 дітям, що страждають на хронічний артрит, то це свідчить, що антагоністи IL-6 типу антитіл до рецептора IL-6 мають терапевтичний ефект щодо захворювань, споріднених дитячим хронічним артритним захворюванням.

Об'єктами лікування у даному винаході є ссавці. З ссавців об'єктом лікування переважно є людина.

Терапевтичні засоби за даним винаходом для захворювань, споріднених дитячим хронічним артритним захворюванням, можна призначати перорально або парентерально для системного чи місцевого застосування. Наприклад, можна обрати внутрішньовенне уведення типу краплинного вливання, внутрішньом'язове уведення, внутрішньочеревинне уведення, підшкірне уведення, свічки, клізми, таблетки з ентеросолюбільним покриттям і т.д., а дозову схему обирають з обставин залежно від віку та стану пацієнта. Ефективну дозу обирають в межах від 0,01мг до 100мг на 1кг ваги тіла за один прийом. З іншого боку, можна обрати дозу від 1 до 1000мг, переважно від 5 до 50мг, на одного пацієнта.

Більш прийнятно доза і спосіб уведення, наприклад, у випадку антитіл до рецептора IL-6, складають таку ефективну дозу, яка забезпечує вільні антитіла у крові, зокрема від 0,5мг до 40мг, переважно від 1мг до 20мг на 1кг ваги тіла за 1 місяць (4 тижні), які можна вводити за один прийом або розділити на декілька прийомів, наприклад, 2 рази на тиждень, 1 раз на тиждень, 1 раз на 2 тижні, 1 раз на 4 тижні і т.д., наприклад, внутрішньовенно, наприклад, краплинним вливанням, або підшкірно. Схему уведення можна модифікувати, подовжуючи інтервали від 2 разів на тиждень або 1 раз на тиждень до 1 разу на 2 тижні, 1 разу на 3 тижні, 1 разу на 4 тижні і т.д., залежно від спостережуваних симптомів та аналізів крові.

Терапевтичні засоби за даним винаходом для захворювань, споріднених дитячим хронічним артритним захворюванням, можуть містити фармацевтично прийнятні носії і добавки залежно від способу уведення. Приклади таких носіїв або добавок включають воду, фармацевтично прийнятні органічні розчинники, колаген, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, карбоксивінілові полімери, натрієву карбоксиметилцелюлозу, поліакрилат на-

трію, альгінат натрію, водорозчинний декстран, натрієвий карбоксиметилкрохмаль, пектин, метилцелюлозу, етилцелюлозу, ксантан, гуміарабік, казеїн, желатин, агар, дигліцерин, пропіленгліколь, поліетиленгліколь, вазелін, парафін, стеариловий спирт, стеаринову кислоту, сироватковий альбумін людини (BSA), манітол, сорбітол, лактозу, фармацевтично прийнятні детергенти і т.п. Фактично використовують добавки, обрані з вищеперелічених, не обмежуючись ними, або їх комбінації, залежно від лікарської форми.

Приклади

Даний винахід розкривається більш конкретно нижче із залученням Робочих прикладів і Контрольних прикладів, однак слід мати на увазі, що даний винахід не обмежується тільки цими прикладами.

Робочий приклад 1

Лікуванню за допомогою MRA (гуманізованого антитіла до рецептора IL-6) піддавали пацієнта (5 років, чоловічої статі) з юнацьким ревматоїдним артритом системного типу з наступною історією хвороби.

Історія хвороби до лікування

Розвивалися симптоми з підвищенням температури при розслабленні (лихоманка з одним підвищенням температури до 40°C протягом декількох днів), артралгією в обох колінах і антгемою. Після встановлення діагнозу на основі лейкоцитозу, негативного аналізу на антиядерні антитіла, негативного аналізу на ревматоїдний фактор, підвищеної швидкості осідання еритроцитів, високого рівня С-реактивного білка (CRP) і т.д. було розпочато уведення аспірину, однак не спостерігалося зменшення температури при розслабленні і артралгії, і загальний стан погіршився. Тому його замінили пероральним уведенням ударної дози стероїду (преднізолон, 30 мг/день) для більш швидкого покращення різних симптомів. Однак при поступовому зниженні дози преднізолону симптоми поновилися при 10 мг/день, пацієнт знову був госпіталізований, підданий курсу лікування метилпреднізолоном (mPSL) і плазмаферезом, а потім комбінували з циклоспорином А (CsA) без жодного поліпшення. Симптоми були тяжкими (лейкоцити 25 400/мкл, CRP 11,2мг/дл), проводили плазмаферез + курс лікування mPSL + CsA і пацієнт перейшов у стан ремісії. Як доліковування вводили преднізолон +фробен для зменшення температури при розслабленні і було клінічно відзначено зниження температури, проте пов'язані із запаленням аналізи крові залишалися високими (CRP>5мг/дл) і після виписування з лікарні періодично відзначалося підвищення температури при розслабленні, проте лікування і спостереження продовжували в основному амбулаторно. Але пацієнт почав скаржитися на болі в спині, які ускладнювалися високою температурою, і після ретельного огляду за допомогою MBI і т.д. були виявлені деструктивні пошкодження у 4-у та 5-у грудних хребцях, що свідчать про компресійні переломи. Через необхідність полегшити навантаження на грудні хребці був прописаний постільний режим на 1 рік, внаслідок чого м'язи нижніх кінцівок помітно ослабіли і ходіння стало зовсім неможливим. Була продовжена потрійна терапія: преднізолон +фробен + CsA, але CRP не зменшувався нижче 5мг/дл.

Результат лікування

Уведення почали з 2мг/кг. Оскільки не спостерігалося побічних ефектів, дозу збільшили до 4мг/кг за схемою 1 раз на тиждень. Лихоманка, що спостерігалася до цього, швидко минула, а приблизно через 2 тижні аналіз на CRP дав негативний результат. Загальне нездужання пройшло і стан пацієнта дещо покращався. Стало можливим поступове зниження дози преднізолону до 1мг/день.

Як видно з цих результатів, MRA виявився ефективним при лікуванні дитячого хронічного артритного захворювання, симптоми якого не вдавалося контролювати навіть такими нестероїдними протизапальними препаратами, як аспірин і фробен, тривалим прийманням ударних доз стероїдів (преднізолону і метилпреднізолону) і такими імунодепресантами, як циклоспорин А і метотрексат. Отже, можна стверджувати, що антагоністи IL-6, зокрема антитіла до рецептора IL-6, ефективні як терапевтичний засіб для дитячих хронічних артритних захворювань, зокрема системного типу за класифікацією ARA, системного типу за класифікацією EULAR, системного типу за класифікацією ILAR і синдрому SPRASH за класифікацією авторів даного винаходу.

Робочий приклад 2

Жінка 22 років. У квітні 1998р. виникла плямиста еритема на стегні, в ділянці серця та на пальцях, а у травні з'явилася артралгія в ділянці плеча, ліктів і колін, а також температура від 38 до 39°C. Незважаючи на приймання нестероїдних протизапальних препаратів (NSAIDs), температура залишалася високою, і у липні з показниками лейкоцитів 18 100/мкл, CRP 18,3мг/дл і феритину у сироватці 440нг/мл пацієнтці був поставлений діагноз дорослої форми хвороби Стілла. З початку січня 2000р. з'явилася температура від 39 до 40°C і артралгія, що приписали нападу дорослої форми хвороби Стілла (CRP 15,8мг/дл, феритин 205,8нг/мл).

Оскільки було складно зменшити дозу стероїдів, їх застосовували в комбінації з метотрексатом (MTX) і циклоспорином А (CsA), але це не допомогло стримати розвиток хвороби, яка утрудняла дихання, так що над пацієнткою встановили нагляд на випадок штучного дихання. Незважаючи на те, що стероїдна терапія дещо поліпшила перебіг хвороби, було розпочато лікування за допомогою гуманізованого антитіла до рецептора IL-6 внаслідок ускладнення тяжким остеопорозом. MRA (200мг) вводили шляхом краплинного внутрішньовенного вливання через кожні 2 тижні. Запальна реакція стала негативною на 6-й день після уведення, зниження дози кортикостероїдів протікало спокійно і не спостерігалося важких побічних ефектів.

Як видно з цих результатів, MRA виявився ефективним при лікуванні дорослої форми хвороби Стілла, симптоми якої не вдавалося контролювати навіть при комбінованому застосуванні MTX і CsA. Отже, можна стверджувати, що антагоністи IL-6, зокрема антитіла до рецептора IL-6, ефекти-

вні як терапевтичний засіб для хвороби Стілла, зокрема, дорослої форми хвороби Стілла.

Контрольний приклад 1. Одержання розчинного рецептора IL-6 людини

Розчинний рецептор IL-6 був одержаний методом ПЦР за допомогою плазміди pBSF2R.236, що містить кДНК, яка кодує рецептор IL-6 і одержана методом Yamasaki et al. [Yamasaki et al., Science (1988) 241, 825-828]. Плазміду pBSF2R.236 розщеплювали рестрикційним ферментом SphI, одержуючи кДНК рецептора IL-6, яку вставляли в tp18 (фірми Amersham). За допомогою синтетичного праймера, створеного для уведення стоп-кодону в кДНК рецептора IL-6, вводили мутацію в кДНК рецептора IL-6 методом ПЦР за допомогою системи мутагенезу in vitro (фірми Amersham). У такий спосіб був введений стоп-кодон у положенні амінокислоти 345 і була одержана кДНК, що кодує розчинний рецептор IL-6.

Для експресії розчинного рецептора IL-6 у клітинах CHO її лігували з плазмідою pSV (фірми Pharmacia), одержуючи плазміду pSVL344. КДНК розчинного рецептора IL-6, розщеплену ферментами HindHI-SalI, вбудовували в плазміду pECEdhfr, що містить кДНК dhfr, одержуючи плазміду pECEdhfr344 для експресії у клітинах CHO.

10мкг плазміди pECEdhfr344 трансфекували у клітини dhfr-CHO лінії DXB-11 [Urlaub G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220] методом осадження фосфатом кальцію [Chen et al., Мої. Cell. Biol. (1987) 7, 2745-2751]. Трансфековані клітини CHO культивували протягом 3 тижнів у позбавленому нуклеозидів селективному середовищі aMEM, що містить 1мМ глутаміну, 10% діалізованої FCS, пеніцилін і стрептоміцин (по 100од./мл).

Клітини CHO, що пройшли селекцію, скринували методом граничного розбавлення до одержання одиничного клону клітин CHO. Клон клітин CHO вирощували за присутності 20-200нМ метотрексату для виділення лінії 5E27 клітин CHO, що продукує розчинний рецептор IL-6 людини. Клітини CHO лінії 5E27 культивували у модифікованому Iscov середовищі Дюльбекко (IMDM, фірми Gibco) з додаванням 5% FCS. Збирали супернатант культури і визначали у ньому концентрацію розчинного рецептора IL-6 методом ELISA. Результати підтвердили присутність розчинного рецептора IL-6 у супернатанті культури.

Контрольний приклад 2. Одержання антитіла до IL-6 людини

Для імунізації мишей BALB/c використовували 10мкг IL-6 тканинного типу [Hirano et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41] разом з повним ад'ювантом Фрейнда, повторюючи імунізацію кожного тижня доти, поки не виявлялися антитіла до IL-6 у сироватці. Імунні клітини виділяли з місцевих лімфатичних вузлів і зливали з клітинами мієломи лінії P3U1 за допомогою поліетиленгліколю 1500. Селекцію гібридом проводили за методом Oi et al. [Selective Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980], використовуючи культуральне середовище HAT, щоб одержати гібридому, що продукує антитіла до IL-6 людини.

Гібридому, що продукує антитіла до IL-6 людини, піддавали аналізу на зв'язування IL-6 наступним чином. Так, мікропланшет на 96 лунок (фірми Dynatech Laboratories Inc., Alexandria, VA) з гнучкого полівінілу покривали протягом ночі 100мкл козиних антитіл проти IgG миші (10мкг/мл, фірми Cooper Biomedical Inc., Malvern, PA) у 0,1М бікарбонатному буфері (pH 9,6) при 4°C. Потім планшет обробляли 100мкл PBS, що містить 1% бичачого сироваткового альбуміну (BSA), при кімнатній температурі протягом 2 годин.

Після відмивання планшета PBS у кожну лунку додавали 100мкл супернатанту культури гібридоми і інкубували протягом ночі при 4°C. Після відмивання планшета у кожну лунку додавали мічений I-IL-6 рекомбінантного типу до 2000срт/0,5нг/лунку і після відмивання вимірювали радіоактивність у кожній лунці на гамма-лічильнику [Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA]. З 216 клонів гібридоми 32 клона були позитивними при аналізі на зв'язування IL-6. Нарешті, з цих клонів був відібраний стабільний клон MH166.BSF2. Антитіло MH166 до IL-6 належить до підтипу к-IgGl.

Потім за допомогою IL-6-залежного клону MH60.BSF2 гібридоми миші досліджували нейтралізуючу активність антитіла MH166 щодо зростання гібридоми. Клітини MH60.BSF2 поділяли на порції по $1x10^4$/200мкл/лунку, до них додавали зразок, що містить антитіло MH166, і культивували протягом 48 годин. Після додавання 0,5мкКі/лунку ^{3}H-тимідину (New England Nuclear, Boston, MA) культивування продовжували ще 6 годин. Клітини поміщали на скловолоконний фільтр і піддавали обробці на автоматичному маніпуляторі (Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan). Як контроль використовували кроляче антитіло до IL-6.

Результати показали, що антитіло MH166 інгібувало індуковане IL-6 включення ^{3}H-тимідину клітинами MH60.BSF2 дозозалежним чином. Це свідчить, що антитіло MH166 нейтралізує активність IL-6.

Контрольний приклад 3. Одержання антитіла до рецептора IL-6 людини

Антитіло MT18 до рецептора IL-6, одержане за методом Hirata et al. [Hirata Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906], кон'югували з CNBr-активованою сефарозою 4B (фірми Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) для очистка рецептора IL-6 [Yamasaki et al., Science (1988) 241, 825-828]. Клітини мієломи людини лінії U266 солюбілізували в дигітоніновому буфері, що містить 1% дигітоніну (фірми Walco Pure Chemicals), 1мМ параамінофенілметансульфонілфториду гідрохлориду (фірми Wako Pure Chemicals), 10мМ триетаноламіну (pH 7,8) і 0,15 М NaCl, і змішували з антитілом MT18, кон'югованим з бусинами сефарози 4B. Після цього бусини промивали 6 разів дигітоніновим буфером перед виділенням частково очищеного рецептора IL-6.

Мишей BALB/c імунізували цим частково очищеним рецептором IL-6, одержаним з $3x10^9$ клітин U266, чотири рази через кожні 10 днів, а потім одержували гібридому стандартним методом. Супернатанти культури гібридоми з позитивних по

зростанню лунок аналізували на активність зв'язування рецептора IL-6 наступним чином. 5x10^7 клітин U266 мітили ^{35}8-метіоніном (2,5мКі) і солюбілізували у дигітоніновому буфері. Солюбілізовані клітини U266 змішували з 0,04мл антитіла MT18, кон'югованого з бусинами сефарози 4B, а потім промивали 6 разів дигітоніновим буфером. Мічений ^{35}8-метіоніном рецептор IL-6 елюювали за допомогою 0,25 мл дигітонінового буфера (pH 3,4) і нейтралізували за допомогою 0,025мл 1M трис, pH 7,4.

0,05мл супернатанту культури гібридоми змішували з 0,01мл білок G-сефарози (фірми Pharmacia). Після відмивання сефарозу інкубували з 0,005мл розчину міченого ^{35}8-метіоніном рецептора IL-6. Речовини, що випали при імунопреципітації, аналізували методом SDS-PAGE для виявлення супернатанту культури гібридоми, який реагує з рецептором IL-6. В результаті цього був встановлений позитивний клон гібридоми PM-1. Антитіло, одержане з гібридоми PM-1, належить до підтипу к-IgGl.

Активність антитіла, який виробляється гібридомою PM-1, в інгібуванні зв'язування IL-6 з рецептором IL-6 оцінювали за допомогою клітин мієломи людини лінії U266. Рекомбінантний IL-6 людини одержували з E. coli [Hirano et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41-45] і мітили ^{125}I за допомогою реактиву Болтона-Хантера [New England Nuclear, Boston, MA, Taga et al., J. Exp. Med. (1987)166,967-981].

4x10^5 клітин U266 культивували за присутності 70% (V/V) супернатанту культури гібридоми PM-1 і 14000срт міченого ^{125}I-IL-6 протягом 1 години. Відбирали 70мкл і нашаровували на 300мкл FCS в поліетиленовій мікроцентрифугувальній пробірці на 400мкл, центрифугували, а потім визначали радіоактивність клітин.

Результати засвідчили, що антитіло, яке виробляється гібридомою PM-1, інгібує зв'язування IL-6 з рецептором IL-6.

Контрольний приклад 4. Одержання антитіла до рецептора IL-6 миші

Моноклональне антитіло до рецептора IL-6 миші одержували за [методом Saito T. et al., J. Immunol. (1991) 147, 168-173].

Клітини CHO, що виробляють розчинний рецептор IL-6 миші, культивували у середовищі IMDM з додаванням 10% FCS. З супернатанту культури очищали розчинний рецептор IL-6 миші на колонці для афінної хроматографії, у якій антитіло RS12 [див. вище Saito T. et al.] до рецептора IL-6 миші було імобілізоване у гелі Affigel 10 (фірми BioRad).

50мкг одержаного при цьому розчинного рецептора IL-6 миші змішували з повним ад'ювантом Фрейнда і вводили внутрішньочеревинно пацюкам Вістар. Через 2 тижні пацюки одержували підкріплювальну імунізацію з неповним ад'ювантом Фрейнда. На 45-й день виймали клітини селезінки і 2x10 клітин піддавали злиттю з 1x10 клітин мієломи миші лінії P3U1 стандартним методом за допомогою 50% PEG 1500 (фірми Boehringer Mannheim), а потім скринували гібридому в середовищі HAT.

Після нанесення супернатанту культури на планшет, покритий кролячим антитілом проти IgG пацюків (фірми Сарреї), проводили реакцію з розчинним рецептором IL-6 миші. Потім проводили скринування гібридом, виробляючих антитіла до розчинного рецептора IL-6 миші, методом ELISA із застосуванням кролячого антитіла до рецептора IL-6 миші та міченого лужною фосфатазою овечого антитіла проти IgG кролика. Клони гібридоми, у яких була підтверджена продукція антитіл, піддавали повторному скринуванню ще 2 рази для одержання одиночного клону гібридоми. Цей клон одержав позначення MR16-1.

Нейтралізуючу активність антитіла, що виробляється цією гібридомою, щодо передачі сигналу IL-6 миші досліджували по включенню ^{3}H-тимідину клітинами MH60.BSF2 [Matsuda T. et al., J. Immunol. (1988) 18, 951-956]. На 96-лунковий планшет наносили клітини MH60.BSF2 по 1 x 10^4 клітин/200 мкл/лунку. У цей планшет додавали 10нг/мл мишачого IL-6 і антитіло MR16-1 або RS12 у кількості від 12,3 до 1000нг/мл і культивували при 37°C у 5% CCb протягом 44 годин, після чого додавали 1 мкКі/лунку ^{3}H-тимідину. Через 4 години вимірювали включення ^{3}H-тимідину. Результати показали, що антитіло MR 16-1 інгібувало включення H-тимідину клітинами MH60.BSF2.

Таким чином, було показано, що антитіло, яке виробляється гібридомою MR 16-1 (FERM BP-5874), інгібує зв'язування IL-6 з рецептором IL-6.

Комп'ютерна верстка В. Клюкін Підписне Тираж 26 прим.

Міністерство освіти і науки України

Державний департамент інтелектуальної власності, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601