



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ(21)(22) Заявка: **2009131747/15**, **23.01.2008**(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.01.2008

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
23.01.2007 JP 2007-012572(43) Дата публикации заявки: **27.02.2011** Бюл. № 6(45) Опубликовано: **20.05.2012** Бюл. № 14(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: **WO 2004007701 A1, 22.01.2004.**

С.В.Скуркович и др. Антицитокиновая терапия - новый подход к лечению аутоиммунных заболеваний и цитокиновых нарушений. - Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии, 2003, т.2, №4, с.75, с.77. Nimesh S.A.Patel et al. Endogenous Interleukin-6 Enhances the Renal Injury, Dysfunction, and Inflammation (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: **24.08.2009**(86) Заявка РСТ:
JP 2008/050842 (23.01.2008)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2008/090901 (31.07.2008)

Адрес для переписки:

**129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной, рег.№ 517**

(72) Автор(ы):

**ТАКАХАСИ Масафуми (JP),
ИЗАВА Ацуси (JP)**

(73) Патентообладатель(и):

**СИНСУ ЮНИВЕРСИТИ (JP),
ЧУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ КАЙСЯ (JP)**

RU 2 450 829 C2

RU 2 450 829 C2

(54) ИНГИБИТОР ХРОНИЧЕСКОГО ОТТОРЖЕНИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области медицины. Средство для подавления хронической реакции отторжения содержит в качестве активного ингредиента моноклональное антитело, которое распознает рецептор IL-6 и ингибирует связывание IL-6 с

рецептором IL-6. Изобретение относится также к способу подавления хронической реакции отторжения и к применению для получения средства. Изобретение обеспечивает избирательность действия, меньшие побочные эффекты. 3 н. и 15 з.п. ф-лы, 2 ил.

(56) (продолжение):

Caused by Ischemia/Reperfusion, March 2005, v.312, №3. Michael D.Duncan et al. Transplant-related Immunosuppression. The Proceedings of the American Thoracic Society 2:449-455 (2005).

R U 2 4 5 0 8 2 9 C 2

R U 2 4 5 0 8 2 9 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2009131747/15, 23.01.2008**

(24) Effective date for property rights:
23.01.2008

Priority:

(30) Convention priority:
23.01.2007 JP 2007-012572

(43) Application published: **27.02.2011 Bull. 6**

(45) Date of publication: **20.05.2012 Bull. 14**

(85) Commencement of national phase: **24.08.2009**

(86) PCT application:
JP 2008/050842 (23.01.2008)

(87) PCT publication:
WO 2008/090901 (31.07.2008)

Mail address:

**129090, Moskva, ul. B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. E.E.Nazinoj, reg.№ 517**

(72) Inventor(s):

**TAKAKhASI Masafumi (JP),
IZAVA Atsusi (JP)**

(73) Proprietor(s):

**SINSU JuNIVERSITI (JP),
ChUGAI SEJJaKU KABUSIKI KAJSJa (JP)**

(54) **CHRONIC REJECTION INHIBITOR**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: group of inventions refers to medicine. An agent for chronic rejection inhibition contains as an active ingredient a monoclonal antibody which identifies IL-6 receptor and inhibits

IL-6 binding with IL-6 receptor. The invention also concerns a method of chronic rejection inhibition and applying for preparing the agent.

EFFECT: invention provides action selectivity, smaller side effects.

18 cl, 2 dwg

R U 2 4 5 0 8 2 9 C 2

R U 2 4 5 0 8 2 9 C 2

Область техники

Настоящее изобретение относится к средствам для подавления реакции хронического отторжения, которые содержат ингибитор ИЛ-6 в качестве активного ингредиента, и их применениям. Настоящее изобретение также относится к способам подавления реакции хронического отторжения, которые включают стадию введения реципиентам ингибитора ИЛ-6.

Предпосылки изобретения

ИЛ-6 является цитокином, который также называют В-клеточным стимулирующим фактором 2 (BSF2) или интерфероном $\beta 2$. ИЛ-6 был открыт как фактор дифференцировки, вовлеченный в активацию В-клеточных лимфоцитов (непатентный документ 1), а позднее было выявлено, что он является многофункциональным цитокином, который влияет на функции различных клеток (непатентный документ 2). Было опубликовано, что ИЛ-6 вызывает созревание Т-лимфоцитов (непатентный документ 3).

Биологическая активность ИЛ-6 передается через два типа белков на клетках. Первый представляет собой рецептор ИЛ-6, являющийся лиганд-связывающим белком с молекулярным весом примерно 80 кДа, с которым связывается ИЛ-6 (непатентные документы 4 и 5). В клетке рецептор ИЛ-6 присутствует в мембраносвязанной форме, которая проникает в клеточную мембрану и экспрессирована на ней, а также присутствует в виде растворимого рецептора ИЛ-6, состоящего главным образом из внеклеточной области мембраносвязанной формы.

Другим типом белка является мембранный белок gp130, который имеет молекулярный вес около 130 кДа и участвует в сигнальной трансдукции без связывания с лигандом. Передача биологической активности ИЛ-6 в клетку происходит через образование комплекса ИЛ-6 с рецептором ИЛ-6 с последующим связыванием комплекса с gp130 (непатентный документ 6).

Ингибиторы ИЛ-6 представляют собой вещества, которые ингибируют передачу биологической активности ИЛ-6. На сегодняшний день известные ингибиторы ИЛ-6 включают антитела против ИЛ-6 (антитела к ИЛ-6), антитела против рецептора ИЛ-6 (антитела к рецептору ИЛ-6), антитела против gp130 (антитела к gp130), варианты ИЛ-6, частичные пептиды ИЛ-6 или рецептора ИЛ-6, и т.п.

Было опубликовано несколько сообщений, касающихся антител к рецептору ИЛ-6 (непатентные документы 7 и 8, и патентные документы 1-3). В одном таком сообщении подробно описано гуманизованное антитело РМ-1, которое получают переносом в антитело человека определяющей комплементарности области (CDR) мышинового антитела РМ-1 (непатентный документ 9), являющегося антителом к рецептору ИЛ-6 (патентный документ 4).

Благодаря достигнутым успехам в мультилекарственной терапии и применению в клинической практике различных иммуносупрессантов, терапевтические схемы при острой реакции отторжения после трансплантации органов уже практически установлены, а продолжительность времени выживания после трансплантации различных органов значительно превышает 1 год. Однако хроническая реакция отторжения, которая вызывает проблемы через год после трансплантации, возникает даже в тех клинических случаях, когда острая реакция отторжения была купирована стандартной иммуносупрессивной терапией, и в тех случаях, когда терапию проводили в течение длительного периода времени. Таким образом, в отношении хронической реакции отторжения на сегодняшний день не установлено ни профилактических, ни терапевтических способов лечения. Кроме того, механизм,

лежащий в основе этого патологического состояния, полностью не описан, и его диагностика затруднена по сравнению с острой реакцией отторжения. Таким образом известно, что хроническая реакция отторжения является осложнением, влияющим на отдаленные прогнозы у реципиентов (непатентные документы 10 и 11).

Известные патологические признаки, характерные для хронической реакции отторжения, включают фиброз интерстиции и сужение просветов вследствие утолщения интимы просветных тканей в трансплантированных органах. В частности, важным патологическим признаком является **ангиостеноз**, называемый посттрансплантационным поражением сосудов или посттрансплантационным артериосклерозом. Полагают, что на развитие патологического состояния комплексно влияют различные факторы, как, например, продолжение реакции отторжения в результате действия клеточного и гуморального иммунитета, ишемически-реперфузионные нарушения органов, функциональные нарушения сосудистого эндотелия, общие факторы риска при артериосклерозе (диабет, гиперлипидемия, гипертония и т.п.) у реципиентов, побочные эффекты иммуносупрессантов, генетические факторы и посттрансплантационное заражение цитомегаловирусом (непатентные документы 12 и 13).

Среди существующих фармацевтических средств ингибиторы кальцинеурина, такие как, в частности, циклоспорин и такролимус, являются неэффективными в отношении хронической реакции отторжения, а их побочные эффекты, такие как гипертония, гиперлипидемия и диабет, считаются проблематичными. Кроме того, после трансплантации требуется, в частности, для детей продолжительная иммуносупрессивная терапия. Поэтому ожидалась разработка фармацевтических средств, эффективных в отношении хронической реакции отторжения и имеющих незначительные побочные эффекты (непатентные документы 13 и 14).

Описанная выше необходимость разработки новой иммуносупрессивной терапии для подавления хронической реакции отторжения является предпосылкой настоящего исследования.

Документы предшествующего уровня настоящего изобретения описаны ниже.

[Патентный документ 1] Публикация международной патентной заявки № WO 95/09873

[Патентный документ 2] Патентная заявка Франции № FR 2694767

[Патентный документ 3] Патент США № 5216128

[Патентный документ 4] WO 92/19759

[Непатентный документ 1] Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76

[Непатентный документ 2] Akira, S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78

[Непатентный документ 3] Lotz, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258

[Непатентный документ 4] Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981

[Непатентный документ 5] Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828

[Непатентный документ 6] Taga, T. et al., Cell (1989) 58, 573-581

[Непатентный документ 7] Novick, D. et al., Hybridoma (1991) 10, 137-146

[Непатентный документ 8] Huang, Y. W. et al., Hybridoma (1993) 12, 621-630

[Непатентный документ 9] Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906

[Непатентный документ 10] Wong, B. W. et al., Cardiovasc. Pathol. (2005) 14, 176-80

[Непатентный документ 11] Hornick, P. et al., Methods Mol. Biol. (2006) 333, 131-44

[Непатентный документ 12] Ramzy, D. et al., Can. J. Surg., (2005) 48, 319-327

[Непатентный документ 13] Valantine, H., J. Heart Lung Transplant (2004) 23(5 Suppl), S187-93

[Непатентный документ 14] Webber, S. A. et al., Lancet (2006) 368, 53-69

[Непатентный документ 15] Izawa, A., et al., Circ. J. (2007) 71(Suppl I), 392 (Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Kobe, Mar 15-Mar 17, 2007; Abstract PE-269)

5 [Непатентный документ 16] Izawa, A., et al., Am. J. Transplant. (2007) 7 (Suppl 11), 426 (American Transplant Congress, San Francisco, CA, Mar 5-Mar 9, 2007; Abstract 1084)

Описание изобретения

[Проблемы, решаемые изобретением]

10 Настоящее изобретение было выполнено при условиях, описанных выше. Целью настоящего изобретения является предоставление средств для подавления хронической реакции отторжения, которые содержат ингибитор IL-6 в качестве активных ингредиентов.

15 Дополнительной целью настоящего изобретения является предоставление способов подавления хронической реакции отторжения, которые включают стадию введения субъектам ингибитора IL-6.

[Средства решения проблем]

20 Для достижения описанных выше целей авторы изобретения проводили исследование антител к рецептору IL-6 в отношении их эффекта подавления хронической реакции отторжения.

25 Авторы изобретения оценивали эффект подавления хронической реакции отторжения при введении антител к рецептору IL-6 мыши (MR16-1), используя для этого мышиную модель хронического отторжения после трансплантации сердца. В результате гистопатологического анализа трансплантированных сердец, удаленных через 60 дней после трансплантации, было выявлено, что фиброз миокарда и стенотические поражения сосудов, являющиеся патологическими состояниями, характерными для хронической реакции отторжения, были значительно подавлены у

30 группы, получавшей MR16-1, по сравнению с контрольной группой. Таким образом, было продемонстрировано, что MR16-1 обладает эффектом подавления хронической реакции отторжения.

35 Таким образом, авторы впервые обнаружили, что введение антител к рецептору IL-6 подавляет реакцию отторжения в хронической фазе после трансплантации органов, и, таким образом, изобретение было завершено.

Более конкретно, настоящее изобретение касается следующего:

[1] средства для подавления хронической реакции отторжения, которое содержит ингибитор IL-6 в качестве активного ингредиента;

40 [2] средства для подавления хронической реакции отторжения по п.[1], в котором ингибитор IL-6 представляет собой антитело, распознающее IL-6;

[3] средства для подавления хронической реакции отторжения по п.[1], в котором ингибитор IL-6 представляет собой антитело, распознающее рецептор IL-6;

45 [4] средства для подавления хронической реакции отторжения по пп.[2] или [3], в котором антитело представляет собой моноклональное антитело;

[5] средства для подавления хронической реакции отторжения по пп.[2] или [3], в котором антитело представляет собой антитело, распознающее IL-6 человека или рецептор IL-6 человека;

50 [6] средства для подавления хронической реакции отторжения по пп.[2] или [3], в котором антитело представляет собой рекомбинантное антитело;

[7] средства для подавления хронической реакции отторжения по любому из пп.[2]-[6], в котором антитело представляет собой химерное, гуманизированное антитело

или антитело человека;

[8] средства для подавления хронической реакции отторжения по любому из пп.[1]-[7], которое используют для подавления хронической реакции отторжения при трансплантации сердца;

[9] способа подавления хронической реакции отторжения, который включает стадию введения субъекту ингибитора ПЛ-6;

[10] способа по п.[9], в котором ингибитор ПЛ-6 представляет собой антитело, распознающее ПЛ-6;

[11] способа по п.[9], в котором ингибитор ПЛ-6 представляет собой антитело, распознающее рецептор ПЛ-6;

[12] способа по пп.[10] или [11], в котором антитело представляет собой моноклональное антитело;

[13] способа по пп.[10] или [11], в котором антитело представляет собой антитело, распознающее ПЛ-6 человека или рецептор ПЛ-6 человека;

[14] способа по пп.[10] или [11], в котором антитело представляет собой рекомбинантное антитело;

[15] способа по любому из пп.[10]-[14], в котором антитело представляет собой химерное, гуманизированное антитело или антитело человека;

[16] способа по любому из пп.[9]-[15], который подавляет хроническую реакцию отторжения при трансплантации сердца;

[17] применения ингибитора ПЛ-6 при получении средства, подавляющего хроническую реакцию отторжения;

[18] применения по п.[17], в котором ингибитор ПЛ-6 представляет собой антитело, распознающее ПЛ-6;

[19] применения по п.[17], в котором ингибитор ПЛ-6 представляет собой антитело, распознающее рецептор ПЛ-6;

[20] применения по пп.[18] или [19], в котором антитело представляет собой моноклональное антитело;

[21] применения по пп.[18] или [19], в котором антитело представляет собой антитело, распознающее ПЛ-6 человека или рецептор ПЛ-6 человека;

[22] применения по пп.[18] или [19], в котором антитело представляет собой рекомбинантное антитело;

[23] применения по любому из пп.[18]-[22], в котором антитело представляет собой химерное, гуманизированное антитело или антитело человека; и

[24] ингибитора ПЛ-6 для применения при подавлении хронической реакции отторжения.

Способ осуществления изобретения

Авторы изобретения обнаружили, что введение антител к рецептору ПЛ-6 может подавлять хроническую реакцию отторжения. Настоящее изобретение основано на этом открытии.

Настоящее изобретение относится к средствам для подавления хронической реакции отторжения, которые содержат в качестве активного ингредиента ингибитор ПЛ-6.

В настоящем описании «ингибитор ПЛ-6» представляет собой вещество, которое блокирует опосредуемую ПЛ-6 сигнальную трансдукцию и ингибирует биологическую активность ПЛ-6. Предпочтительным ингибитором ПЛ-6 является вещество, которое ингибирует связывание ПЛ-6, рецептора ПЛ-6 или gp130.

Ингибиторы ПЛ-6 по настоящему изобретению включают, но не ограничены, например, антитела к ПЛ-6, антитела к рецептору ПЛ-6, антитела к gp130, варианты ПЛ-6,

растворимые варианты рецептора IL-6 и частичные пептиды IL-6 или рецептора IL-6, и низкомолекулярные соединения и белки (например, C326 Avimer (Nature Biotechnology (2005) 23, 1556-61)), для которых показана аналогичная активность.

Предпочтительные ингибиторы IL-6 по настоящему изобретению включают антитела, узнающие рецепторы IL-6.

В настоящем изобретении источник антител особо не ограничен; однако, предпочтительно, чтобы антитела были получены от млекопитающих, или, более предпочтительно, были получены от человека.

Антитела к IL-6, используемые в настоящем изобретении, можно получить в виде поликлональных или моноклональных антител с использованием известных способов. В частности, в настоящем изобретении в качестве антител к IL-6 предпочтительно использовать моноклональные антитела, полученные от млекопитающих.

Моноклональные антитела, полученные от млекопитающих, включают антитела, полученные из гибридом, и антитела, полученные генно-инженерными способами из хозяев, трансформированных экспрессионным вектором, который содержит ген антитела. Связывая IL-6, антитело ингибирует связывание IL-6 с рецептором IL-6, и, таким образом, блокирует передачу биологической активности IL-6 в клетку.

Такие антитела включают антитела MH166 (Matsuda, T. *et al.*, Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956), антитело SK2 (Sato, K. *et al.*, transaction of the 21st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (1991) 21, 166) и т.п.

Главным образом, гибридомы, продуцирующие антитела к IL-6, можно получить с использованием известных методик, как описано ниже: а именно, такие гибридомы можно получить, используя IL-6 в качестве сенсibilизирующего антигена для проведения иммунизации с помощью обычного способа иммунизации, далее осуществляя слияние полученных иммунных клеток с известными родительскими клетками обычным способом слияния клеток, и проводя скрининг на клетки, продуцирующие моноклональные антитела с помощью обычного способа скрининга.

Конкретнее, антитела к IL-6 можно получить, как описано ниже: например, IL-6 человека для использования в качестве сенсibilизирующего антигена при получении антител можно получить, используя ген и/или аминокислотные последовательности IL-6, раскрытые в Eur. J. Biochem. (1987) 168, 543-550; J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541; и/или Agr. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688.

После трансформации подходящей клетки-хозяина известной экспрессионной векторной системой, в которую встроена последовательность гена IL-6, проводят с помощью известных способов очистку целевого белка IL-6 из содержимого клеток-хозяев или из культурального супернатанта. Этот очищенный белок IL-6 можно использовать в качестве сенсibilизирующего антигена. В альтернативном варианте в качестве сенсibilизирующего антигена можно использовать слитый белок, состоящий из белка IL-6 и другого белка.

Антитела к рецептору IL-6, используемые в настоящем изобретении, можно получить в виде поликлональных или моноклональных антител с помощью известных способов. В частности, в настоящем изобретении в качестве антител к рецептору IL-6 предпочтительно использовать моноклональные антитела, полученные от млекопитающих. Моноклональные антитела, полученные от млекопитающих, включают антитела, полученные из гибридом, и антитела, полученные генно-инженерными способами из хозяев, трансформированных экспрессионным вектором, который содержит ген антитела. Связывая рецептор IL-6, антитело ингибирует связывание IL-6 с рецептором IL-6, и, таким образом, блокирует передачу

биологической активности IL-6 в клетку.

Такие антитела включают: антитело MR16-1 (Tamura, T. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924-11928); антитело PM-1 (Hirata, Y. *et al.*, J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906); антитело AUK12-20, антитело AUK64-7 и антитело AUK146-15 (Публикация
5 международная патентная заявка № WO 92/19759) и т.п. Из этих антител PM-1 может представлять собой пример предпочтительного моноклонального антитела против рецептора IL-6 человека, а MR16-1 - пример предпочтительного моноклонального антитела против рецептора IL-6 мыши.

В общем, гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к рецептору IL-6, можно получить с помощью известных методик, как описано ниже: а именно, такие гибридомы можно получить, используя рецептор IL-6 в качестве сенсибилизирующего антигена для проведения иммунизации с помощью обычного способа иммунизации,
10 далее осуществляя слияние полученных иммунных клеток с известными родительскими клетками обычным способом слияния клеток, и проводя скрининг на клетки, продуцирующие моноклональные антитела, с помощью обычного способа скрининга.

Более конкретно, антитела к рецептору IL-6 можно получить, как описано ниже: например, рецептор IL-6 человека или рецептор IL-6 мыши для использования в качестве сенсибилизирующего антигена при получении антител можно получить, используя гены и/или аминокислотные последовательности рецепторов IL-6,
15 раскрытые в публикации европейской патентной заявки № EP 325474 и в публикации японской патентной заявки Кокай № (JP-A) H03-155795 (нерассмотренная, опубликованная японская патентная заявка), соответственно.

Существует два типа белков-рецепторов IL-6: один, экспрессированный на клеточной мембране, а другой - не прикрепленный к клеточной мембране (растворимые рецепторы IL-6) (Yasukawa, K. *et al.*, J. Biochem. (1990) 108, 673-676).

Растворимый рецептор IL-6 состоит преимущественно из внеклеточной области связанного с клеточной мембраной рецептора IL-6 и отличается от мембраносвязанного рецептора IL-6 тем, что у него отсутствуют трансмембранная область или и трансмембранная, и внутриклеточная области. В качестве белка-рецептора IL-6 можно использовать любой рецептор IL-6, если его можно взять в качестве сенсибилизирующего антигена для получения антител к рецептору IL-6,
20 используемых в настоящем изобретении.

После трансформации подходящей клетки-хозяина известной экспрессионной векторной системой, в которую встроена последовательность гена рецептора IL-6, с помощью известного способа проводят очистку целевого белка рецептора IL-6 из
25 содержимого клеток-хозяев или из культурального супернатанта. Этот очищенный белок рецептор IL-6 можно использовать в качестве сенсибилизирующего антигена. В альтернативном варианте в качестве сенсибилизирующего антигена можно использовать клетку, экспрессирующую рецептор IL-6, или слитый белок, состоящий из белка-рецептора IL-6 и другого белка.

Антитела к gp130, используемые в настоящем изобретении, можно получить в виде поликлональных или моноклональных антител с помощью известных способов. В частности, в настоящем изобретении в качестве антител к gp130 предпочтительно
30 использовать моноклональные антитела, полученные от млекопитающих. Моноклональные антитела, полученные от млекопитающих, включают антитела, полученные из гибридом, и антитела, полученные генно-инженерными способами из хозяев, трансформированных экспрессионным вектором, который содержит ген

антитела. Связывая gp130, антитело ингибирует связывание gp130 с комплексом IL-6 и рецептора IL-6, и, таким образом, блокирует передачу биологической активности IL-6 в клетку.

5 Такие антитела включают: антитело AM64 (JP-A (Kokai) H03-219894), антитело 4B11 и антитело 2H4 (US 5571513), антитело B-S12 и антитело B-P8 (JP-A (Kokai) H08-291199) и т.п.

10 Главным образом, гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела к gp130, можно получить с помощью известных методик, как описано ниже: а именно, такие гибридомы можно получить, используя gp130 в качестве сенсibiliзирующего антигена для проведения иммунизации с помощью обычного способа иммунизации, далее осуществляя слияние полученных иммунных клеток с известными родительскими клетками обычным способом слияния клеток, и проводя скрининг на клетки, продуцирующие моноклональные антитела, с помощью обычного способа скрининга.

15 Конкретнее, моноклональные антитела можно получить, как описано ниже: например, gp130 для использования в качестве сенсibiliзирующего антигена при получении антител можно получить, используя ген и/или аминокислотную последовательность gp130, раскрытые в публикации европейской патентной заявки № EP 411946.

20 После трансформации подходящей клетки-хозяина известной экспрессионной векторной системой, в которую встроена последовательность гена gp130, с помощью известного способа проводят очистку целевого белка gp130 из содержимого клеток-хозяев или из культурального супернатанта. Этот очищенный белок gp130 можно использовать в качестве сенсibiliзирующего антигена. В альтернативном варианте в качестве сенсibiliзирующего антигена можно использовать клетку, экспрессирующую gp130, или слитый белок, состоящий из белка gp130 и другого белка.

30 Выбор млекопитающих животных для иммунизации сенсibiliзирующим антигеном конкретно не ограничен, но предпочтительно выбирать млекопитающее с учетом совместимости его В-клеток с родительской клеткой, используемой при слиянии клеток. Обычно используют грызунов, таких как мыши, крысы и хомячки.

35 Иммунизацию животных сенсibiliзирующими антигенами проводят известными способами. Например, в качестве общего способа, животных иммунизируют внутрибрюшинной или подкожной инъекцией сенсibiliзирующего антигена. А именно, предпочтительно разводить или ресуспендировать сенсibiliзирующий антиген в соответствующем количестве фосфатного буфера (PBS), физиологического раствора или аналогичного раствора, смешанного с соответствующим количеством обычного адьюванта (например, полного адьюванта Фрейнда), эмульгировать и затем вводить млекопитающему несколько раз, через интервалы от 4 до 21 дней. В дополнение, для иммунизации сенсibiliзирующим антигеном можно использовать подходящий носитель.

45 После иммунизации подтверждают повышенный уровень целевого антитела в сыворотке, а затем получают от млекопитающего иммунные клетки для слияния клеток. Предпочтительные иммунные клетки для слияния включают, в частности, клетки селезенки.

50 Клетки миеломы млекопитающих, используемые в качестве родительских клеток, т.е. в качестве клеток-партнеров для слияния с полученными иммунными клетками, включают различные известные клеточные штаммы, например, P3X63Ag8.653 (Kearney, J. F. *et al.*, J. Immunol (1979) 123, 1548-1550), P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology

and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, D. H. *et al.*, Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. *et al.*, Nature (1978) 276, 269-270), F0 (de St. Groth, S. F. *et al.*, J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21), S194 (Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323), R210 (Galfre, G. *et al.*, Nature (1979) 277, 131-133) и т.п.

В общем, слияние вышеупомянутых иммунных клеток и миеломных клеток можно осуществить, используя известные способы, например способ Milstein *et al.* (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) и т.п.

Более конкретно, вышеупомянутое слияние клеток проводят в обычной питательной культуральной среде в присутствии средства, усиливающего слияние клеток. Например, в качестве средств, усиливающих слияние клеток, используют полиэтиленгликоль (ПЭГ), вирус Сендай (HVJ) и т.п. Кроме того, при необходимости, для увеличения специфичности слияния можно добавить вспомогательные средства, такие как диметилсульфоксид.

Используемое соотношение иммунных клеток к миеломным, предпочтительно, составляет, например, от 1 до 10 иммунных клеток на каждую миеломную клетку. Для вышеупомянутого слияния клеток используют культуральную среду, например RPMI1640 или MEM, которая подходит для пролиферации вышеупомянутых миеломных клеток. Также можно использовать обычную культуральную среду, используемую для культивирования этого типа клеток. Кроме того, вместе со средой можно использовать различные сывороточные добавки, такие как фетальная телячья сыворотка (FCS).

При слиянии клеток представляющие интерес слитые клетки (гибридомы) образуются при смешивании определенных количеств вышеупомянутых иммунных клеток и миеломных клеток в вышеупомянутой культуральной среде, а затем добавлении и смешивании до концентрации от 30% до 60% (вес/объем) раствор ПЭГ (например, раствор ПЭГ со средним молекулярным весом примерно от 1000 до 6000), нагретого до примерно 37°C. Затем можно удалить средства для клеточного слияния и т.п., которые не подходят для роста гибридом, добавляя несколько раз подходящую культуральную среду, а затем удаляя супернатант центрифугированием.

Вышеуказанные гибридомы отбирают, культивируя клетки в обычной культуральной среде для селекции, например культуральной среде НАТ (культуральной среде, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин). Культивирование в культуральной среде НАТ продолжают в течение достаточного периода времени, обычно от нескольких дней до нескольких недель, для того, чтобы уничтожить клетки (неслитые клетки), отличные от представляющих интерес гибридом. Затем с помощью стандартного метода предельных разведений проводят скрининг и клонирование гибридом, продуцирующих представляющие интерес антитела.

Помимо способов иммунизации животных (кроме человека) антигенами, для того чтобы получить вышеупомянутые гибридомы, целевые антитела человека, связывающие целевой антиген или антиген-экспрессирующую клетку, можно получить сенсibilизацией лимфоцитов человека целевым антигенным белком или антиген-экспрессирующей клеткой *in vitro*, и слиянием сенсibilизированного В-лимфоцита с клеткой миеломы человека (например, U266) (смотри публикацию японской патентной заявки (Кокосу) № (JP-B) H01-59878 (рассмотренная, одобренная японская патентная заявка, опубликованная для опротестования)). Кроме того, целевое антитело человека можно получить введением антигена или антиген-экспрессирующей клетки

трансгенному животному, которое имеет репертуар генов антител человека, и затем следуя вышеупомянутому способу (смотри публикации международных патентных заявок №№ WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 и WO 96/33735).

5 Полученные таким образом гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела, можно субкультивировать в обычной культуральной среде и хранить в жидком азоте в течение длительного периода времени.

При получении моноклональных антител из вышеупомянутых гибридом можно 10 использовать следующие способы: (1) способы, в которых гибридомы культивируют обычными способами, а антитела получают в виде культурального супернатанта; (2) способы, в которых гибридомы размножают введением их совместимому млекопитающему, а антитела получают в виде асцитов; и т.п. Первый способ 15 предпочтителен для получения антител с большой чистотой, а последний предпочтителен для крупномасштабного получения антител.

Например, гибридомы, продуцирующие антитела к рецептору IL-6, можно получить 20 способом, раскрытым в JP-A (Kokai) H03-139293. Такие гибридомы можно получить инъекцией гибридомы, продуцирующей РМ-1, в брюшную полость мыши BALB/c, получением асцитов, и затем очисткой антитела РМ-1 из асцитов; или культивированием гибридомы в подходящей культуральной среде (например, 25 среде RPMI1640, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и 5% BM-Condimed H1 (Boehringer Mannheim), гибридомной среде SFM (GIBCO-BRL), среде PFHM-II (GIBCO-BRL) и т.д.), и затем получением антител РМ-1 из культурального супернатанта.

В качестве моноклональных антител по настоящему изобретению можно 25 использовать рекомбинантные антитела, где антитела получают с использованием методик генетической рекомбинации клонированием гена антитела из гибридомы, встраиванием гена в соответствующий вектор и, затем, введением вектора хозяину 30 (смотри, например, Vogrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., Therapeutic Monoclonal Antibodies, опубликовано в Соединенном Королевстве Macmillan Publishers Ltd, 1990).

Более конкретно, молекулы мРНК, кодирующие переменные (V) области антитела, выделяют из клеток, продуцирующих представляющие интерес антитела, 35 таких как гибридомы. мРНК можно выделить, получая тотальную РНК известными способами, таким как способ ультрацентрифугирования в гуанидине (Chirgwin, J. M. *et al.*, Biochemistry (1979) 18, 5294-5299) и АГРС-способ (Chomczynski, P. *et al.*, Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159), и получая мРНК с помощью набора для очистки мРНК - mRNA Purification Kit (Pharmacia), и т.п. В качестве альтернативы, мРНК 40 можно выделить напрямую, используя набор для выделения мРНК QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia).

Молекулы кДНК V-областей антитела синтезируют из полученных мРНК с использованием обратной транскриптазы. кДНК можно синтезировать с 45 использованием набора для синтеза первой цепи кДНК с обратной транскриптазой AMV (AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit) и т.п. Кроме того, для синтеза и амплификации кДНК можно применить 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), используя набор 5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech) и ПЦР. Представляющий интерес фрагмент ДНК очищают из полученных 50 ПЦР-продуктов и затем лигируют с векторной ДНК. Затем, используя вышеописанную ДНК, получают рекомбинантный вектор и вводят в *Escherichia coli* (*E. coli*) или аналогичные бактерии, а затем отбирают колонии для получения целевого

рекомбинантного вектора. Нуклеотидную последовательность представляющей интерес ДНК подтверждают, например, дидезокси-методом (секвенированием по Сэнгеру).

5 После получения ДНК, кодирующей V-область представляющего интерес антитела, ДНК лигируют с ДНК, которая кодирует желаемую константную область антитела (C-область), и встраивают в экспрессионный вектор. В качестве альтернативы, ДНК, кодирующую V-область антитела, можно встроить в экспрессионный вектор, содержащий ДНК C-области антитела.

10 Чтобы получить антитело для применения в настоящем изобретении, как описано ниже, ген антитела встраивают в экспрессионный вектор таким образом, что его экспрессию контролирует область регуляции экспрессии, например энхансер и промотор. Затем антитело можно экспрессировать, трансформируя клетку-хозяина этим экспрессионным вектором.

15 Чтобы снизить гетероантигенность против человека и т.п. в настоящем изобретении можно использовать искусственно модифицированные генно-инженерные антитела, например химерные антитела, гуманизированные антитела или антитела человека. Эти модифицированные антитела можно получить с использованием известных способов.

20 Химерное антитело можно получить лигированием ДНК, кодирующей V-область антитела, полученной, как описано выше, с ДНК, кодирующей C-область антитела человека, затем встраиванием ДНК в экспрессионный вектор и введением его в хозяина для продукции антитела (смотри публикацию европейской патентной заявки № EP 125023; публикацию международной патентной заявки № WO 92/19759). Этот известный способ можно использовать для получения химерных антител, пригодных для настоящего изобретения.

30 Гуманизированные антитела также называют реконструированными антителами человека, и они представляют собой антитела, в которых определяющие комплементарность области (CDR) антитела из млекопитающего (кроме человека) (например, мышиног антитела) переносят в CDR антител человека. Общие способы для данной рекомбинации генов также известны (смотри публикацию европейской патентной заявки № EP 125023, публикацию международной патентной заявки № WO 35 92/19759).

40 Более конкретно, последовательности ДНК, сконструированные таким образом, что CDR мышиног антитела лигированы с каркасными областями (FR) антитела человека, синтезируют с помощью ПЦР из нескольких олигонуклеотидов, которые содержат перекрывающиеся участки на своих концах. Полученную ДНК лигируют с ДНК, кодирующей C-область антитела человека, и затем встраивают в экспрессионный вектор. Экспрессионный вектор вводят хозяину для получения гуманизированного антитела (смотри публикацию европейской патентной заявки № EP 239400, публикацию международной патентной заявки № WO 92/19759).

45 Молекулы FR антитела человека, которые лигируют через CDR, выбирают так, чтобы CDR образовали подходящие антиген-связывающие участки. Аминокислоту (аминокислоты) в FR переменных областей антитела можно, при необходимости, заменить таким образом, чтобы CDR реконструированного антитела человека образовали соответствующий антиген-связывающий участок (Sato, K. *et al.*, Cancer Res. 50 (1993) 53, 851-856).

В химерных и гуманизированных антителах используют C-области антител человека, включающие C γ . Например, можно использовать C γ 1, C γ 2, C γ 3 и C γ 4.

Кроме того, для увеличения стабильности антител и их продукции С-области антитела человека можно модифицировать.

Химерные антитела состоят из вариабельной области антитела, полученного из млекопитающего (кроме человека) и константной области антитела, полученного из человека; гуманизированные антитела состоят из CDR антитела, полученного из млекопитающего (кроме человека) и каркасных областей и константных областей, полученных из антитела человека. Оба эти антитела обладают пониженной антигенностью у человека, и, поэтому, пригодны в качестве антител для применения в настоящем изобретении.

Предпочтительные конкретные примеры гуманизированных антител для применения в настоящем изобретении включают гуманизированное антитело PM-1 (смотри публикацию международной патентной заявки № WO 92/19759).

Кроме того, в дополнение к вышеупомянутым способам получения антител человека также известны методики получения антител человека паннингом с использованием библиотеки антител человека. Например, с помощью фагового дисплея можно экспрессировать на поверхности фагов вариабельные области антител человека в виде одноцепочечных антител (scFv), а затем можно отбирать фаги, связывающие антиген. Анализом генов отобранных фагов можно определить последовательности ДНК, кодирующие вариабельные области антитела человека, которые связываются с антигеном. После выявления последовательности ДНК scFv, которое связывается с антигеном, можно сконструировать соответствующий экспрессионный вектор, содержащий данную последовательность, чтобы получить антитело человека. Эти способы уже известны, и в качестве ссылок можно использовать публикации WO 92/01047, WO 92/20791, WO93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 и WO 95/15388.

Гены антител, сконструированных описанным выше способом, можно экспрессировать стандартными способами. В клетках млекопитающих ген антитела можно экспрессировать, используя ДНК, в которой ген антитела функционально лигирован с пригодным обычно используемым промотором и поли-А сигналом ниже гена антитела, или можно использовать вектор, содержащий ДНК. Примеры промотора/энхансера включают ранний промотор/энхансер цитомегаловируса человека.

Кроме того, другие промоторы/энхансеры, которые можно использовать для экспрессии антител, используемых в настоящем изобретении, включают вирусные промоторы/энхансеры ретровирусов, полиомавирусов, аденовирусов, вируса обезьян 40 (SV40) и т.п.; а также включают промоторы/энхансеры клеток млекопитающих, такие как промотор/энхансер фактора элонгации 1 α человека (HEF1 α).

Например, при использовании промотора/энхансера SV40 экспрессию легко проводить следующим способом по Mulligan *et al.* (Mulligan, R. C. *et al.*, Nature (1979) 277, 108-114). В качестве альтернативы, при использовании промотора/энхансера HEF1 α можно использовать способ Mizushima *et al.* (Mizushima, S. and Nagata S., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322).

В *E. coli* ген антитела можно экспрессировать, функционально лигируя экспрессируемый ген антитела со стандартным промотором и сигнальной последовательностью для секреции антитела. Примеры промоторов включают промотор lacZ, промотор araB и т.п. При использовании промотора lacZ гены можно экспрессировать по способу Ward *et al.* (Ward, E. S. *et al.*, Nature (1989) 341, 544-546;

Ward, E. S. *et al.*, FASEB J. (1992) 6, 2422-2427); а промотор *araB* можно использовать по способу Better *et al.* (Better, M. *et al.*, Science (1988) 240, 1041-1043).

Если антитело получают в периплазме *E. coli*, то в качестве сигнальной последовательности для секреции антитела можно использовать сигнальную

последовательность *pel B* (Lei, S. P. *et al.*, J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383).
Полученные в периплазме антитела выделяют и затем используют после соответствующего рефолдинга структуры антитела (смотри, например, WO 96/30394).

В качестве точки инициации репликации можно использовать точки инициации репликации SV40, полиомавируса, аденовируса, вируса бычьей папилломы (BPV) и т.п. Дополнительно, для увеличения числа копий гена в клетках-хозяевах, экспрессионный вектор может содержать в качестве маркера селекции ген аминогликозид-фосфотрансферазы (APH), ген тимидин-киназы (ТК), ген ксантин-гуанидин фосфорибозилтрансферазы *E. coli* (Eco^{gpt}), ген дегидрофолат-редуктазы (*dhfr*) или аналогичный ген.

Для применения в настоящем изобретении антитела можно получать с помощью любой системы. Системы для получения антител включают системы *in vitro* и *in vivo*. Системы получения *in vitro* включают системы с использованием эукариотических или прокариотических клеток.

Системы получения, в которых используются эукариотические клетки, включают системы, использующие животные клетки, растительные клетки или клетки грибов. Такие животные клетки включают: (1) клетки млекопитающих, например клетки CHO, COS, клетки миеломы, клетки почки детеныша хомячка (ВНК), клетки HeLa, Vero и т.п.; (2) клетки земноводных, например ооциты *Xenopus*; и (3) клетки насекомых, например клетки sf9, sf21, Tn5 и т.п. Известные растительные клетки включают клетки, полученные из *Nicotiana tabacum*, которые можно культивировать в виде каллюса. Известные грибковые клетки включают дрожжи, такие как *Saccharomyces* (например, *S. cerevisiae*), плесневые грибы, такие как *Aspergillus* (например, *A. niger*) и т.п.

Системы получения, в которых используются прокариотические клетки, включают системы, использующие бактериальные клетки. Известные бактериальные клетки включают *E. coli* и *Bacillus subtilis*.

Антитела можно получить, используя трансформацию для введения гена целевого антитела в эти клетки, и затем культивируя трансформированные клетки *in vitro*. Культивирование проводят по известным методикам. Например, в качестве культуральной среды можно использовать DMEM, MEM, RPMI1640, IMDM вместе с сывороточными добавками, такими как FCS. Кроме того, для получения антител *in vivo* клетки с встроенными генами антител можно перенести в брюшную полость или аналогичную область организма животного.

Напротив, системы получения *in vivo* включают системы, в которых используются животные или растения. Системы получения с использованием животных включают системы, в которых используются млекопитающие или насекомые.

Млекопитающие, которых можно использовать, включают коз, свиней, овец, мышей, крупный рогатый скот и т.п. (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). Кроме того, можно использовать насекомых, включая шелковичных червей. Из растений, например, можно использовать табак.

Ген антитела вводят в этих животных или растения, антитело продуцируется в организме животных или растений, а затем это антитело выделяют. Например, ген антитела можно получить в виде слитого гена, встраивая его в середину гена,

кодирующего белок, такой как β -казеин козы, который продуцируется только в молоке. Фрагменты ДНК, содержащие слитый ген, включающий ген антитела, вводят инъекцией козым эмбрионам, и эмбрионы подсаживают самкам коз. Целевое антитело выделяют из молока, получаемого от трансгенных животных, рожденных козами, которые получили эмбрионы, или молока, получаемого от потомства этих животных. Трансгенным козам можно давать гормоны, чтобы увеличить объем молока, содержащего целевое антитело, которое они продуцируют (Ebert, K. M. *et al.*, *Bio/Technology* (1994) 12, 699-702).

При использовании шелковичных червей их инфицируют бакуловирусами, в которые встроены ген целевого антитела, а целевое антитело получают из жидкостей организма этих червей (Maeda, S. *et al.*, *Nature* (1985) 315, 592-594). Кроме этого при использовании табака ген целевого антитела встраивают в вектор для экспрессии в растениях (например, pMON530), и вектор вводят в бактерии, такие как *Agrobacterium tumefaciens*. Этими бактериями заражают растения табака (например, *Nicotiana tabacum*), так что целевые антитела можно получить из листьев этих растений (Julian, K. -C. Ma *et al.*, *Eur. J. Immunol.* (1994) 24, 131-138).

При получении антител с использованием *in vitro* или *in vivo* систем, описанных выше, ДНК, кодирующие тяжелую цепь антитела (H-цепь) и легкую цепь (L-цепь), можно встроить в отдельные экспрессионные векторы, и затем совместно трансформировать ими хозяина. В альтернативном варианте ДНК можно встроить в один экспрессионный вектор для трансформации хозяина (смотри публикацию международной патентной заявки № WO 94/11523).

Антителами, которые используются в настоящем изобретении, могут быть фрагменты антител или продукты их модификации, при условии что их можно соответственно использовать в настоящем изобретении. Например, фрагменты антитела включают Fab, F(ab')₂, Fv, и одноцепочечные Fv (scFv), в которых Fv H- и L-цепей соединены через соответствующий линкер.

А именно, фрагменты антител получают, обрабатывая антитела ферментами, например папаином или пепсином, или, в качестве альтернативы, конструируют гены, кодирующие эти фрагменты, встраивают их в экспрессионные векторы и экспрессируют их в соответствующих клетках-хозяевах (смотри, например, Co, M. S. *et al.*, *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H., *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496; Plueckthun, A. & Skerra, A., *Methods in Enzymology* (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 652-663; Rousseaux, J. *et al.*, *Methods in Enzymology* (1989) 121, 663-666; Bird, R. E. *et al.*, *TIBTECH* (1991) 9, 132-137).

scFv можно получить, соединяя V-область H-цепи и V-область L-цепи антитела. В scFv V-область H-цепи и V-область L-цепи соединены через линкер, предпочтительно, через пептидный линкер (Huston, J. S. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 5879-5883). V-области H- и L-цепей в scFv могут быть получены из любого вышеописанного антитела. Пептидные линкеры для соединения V-областей включают, например, произвольные одноцепочечные пептиды, состоящие из 12-19 аминокислотных остатков.

Кодирующую scFv ДНК можно получить, используя в качестве матрицы последовательности ДНК (которые кодируют H-цепь или V-область и L-цепь или V-область вышеупомянутых антител) для амплификации с помощью ПЦР участка ДНК, кодирующего целевую аминокислотную последовательность в матричной последовательности, с праймерами, ограничивающими концы участка, а затем дополнительно проводя амплификацию полученного участка ДНК с ДНК,

кодирующей участок пептидного линкера, и парой праймеров, которые соединяют оба конца линкера с Н-цепью и L-цепью.

После того как получена ДНК, кодирующая scFv, можно получить обычными способами содержащий ДНК экспрессионный вектор и трансформировать вектором

хозяйина. Дополнительно, scFv из хозяйина можно получить по обычным способам. Как и для описанных выше антител, их фрагменты можно получить из хозяйина путем выделения и экспрессии их генов. В настоящем описании «антитело» охватывает такие фрагменты антител.

В качестве модифицированных антител также можно использовать антитела, связанные с различными молекулами, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ). В настоящем описании «антитело» охватывает такие модифицированные антитела. Эти модифицированные антитела можно получить химической модификацией полученных антител. Такие способы уже хорошо известны в данной области.

Антитела, полученные и экспрессированные, как описано выше, можно выделять из содержимого клеток или из их окружения, или из хозяев, а затем проводить их очистку до гомогенного состояния. Антитела для применения в настоящем изобретении можно выделить и/или очистить с помощью аффинной хроматографии. Используемые в аффинной хроматографии колонки включают, например, колонки с белком А и колонки с белком G. Носители, используемые для колонок с белком А, включают, например, HyperD, POROS, Sepharose FF и т.п. В дополнение к вышеперечисленным методам можно использовать другие способы выделения и/или очистки обычных белков, и эти способы ничем не ограничены.

Например, можно выделять и/или очищать антитела, используемые в настоящем изобретении, соответственно выбирая и комбинируя различные виды хроматографии в дополнение к аффинной хроматографии, фильтрации, ультрацентрифугированию, обессоливанию, диализу и т.п. Виды хроматографии включают, например, ион-обменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, гель-фильтрацию и т.п. Эти виды хроматографии можно проводить с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В альтернативном варианте можно использовать обращеннофазовую ВЭЖХ.

Концентрацию полученных вышеописанными способами антител можно определить измерением поглощения, методом ELISA и т.п. Конкретно, поглощение определяют соответствующим образом разбавляя раствор белка буфером PBS(-), измеряя поглощение при 280 нм и вычисляя концентрацию (1,35 OD = 1 мг/мл). В качестве альтернативы, при использовании метода ELISA измерения можно провести, как описано ниже: а именно, в 96-луночный планшет (Nunc) добавляют 100 мкл козьих антител к IgG человека (TAG), разведенных до 1 мкг/мл в 0,1 М бикарбонатном буфере (pH 9,6) и инкубируют в течение ночи при 4°C для иммобилизации антител. После блокирования неспецифических сайтов связывания добавляют соответственно разведенное антитело по настоящему изобретению или соответственно разведенный образец, содержащий антитело и IgG человека (CAPPEL) в качестве стандарта, и инкубируют в течение одного часа при комнатной температуре.

После промывки добавляют 100 мкл разведенных 1:5000 меченных фосфатазой антител к IgG человека (BIO SOURCE) и инкубируют один час при комнатной температуре. После еще одной промывки добавляют раствор субстрата и инкубируют, и для вычисления концентрации целевого антитела измеряют поглощение при 405 нм на спектрофотометре Microplate Reader Model 3550 (Bio-Rad).

Используемые в настоящем изобретении варианты IL-6 представляют собой

вещества, способные связывать рецептор IL-6, и которые не передают биологическую активность IL-6. То есть варианты IL-6 конкурируют с IL-6 за связывание с рецепторами IL-6, но не способны передавать биологическую активность IL-6, и, следовательно, они блокируют сигнальную трансдукцию, опосредуемую IL-6.

5 Варианты IL-6 получают введением мутации (мутаций) путем замены аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности IL-6. Выбор исходного IL-6, используемого в качестве основы для вариантов IL-6, не ограничен, но с учетом антигенности и т.п. предпочтительно использовать IL-6 человека.

10 Более конкретно, аминокислотные замены проводят, предсказывая вторичную структуру аминокислотной последовательности IL-6 (например, с помощью программного обеспечения WHATIF; Vriend *et al.*, J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56) и далее оценивая влияние замещенного аминокислотного остатка (замещенных остатков) на всю молекулу. После того как определены соответствующие

15 аминокислотные остатки, которые нужно заменить, вызывающие аминокислотные замены мутации вводят с помощью обычно используемых методов ПЦР, в качестве матрицы используя нуклеотидную последовательность, кодирующую ген IL-6 человека, и, таким образом, получают гены, кодирующие варианты IL-6. Если

20 необходимо, то этот ген встраивают в соответствующий экспрессионный вектор, и вариант IL-6 можно получить, используя вышеупомянутые способы экспрессии, получения и очистки рекомбинантных антител.

Конкретные примеры вариантов IL-6 раскрыты в Brakenhoff *et al.*, J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93, Savino *et al.*, EMBO J. (1994) 13, 1357-1367, WO 96/18648 и WO 96/17869.

25 Частичные пептиды IL-6 и рецептора IL-6, которые будут использоваться в настоящем изобретении, представляют собой вещества, способные связывать рецептор IL-6 и IL-6, соответственно, и которые не передают биологическую активность IL-6. А именно, посредством связывания и захвата рецептора IL-6 или IL-6,

30 частичные пептиды IL-6 или рецептора IL-6 могут специфически ингибировать связывание IL-6 с рецептором IL-6. В результате биологическая активность IL-6 не передается, и блокируется опосредуемая IL-6 сигнальная трансдукция.

Частичные пептиды IL-6 или рецептора IL-6 представляют собой пептиды, которые содержат частичную или полную аминокислотную последовательность области

35 аминокислотной последовательности IL-6 или рецептора IL-6, участвующей в связывании между IL-6 и рецептором IL-6. Такие пептиды обычно содержат от 10 до 80, предпочтительно, от 20 до 50, более предпочтительно, от 20 до 40 аминокислотных остатков.

40 Частичные пептиды IL-6 или рецептора IL-6 можно получить общеизвестными способами, например, с помощью генно-инженерных методик или методами пептидного синтеза, определяя область аминокислотной последовательности IL-6 или рецептора IL-6, которая участвует в связывании между IL-6 и рецептором IL-6, и используя частичную или полную аминокислотную последовательность этой области.

45 При получении частичных пептидов IL-6 или рецептора IL-6 с использованием генно-инженерных методов в экспрессионный вектор встраивают последовательность ДНК, кодирующую целевой пептид, и затем можно получать этот пептид, применяя вышеупомянутые способы экспрессии, получения и очистки рекомбинантных антител.

50 Если частичные пептиды IL-6 или рецептора IL-6 получают с помощью способов пептидного синтеза, можно использовать обычно применяемые способы пептидного синтеза, например способы твердофазного синтеза или способы жидкофазного синтеза.

А именно, пептиды можно синтезировать по способу, описанному в «Continuation of Development of Pharmaceuticals, Vol. 14, Peptide Synthesis (на японском) (под ред. Haruaki Yajima, 1991, Hirokawa Shoten)». В качестве способа твердофазного синтеза можно использовать, например, следующий способ: С-концевую аминокислоту синтезируемого пептида пришивают к подложке, нерастворимой в органических растворителях, затем удлиняют пептидную цепь, поочередно повторяя (1) реакцию конденсации аминокислот, чьи α -аминогруппы и функциональные группы боковых цепей защищены соответствующими защитными группами, по одной в направлении от С- к N-концу; и (2) реакцию удаления защитных групп с α -аминогрупп, связанных со смолой аминокислот или пептидов. Твердофазный пептидный синтез в общем классифицируют на Вос-метод и Fmoc-метод в зависимости от используемых защитных групп.

После синтеза представляющего интерес белка, как указано выше, удаляют защитные группы, и затем отщепляют пептидную цепь от подложки. Для реакции отщепления пептидной цепи в Вос-методе обычно используют фтористоводородную кислоту или трифторметансульфоновую кислоту, а в Fmoc-методе - TFA (трифторуксусную кислоту). В Вос-методе, например, вышеупомянутую смолу с защищенным пептидом обрабатывают фтороводородом в присутствии анизола. Затем выделяют пептид, удаляя защитные группы и отщепляя пептид от подложки. Лиофилизацией выделенного пептида можно получить неочищенный пептид. В Fmoc-методе, напротив, реакцию удаления защитных групп и реакцию отщепления пептидной цепи от подложки можно провести в TFA, например, используя способ, аналогичный описанному выше способу.

Полученные неочищенные пептиды можно разделить и/или очистить с помощью ВЭЖХ. Элюцию можно провести при оптимальных условиях, используя систему растворителей - вода/ацетонитрил, которую обычно используют для очистки белков. Фракции, соответствующие пикам полученной хроматограммы, собирают и лиофилизируют. При этом идентификацию очищенных пептидных фракций проводят по молекулярному весу с помощью масс-спектрального анализа, с помощью анализа аминокислотного состава, аминокислотной последовательности или с помощью аналогичных анализов.

Конкретные примеры частичных пептидов IL-6 и рецептора IL-6 раскрыты в JP-A (Kokai) H02-188600, JP-A (Kokai) H07-324097, JP-A (Kokai) H08-311098 и публикации патента Соединенных Штатов № US 5210075.

Антитела, используемые в настоящем изобретении, могут также представлять собой конъюгированные антитела, связанные с различными молекулами, такими как полиэтиленгликоль (ПЭГ), радиоактивные вещества и токсины. Такие конъюгированные антитела можно получить химической модификацией полученных антител. Способы модификации антител уже хорошо известны в данной области. «Антитела» по настоящему изобретению охватывают эти конъюгированные антитела.

Средства по настоящему изобретению для подавления хронической реакции отторжения, которые содержат ингибиторы IL-6 в качестве активных ингредиентов, можно использовать для лечения хронической реакции отторжения. Настоящее изобретение также относится к средствам для подавления хронической реакции отторжения при пересадке сердца, которые содержат ингибитор IL-6 в качестве активного ингредиента.

Реакция отторжения, которую подавляют супрессирующие средства по настоящему изобретению, представляет собой, предпочтительно хроническую реакцию

отторжения, являющуюся проблемой в современной трансплантологии. Хроническая реакция отторжения представляет собой осложнение, отличающееся утолщением интимы кровеносных сосудов и фиброзом интерстиция, которое становится проблемой через один год после пересадки и влияет на отдаленный прогноз у пациента. Хроническая реакция отторжения развивается постепенно даже после клинического купирования острой реакции отторжения.

Авторами изобретения ранее был обнаружен терапевтический эффект ингибиторов ИЛ-6 в мышинной модели острого отторжения после пересадки сердца (WO 2007/058194). Предполагают, что механизм патологического состояния при острой реакции отторжения, который в основном опосредован цитотоксическими Т-клетками, отличается от механизма хронической реакции отторжения. Конкретные данные, позволяющие предположить, что хроническая реакция отторжения отличается от острой реакции отторжения, приведены ниже:

(1) хроническая реакция отторжения представляет собой специфическое патологическое состояние, характеризующееся ростом клеток, как, например, фиброз интерстиция и стенотические поражения вследствие утолщения интимы в полостных тканях пересаженных органов;

(2) начало хронической реакции отторжения невозможно подавить общепринятой иммуносупрессивной терапией, которая эффективна для подавления острой реакции отторжения;

(3) хроническая реакция отторжения представляет собой иммунологический ответ, прогрессирующий в скрытой форме даже после клинического купирования острого отторжения; и

(4) хроническая реакция отторжения имеет факторы риска, свойственные для ее начала.

(1) Известно, что стенотические поражения сосудов, которые сопровождаются ростом гладкомышечных клеток сосудов, вызванным повреждением сосудистого эндотелия, являются гистопатологическим признаком, свойственным хронической реакции отторжения. Такие стенотические поражения сосудов также называются посттрансплантационными сосудистыми поражениями или посттрансплантационным артериосклерозом. Они приводят к расстройствам кровообращения вследствие нарушения кровотока в пересаженных органах, так что они перестают функционировать. Таким образом, стенотические поражения сосудов становятся проблемой, как серьезное осложнение в хронической стадии. Причины сосудистых повреждений в пересаженных органах включают ишемически-реперфузионные болезни, окислительный стресс и острую реакцию отторжения при трансплантационной хирургии. Так, в подавлении хронической реакции отторжения несомненно были достигнуты некоторые успешные результаты, благодаря продвижению методик по подавлению острой реакции отторжения и поддержанию органов в острой фазе. Однако никакие определенные профилактические способы еще не доступны. В дополнение, (2) не существует установленной иммуносупрессивной терапии, которая эффективна в отношении хронической реакции отторжения. (3) Скрыто прогрессирующая реакция отторжения включает продление гуморального иммунитета, опосредованного изоантителами и продление многообразия клеточного иммунитета, опосредованного инфильтрацией макрофагов и различных цитокинов. (4) Известно, что разнообразные факторы риска вовлечены в хроническую реакцию отторжения, включая побочные эффекты иммуносупрессантов, генетические факторы, посттрансплантационную инфекцию (цитомегаловирус и т.п.) и накопление антител в

тканях, а также общие факторы риска для атеросклероза (диабет, гиперлипидемия, гипертония) у пациентов. Таким образом, полагают, что дисфункция трансплантированных органов возникает вследствие комплексного участия различных факторов.

5 В настоящем изобретении «подавлением хронической реакции отторжения после трансплантации» именуется подавление вышеописанных разнообразных симптомов, ассоциированных с хронической реакцией отторжения, таких как фиброз интерстиция и стеноз вследствие утолщения интимы полостных тканей в трансплантированных
10 органах.

Виды трансплантации органов, для которых возможно применение супрессирующих средств по настоящему изобретению, конкретно не ограничены, а предпочтительные органы для трансплантации в настоящем изобретении включают паренхимные органы, такие как сердце, печень, почки, поджелудочная железа, легкие
15 и тонкий кишечник. Настоящее изобретение также можно применять при трансплантации тканей, таких как сердечный клапан, сосуды, кожа, кости и роговица.

В настоящем изобретении активность ингибиторов ИЛ-6 в отношении ингибирования передачи сигналов ИЛ-6 можно оценить обычными способами. А именно, ИЛ-6 добавляют к культурам зависимых от ИЛ-6 линий клеток миеломы человека (S6B45 и KPM2), линии Т-клеточной лимфомы Леннерта человека (КТ3) или зависимой от ИЛ-6 клеточной линии МН60.BSF2; и измеряют включение ³H-тимидина клетками, зависимыми от ИЛ-6, в присутствии ингибитора ИЛ-6. В альтернативном способе культивируют экспрессирующие рецептор ИЛ-6 клетки U266, и
20 к культуре одновременно добавляют ИЛ-6, меченный ¹²⁵I, и ингибитор ИЛ-6; а затем определяют количество ИЛ-6, меченного ¹²⁵I, который связан с клетками, экспрессирующими рецептор ИЛ-6. В дополнение к группе ингибитора ИЛ-6 в описанную выше аналитическую систему включают группу отрицательного контроля, которая не содержит ингибитор ИЛ-6. Активность ингибитора ИЛ-6 в отношении ингибирования ИЛ-6 можно оценить, сравнивая результаты обеих групп.

Кроме того, подавление реакции отторжения после трансплантации можно оценить описанным ниже способом: считается, что при трансплантации органов «подавление
35 посттрансплантационных повреждений» достигается, когда в результате увеличивается степень приживаемости трансплантата. Приживаемость трансплантата можно оценить, исходя из того, нормально ли функционирует каждый орган после трансплантации.

В приведенных ниже примерах продемонстрировано, что хроническая реакция отторжения при трансплантации сердца подавляется введением антител к рецептору ИЛ-6. Эти данные позволяют высказать предположение, что ингибиторы ИЛ-6, такие как антитела к рецептору ИЛ-6, пригодны в качестве средств для подавления хронической реакции отторжения.

45 Субъекты, которым вводят супрессирующие средства, относятся к млекопитающим. Предпочтительно, чтобы млекопитающим являлся человек.

Супрессирующие средства по настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтических препаратов, и их можно вводить системно или местно посредством перорального или парентерального введения. Например, можно выбрать
50 внутривенные инъекции, такие как капельное введение, внутримышечные инъекции, внутривенные инъекции, такие как капельное введение, внутримышечные инъекции, внутривенные инъекции, подкожные инъекции, суппозитории, клизмы, пероральные таблетки для энтерального введения или аналогичные средства. Соответствующие способы введения выбирают в зависимости от возраста пациента и

симптомов. Эффективную дозу на одно введение выбирают из диапазона от 0,01 до 100 мг/кг веса тела. В качестве альтернативы, дозу можно выбрать из диапазона от 1 до 1000 мг на одного пациента, предпочтительно, из диапазона от 5 до 50 мг на одного пациента. Предпочтительные доза и способ введения указаны ниже: например, при использовании антитела к рецептору IL-6 эффективной дозой является количество, при котором в крови присутствует свободное (несвязанное) антитело. А именно, дозу от 0,5 до 40 мг/кг веса тела в месяц (четыре недели), предпочтительно, от 1 до 20 мг/кг веса тела/ в месяц, вводят посредством внутривенной инъекции, такой как капельное введение, подкожная инъекция или аналогичным способом, от одного до нескольких раз в месяц, например, дважды в неделю, один раз в неделю, один раз в две недели или один раз в четыре недели. Схему введения можно изменять, например, увеличивая интервал между введениями от двух раз в неделю или одного раза в неделю до одного раза в две недели, одного раза в три недели или одного раза в четыре недели, одновременно наблюдая за состоянием пациента после трансплантации и изменениями показателей анализа крови.

В настоящем изобретении супрессирующие средства могут содержать фармацевтически приемлемые носители, такие как консерванты и стабилизаторы. «Фармацевтически приемлемыми носителями» называют материалы, которые можно вводить вместе с вышеописанным средством; и они сами могут или нет давать вышеописанный эффект подавления хронической реакции отторжения. В качестве альтернативы носители могут являться материалами, которые не способны подавлять хроническую реакцию отторжения, но при использовании вместе с ингибитором IL-6 они дают дополнительный или синергетический стабилизирующий эффект.

Такие фармацевтически приемлемые материалы включают, например, стерильную воду, физиологический раствор, стабилизаторы, наполнители, буферы, консерванты, поверхностно-активные вещества, хелатирующие средства (ЭДТА и т.п.) и связующие вещества.

В настоящем изобретении поверхностно-активные вещества включают неионные поверхностно-активные вещества, а типичные примеры таких веществ включают сорбитановые эфиры жирных кислот, такие как сорбитана монокаприлат, сорбитана монолаурат и сорбитана монопальмитат; глицериновые эфиры жирных кислот, такие как глицерина монокаприлат, глицерина мономирилат и глицерина моностеарат; полиглицериновые эфиры жирных кислот, такие как декаглицерила моностеарат, декаглицерила дистеарат и декаглицерила моноинолеат; полиоксиэтилен-сорбитановые эфиры жирных кислот, такие как полиоксиэтилен-сорбитана монолаурат, полиоксиэтилен-сорбитана моноолеат, полиоксиэтилен-сорбитана моностеарат, полиоксиэтилен-сорбитана монопальмитат, полиоксиэтилен-сорбитана триолеат и полиоксиэтилен-сорбитана тристеарат; полиоксиэтилен-сорбитановые эфиры жирных кислот, такие как полиоксиэтилен-сорбита тетрастеарат и полиоксиэтилен-сорбита тетраолеат; полиоксиэтилен-глицериновые эфиры жирных кислот, такие как полиоксиэтилен-глицерила моностеарат; полиэтиленгликолевые эфиры жирных кислот, такие как полиэтиленгликоля дистеарат; полиоксиэтиленалкиловые простые эфиры, такие как полиоксиэтиленлауриловый эфир; полиоксиэтилен-полиоксипропиленалкиловые простые эфиры, такие как полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоль, полиоксиэтилен-полиоксипропиленпропиловый эфир и полиоксиэтилен-полиоксипропиленцетиловый эфир; полиоксиэтиленалкилфениловые простые эфиры, такие как полиоксиэтилен-нонилфениловый эфир; полиоксиэтилен отвержденные касторовые масла, такие как полиоксиэтиленовое касторовое масло и

полиоксиэтилен отвержденное касторовое масло (полиоксиэтиленовое гидрированное касторовое масло); полиоксиэтиленовые производные пчелиного воска, такие как полиоксиэтилен-сорбитовый пчелиный воск; полиоксиэтилен-ланолиновые производные, такие как полиоксиэтилен-ланолин; и полиоксиэтиленовые производные амидов жирных кислот и т.п. с HLB от 6 до 18, такие как полиоксиэтиленовое производное амида стеариновой кислоты.

Также поверхностно-активные вещества включают анионные поверхностно-активные вещества, а типичные примеры этих веществ включают, например, алкилсульфаты, имеющие алкильную группу от 10 до 18 атомов углерода, такие как натрия цетилсульфат, натрия лаурилсульфат и натрия олеилсульфат; сульфаты полиоксиэтиленалкиловых простых эфиров, в которых алкильная группа имеет от 10 до 18 атомов углерода, а среднее количество добавленных оксиэтильных групп составляет от 2 до 4, такие как натрия полиоксиэтиленлаурилсульфат; соли алкилсульфосукцинатных сложных эфиров, имеющие алкильную группу от 8 до 18 атомов углерода, такие как натрия лаурилсульфосукцинатный эфир; природные поверхностно-активные вещества, например лецин; глицерофосфолипиды; сфингофосфолипиды, такие как сфингомиелин; и сложные эфиры сахарозы с жирными кислотами, в которых жирные кислоты имеют от 12 до 18 атомов углерода.

Один, два или больше из описанных выше поверхностно-активных веществ можно объединить и добавить к средствам по настоящему изобретению. Поверхностно-активные вещества, которые предпочтительно использовать в препаратах по настоящему изобретению, включают полиоксиэтилен-сорбитановые эфиры жирных кислот, такие как полисорбаты 20, 40, 60 и 80. Особенно предпочтительны полисорбаты 20 и 80. Также предпочтительны полиоксиэтилен-полиоксипропиленгликоли, такие как поллоксамер (Плуроник F-68® и т.п.).

Количество добавляемого поверхностно-активного вещества варьирует в зависимости от типа используемого поверхностно-активного вещества. При использовании полисорбата 20 или полисорбата 80 его количество обычно находится в диапазоне от 0,001 до 100 мг/мл, предпочтительно, в диапазоне от 0,003 до 50 мг/мл, более предпочтительно, в диапазоне от 0,005 до 2 мг/мл.

В настоящем изобретении буферы включают фосфатный, цитратный буфер, уксусную кислоту, яблочную кислоту, винную кислоту, янтарную кислоту, молочную кислоту, фосфат калия, глюконовую кислоту, капроновую кислоту, дезоксихолиновую кислоту, салициловую кислоту, триэтаноламин, фумаровую кислоту и другие органические кислоты; и карбонатный буфер, Tris-буфер, гистидиновый буфер и имидазольный буфер.

Жидкие препараты можно получить, растворяя средства в водных буферах, используемых для получения жидких препаратов. Концентрация буфера обычно находится в диапазоне от 1 до 500 мМ, предпочтительно, в диапазоне от 5 до 100 мМ, более предпочтительно, в диапазоне от 10 до 20 мМ.

Средства по настоящему изобретению могут также содержать другие низкомолекулярные полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин и иммуноглобулин; аминокислоты; сахара и углеводы, такие как полисахариды и моносахариды, сахарные спирты и т.п.

В настоящем описании аминокислоты включают основные аминокислоты, например аргинин, лизин, гистидин и орнитин, и неорганические соли этих аминокислот (предпочтительно, гидрохлоридные соли и фосфатные соли, а именно фосфаты аминокислот). При использовании свободных аминокислот рН подводят до

предпочтительного значения, добавляя соответствующие физиологически приемлемые буферные вещества, например неорганические соли, и, в частности, соляную кислоту, фосфорную кислоту, серную кислоту, уксусную кислоту и муравьиную кислоту, и их соли. В этом случае применение фосфатов особенно выгодно, поскольку дает
5 достаточно стабильные продукты после лиофильной сушки. Использование фосфатов дает большие преимущества, если препараты по существу не содержат органические кислоты, такие как яблочная кислота, винная кислота, лимонная кислота, янтарная кислота и фумаровая кислота, или не содержат соответствующие анионы (малатный ион, тартратный ион, цитратный ион, сукцинатный ион, фумаратный ион и т.п.).
10 Предпочтительными аминокислотами являются аргинин, лизин, гистидин и орнитин. Также можно использовать кислые аминокислоты, например глутаминовую кислоту и аспарагиновую кислоту, и их соли (предпочтительно, натриевые соли); нейтральные аминокислоты, например изолейцин, лейцин, глицин, серин, треонин, валин, метионин,
15 цистеин и аланин; и ароматические аминокислоты, например фенилаланин, тирозин, триптофан и его производное N-ацетилтриптофан.

В настоящем описании сахара и углеводы, такие как полисахариды и моносахариды, включают, например, декстран, глюкозу, фруктозу, лактозу, ксилозу,
20 маннозу, мальтозу, сахарозу, трегалозу и раффинозу.

В настоящем описании сахарные спирты включают, например, маннит, сорбит и инозит.

При приготовлении средств по настоящему изобретению в виде водного раствора для инъекций средства можно смешать с, например, физиологическим раствором и/или
25 изотоническим раствором, содержащим глюкозу или другие вспомогательные средства (такие как D-сорбит, D-манноза, D-маннит и хлорид натрия). Водные растворы можно использовать в комбинации с соответствующими солюбилизующими средствами, такими как спирты (этанол и т.п.), полиспирты
30 (пропиленгликоль, ПЭГ и т.п.) или неионные поверхностно-активные вещества (полисорбат 80 и HCO-50).

Средства могут дополнительно содержать, при необходимости, разбавители, солюбилизаторы, вещества для изменения pH, успокаивающие средства, серосодержащие восстанавливающие средства, антиоксиданты и т.п.

В настоящем описании серосодержащие восстанавливающие средства включают, например, соединения, содержащие сульфгидрильные группы, такие как N-ацетилцистеин, N-ацетилгомоцистеин, тиоктовая кислота, тиодигликоль, тиоэтанолламин, тиоглицерин, тиосорбит, тиогликолевая кислота и их соли, натрия
40 тиосульфат, глутатион и тиоалкановые кислоты, имеющие от одного до семи атомов углерода.

Более того, антиоксиданты в настоящем изобретении включают, например, эриторбовую кислоту, дибутилгидрокситолуол, бутилгидроксианизол, α-токоферол, токоферола ацетат, L-аскорбиновую кислоту и ее соли, пальмитат L-аскорбиновой
45 кислоты, стеарат L-аскорбиновой кислоты, бисульфит натрия, сульфит натрия, триамилгаллат, пропилгаллат, и хелатирующие средства, такие как динатрия этилендиаминтетраацетат (ЭДТА), пирофосфат натрия и метафосфат натрия.

При необходимости средства можно заключить в микрокапсулы (микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы, желатина, поли[метилметакриловой кислоты] или
50 аналогичных соединений) или получить в виде коллоидных систем доставки лекарственных веществ (липосомы, альбуминовые микросферы, микроэмульсия, наночастицы, нанокапсулы и т.п.) (смотри «Remington's Pharmaceutical Science

16th edition», Oslo Ed., 1980, и т.п.). Кроме того, также известны способы получения средств в виде средств с замедленным высвобождением, и их можно применять в настоящем изобретении (Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. (1981) 15, 167-277; Langer, Chem. Tech. (1982) 12, 98-105; патент США № 3773919; европейская патентная заявка (EP) 58481; Sidman *et al.*, Biopolymers (1983) 22, 547-556; и EP 133988).

Используемые фармацевтически приемлемые носители соответственно выбирают из описанных выше носителей или из их комбинаций в зависимости от типа лекарственной формы; но они не ограничены носителями, описанными выше.

Настоящее изобретение связано со способами подавления хронической реакции отторжения, которые включают стадию введения субъектам ингибиторов II-6.

Настоящее изобретение также связано со способами подавления хронической реакции отторжения при трансплантации сердца, которые включают стадию введения субъектам ингибиторов II-6.

В настоящем описании «субъект» относится к организму или частям тела организма, которым будут вводить ингибитор II-6 по настоящему изобретению. Организмы включают животных (например, человека, виды домашних животных и диких животных), но конкретно не ограничены. «Части тела организма» конкретно не ограничены.

В настоящем описании «введение» включает пероральное и парентеральное введение. Пероральное введение включает, например, введение пероральных средств. Такие пероральные средства включают, например, гранулы, порошки, таблетки, капсулы, растворы, эмульсии и суспензии.

Парентеральное введение включает, например, введение с помощью инъекций. Такие инъекции включают, например, внутривенные инъекции, подкожные инъекции, внутримышечные инъекции и внутрибрюшинные инъекции. При этом эффекты способов по настоящему изобретению можно получить введением генов, содержащих олигонуклеотиды для введения в живые организмы, с использованием методик генной терапии. В качестве альтернативы, средства по настоящему изобретению можно вводить местно в области, на которые планируется воздействие. Например, средства можно вводить местными инъекциями в ходе хирургического вмешательства, с помощью катетеров, или с помощью системы направленной доставки генов можно вводить ДНК, кодирующие пептиды по настоящему изобретению.

Супрессирующие средства по настоящему изобретению можно вводить субъектам до трансплантации органов, во время трансплантации или после трансплантации органов. Кроме того, супрессирующие средства можно вводить однократно или многократно.

В альтернативном варианте, когда супрессирующие средства по настоящему изобретению вводятся в удаляемую или трансплантируемую часть организма, то возможен «контакт» супрессирующих средств по настоящему изобретению с этой частью организма.

В настоящем изобретении «контакт» проводят в зависимости от состояния организма. Примеры включают распыление супрессирующих средств по настоящему изобретению на части организма и добавление супрессирующих средств по настоящему изобретению к измельченным частям организма, но не ограничены этим. Если частью организма являются культивированные клетки, вышеупомянутый «контакт» можно осуществить, добавляя супрессирующие средства по настоящему изобретению в культуральную среду этих клеток, или встраивая ДНК, содержащие олигонуклеотиды по настоящему изобретению, в клетки, составляющие часть

организма.

При проведении способов по настоящему изобретению средства по настоящему изобретению можно вводить в качестве составляющих фармацевтических композиций совместно с, по меньшей мере, одним известным химиотерапевтическим веществом. В качестве альтернативы, средства по настоящему изобретению можно вводить одновременно с, по меньшей мере, одним известным иммуносупрессантом. В одном варианте осуществления изобретения известные химиотерапевтические средства и супрессирующие средства по настоящему изобретению можно вводить практически одновременно.

Предпочтительно вводить средства для подавления хронической реакции отторжения системно, но их можно вводить в места трансплантации органов после того, как орган был пересажен, или их можно вводить в целевые участки одновременно с трансплантацией органа. В качестве альтернативы, средства можно добавлять к органу *ex vivo*, до трансплантации.

Любые цитируемые в настоящем описании патенты, опубликованные патентные заявки и публикации включены в него посредством ссылки.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 представлены диаграммы и фотографии, на которых отражены результаты сравнения и оценки на основе показателей отторжения гистопатологических срезов трансплантированных сердец через 60 дней после трансплантации, и процентное соотношение площади с фиброзом.

На фиг. 2 представлены диаграмма и фотографии, на которых показаны результаты анализа встречаемости (в процентах) стеноза сосудов в сосудистых повреждениях трансплантированных сердец.

Примеры

Далее настоящее изобретение определено описано на основе примеров, но их не следует рассматривать, как ограничивающие настоящее изобретение.

В качестве доноров были приобретены мыши B6.C-H2^{bm12} при посредстве Charles River Laboratories Japan Inc. от Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) в Соединенных Штатах. В качестве реципиентов были приобретены мыши C57BL/6 от Japan SLC, Inc. Между этими двумя линиями мышей существует только незначительные несовпадения по МНС-антигену (несовпадения класса II), так что острая реакция отторжения в трансплантированных сердцах не возникает, в то время как гистопатологические признаки, наблюдаемые через два месяца после трансплантации, согласуются с признаками хронической реакции отторжения у людей. Поэтому эти мыши считаются животной моделью хронической реакции отторжения. Мышей содержали в институте экспериментов с животными Университета Шиншу (официальное название: Отдел исследований на лабораторных животных, Кафедра естественных наук, Исследовательский центр медицинских и естественных наук университета Шиншу) в соответствии с протоколами работы с животными в институте. Трансплантации сердца у мышей проводили, используя частично модифицированную мышиную модель, созданную на основе ранее опубликованной мышинной модели эктопической трансплантации сердца (Corry, R. J. *et al.*, Transplantation (1973) 16, 343-350). Трансплантацию сердца проводили у мышей в возрасте от шести до восьми недель посредством микрохирургического вмешательства, используя описанную ниже процедуру.

Мышей-доноров и реципиентов анестезировали внутрибрюшинной инъекцией пентобарбитала натрия (Нембутал (торговое название)) в дозировке 70 мг/кг.

Предназначенное к трансплантации сердце получали после лигирования сосудов, кроме восходящей аорты и легочной артерии, которые нужны для анастомоза. Полученный сердечный трансплантат консервировали в холодном физиологическом растворе, содержащем 7,5% гепарина на льду. Реципиенту проводили лапаротомию по 5 средней линии и желудочки поворачивали на 180°, чтобы открыть брюшную аорту и нижнюю полую вену. После остановки кровотечения с помощью микрозажимов для микрососудов, проводили разрез около 1 мм на каждой поверхности анастомозируемых участков. Аорта и легочная артерия трансплантированного сердца 10 анастомозировали с брюшинной аортой и нижней полую вену реципиента, соответственно, непрерывным швом с использованием нейлоновой нити 10-0. Для восстановления кровотока микрозажимы высвобождали постепенно. Подтверждали восстановление сердцебиения в трансплантированном сердце. После подтверждения остановки кровотечения зашивали брюшную стенку и кожу, чтобы закрыть брюшную 15 полость. Каждая операция занимала около 45 минут. Процент успешных операций составлял 95% или выше.

В исследуемой группе MR16-1 вводили в брюшную полость одиночной дозой в количестве 0,5 мг/животное дважды в неделю. Контрольной группе животных вводили 20 крысиные IgG (контрольные Ig) таким же образом. Через шестьдесят дней после трансплантации у реципиентов удаляли трансплантированные сердца и оценивали хроническую реакцию отторжения, используя следующие три типа гистопатологических показателей.

(1) степень реакции отторжения в образцах, окрашенных гематоксилин-эозином. 25 сравнивают и оценивают с использованием показателей отторжения, определяемых по критериям пяти степеней от 0 до 4 на основе показателей присутствия инфильтрации клеток, и некроза и потери миокарда (Billingham, M. E. *et al.*, *J. Heart Transplant* (1990) 9, 587-593; Rodriguez, E. R., *J. Heart Lung Transplant* (2003) 22, 3-15).

30 Гистопатологические среды приготавливали из трансплантированных сердец через 60 дней после трансплантации и их окрашивали гематоксилин-эозином (фиг. 1). В группе, получавшей контрольное воздействие, были обнаружены диффузная инфильтрация воспалительных клеток и некроз миокарда (фиг. 1a). В группе, получавшей воздействие MR16-1, инфильтрация воспалительных клеток была 35 умеренной, а структура тканей миокарда оставалась сравнительно интактной (фиг. 1b). Кроме того, показатель отторжения в группе, получавшей MR16-1, был значительно ниже показателя группы, получавшей контрольное воздействие (фиг. 1c: группа, получавшая контрольное воздействие, $3,1 \pm 0,3$; группа, получавшая MR16-1, 40 $1,4 \pm 0,3$; $p=0,0013$).

(2) Фиброз миокардиального интерстиция, характерный для хронического отторжения, детектировали трехцветным окрашиванием по Массону. Соотношение (в 45 процентах) площади фиброза в каждом видимом поле вычисляли, используя программное обеспечение для анализа изображений (NIH image, version 1.62).

В результате было показано, что площадь фиброза была значительно уменьшена в 45 группе, получавшей воздействие MR16-1 (фиг. 1e), по сравнению с группой, получавшей контрольное воздействие (фиг. 1d) (фиг. 1f: группа, получавшая контрольное воздействие, $46,5\% \pm 4,1\%$; группа, получавшая MR16-1, $19,0\% \pm 2,1\%$; 50 $p=0,0001$).

(3) Для анализа посттрансплантационных сосудистых поражений, отличающихся ангиостенозом в результате утолщения интимы, определяли процент стеноза сосудов, приблизительно определяя исходный просвет сосуда от внутренней эластичной

мембраны и используя такое же программное обеспечение для анализа изображений по методу, предложенному Suzuki, J. *et al.* (Nat. Med. (1997) 3, 900-903), применяя следующую формулу:

Процент стеноза (%) = ((площадь внутренней эластичной мембраны) - (просвет)) / (площадь внутренней эластичной мембраны) × 100.

В результате анализа сосудистых поражений в трансплантированных сердцах было показано, что в группе, получавшей воздействие MR16-1, утолщение интимы было уменьшено, и, таким образом, был значительно подавлен стеноз просвета сосуда (фиг. 2b) по сравнению с группой, получавшей контрольное воздействие (фиг. 2a) (фиг. 2c: группа, получавшая контрольное воздействие, 59,6% ± 6,0%; группа, получавшая MR16-1, 23,7% ± 4,2%; p=0,0019).

Как описано выше, в модели трансплантации сердца на мышах введение MR16-1 реципиентам подавляло хроническую реакцию отторжения трансплантированного сердца и значительно снижало фиброз и утолщение интимы кровяных сосудов в трансплантированном сердце, которые считаются отличительными гистопатологическими признаками этого процесса. Хроническая реакция отторжения представляет собой осложнение, которое негативно влияет на отдаленный прогноз у реципиентов, и, таким образом, ожидается, что в результате клинического применения средств по настоящему изобретению будет разработана новая иммуносупрессивная терапия.

Промышленное применение

Настоящее изобретение относится к средствам для подавления хронической реакции отторжения, содержащими ингибитор ИЛ-6 в качестве активного ингредиента, и к способам подавления хронической реакции отторжения, которые включают стадию введения субъектам ингибитора ИЛ-6.

Хроническая реакция отторжения постепенно прогрессирует даже после купирования острофазовой реакции отторжения с помощью различных иммуносупрессантов. Патологическое состояние является осложненным и сильно отличается по многим параметрам от острой реакции отторжения. До сих пор ни одно существующее фармацевтическое средство не имело профилактического или лечебного эффекта на хроническую реакцию отторжения. Настоящее изобретение связано с новым терапевтическим применением ингибиторов ИЛ-6, обладающих эффектом подавления хронической реакции отторжения. Кроме того, поскольку ингибиторы избирательно подавляют активность ИЛ-6, воспалительного цитокина, ожидается, что они послужат в качестве превосходных иммуносупрессантов, имеющих меньшие побочные эффекты по сравнению с существующими фармацевтическими средствами.

Формула изобретения

1. Средство для подавления хронической реакции отторжения, содержащее антитело, которое распознает рецептор ИЛ-6 и ингибирует связывание ИЛ-6 с рецептором ИЛ-6, в качестве активного ингредиента.

2. Средство для подавления хронической реакции отторжения по п.1, в котором антитело представляет собой моноклональное антитело.

3. Средство для подавления хронической реакции отторжения по п.1, в котором антитело представляет собой антитело, распознающее рецептор ИЛ-6 человека.

4. Средство для подавления хронической реакции отторжения по п.1, в котором антитело представляет собой рекомбинантное антитело.

5. Средство для подавления хронической реакции отторжения по п.3, в котором антитело представляет собой химерное, гуманизированное антитело или антитело человека.

5 6. Средство для подавления хронической реакции отторжения по любому из пп.1-5, которое используют для подавления хронической реакции отторжения при трансплантации сердца.

7. Способ подавления хронической реакции отторжения, который включает стадию введения субъекту антитела, которое распознает рецептор ИЛ-6 и ингибирует
10 связывание ИЛ-6 с рецептором ИЛ-6.

8. Способ по п.7, в котором антитело представляет собой моноклональное антитело.

9. Способ по п.7, в котором антитело представляет собой антитело, распознающее рецептор ИЛ-6 человека.

15 10. Способ по п.7, в котором антитело представляет собой рекомбинантное антитело.

11. Способ по п.9, в котором антитело представляет собой химерное, гуманизированное антитело или антитело человека.

20 12. Способ по любому из пп.7-11, который подавляет хроническую реакцию отторжения при трансплантации сердца.

13. Применение антитела, которое распознает рецептор ИЛ-6 и ингибирует связывание ИЛ-6 с рецептором ИЛ-6 в получении средства для подавления хронической
25 реакции отторжения.

14. Применение по п.13, в котором антитело представляет собой моноклональное антитело.

15. Применение по п.13, в котором антитело представляет собой антитело, распознающее рецептор ИЛ-6 человека.

30 16. Применение по п.13, в котором антитело представляет собой рекомбинантное антитело.

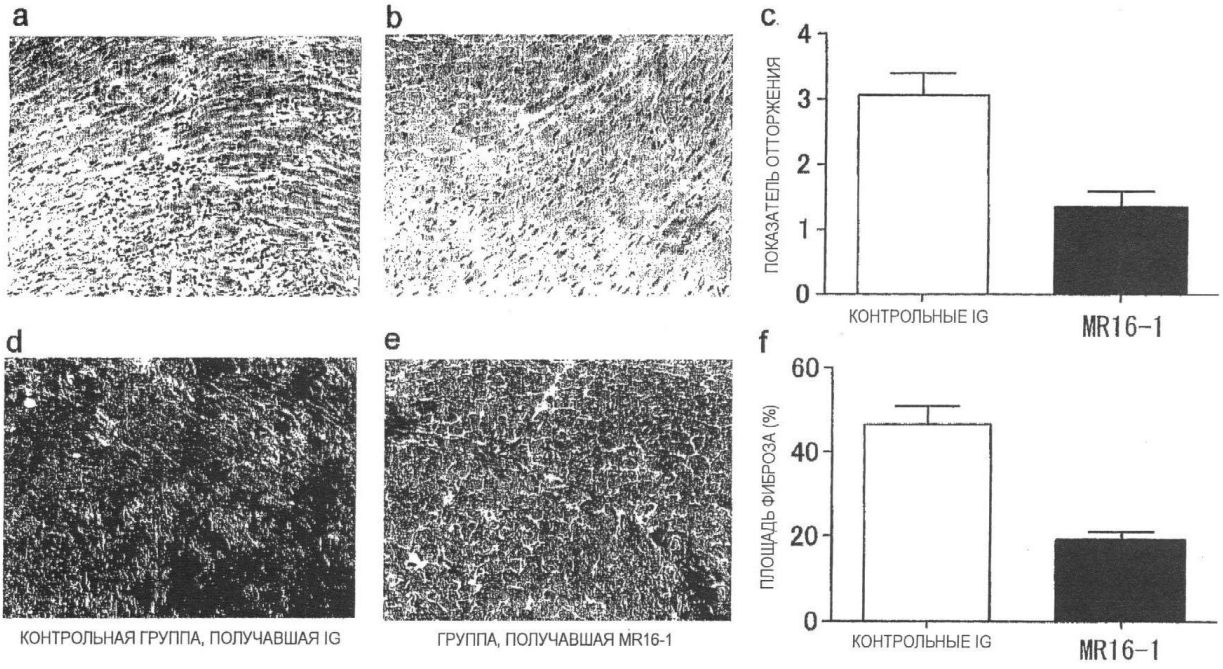
17. Применение по п.15, в котором антитело представляет собой химерное, гуманизированное антитело или антитело человека.

35 18. Применение по любому из пп.13-17, которое подавляет хроническую реакцию отторжения при трансплантации сердца.

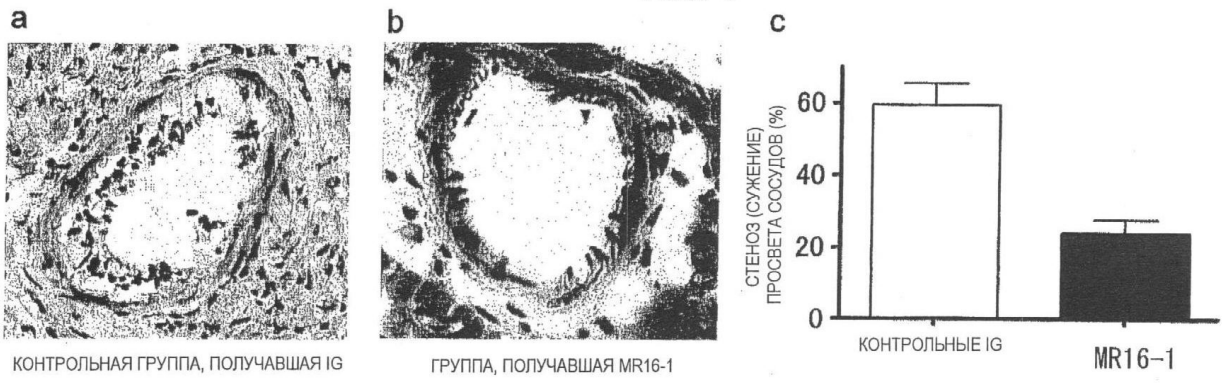
40

45

50



ФИГ. 1



ФИГ. 2