



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** (11) **2 361 613** (13) **C2**

(51) МПК
A61K 39/395 (2006.01)
C12N 5/12 (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003132066/15, 02.04.2002

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
02.04.2002

(30) Конвенционный приоритет:
02.04.2001 JP 2001-103627
06.04.2001 JP 2001-109131

(43) Дата публикации заявки: 10.04.2005

(45) Опубликовано: 20.07.2009 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 2147443 C1, 20.04.2000. US 5670373 A, 23.09.1997. LEPORE L. et al., Study of IL-2, IL-6, TNF alpha, IFN gamma and beta in the serum and the synovial fluid of patients with juvenile chronic arthritis, Clin. Exper. Rheumatol, 1994, Sep-Oct; 12 (5), 561-565.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 03.11.2003

(86) Заявка РСТ:
JP 02/03312 (02.04.2002)

(87) Публикация РСТ:
WO 02/080969 (17.10.2002)

Адрес для переписки:
103735, Москва, ул. Ильинка, 5/2, ООО
"Союзпатент", пат.пов. А.П.Агурееву

(72) Автор(ы):

ЁСИЗАКИ Казуюки (JP),
НИСИМОТО Норихиро (JP),
ИВАМОТО Масахиро (JP),
МИНОТА Сейдзи (JP),
ЁКОТА Сумпей (JP),
МИЯМАЕ Такако (JP)

(73) Патентообладатель(и):

ТУГАИ СЕЙЯКУ КАБУСИКИ КАЙСЯ (JP)

(54) ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ СРЕДСТВО ДЛЯ ЗАБОЛЕВАНИЙ, РОДСТВЕННЫХ ДЕТСКИМ ХРОНИЧЕСКИМ АРТРИТНЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины и касается терапевтического средства для лечения заболеваний, родственных детским хроническим артритным заболеваниям, например, собственно детских хронических артритных заболеваний, болезни Стилла и им

подобных, включающее в качестве активного ингредиента антагонист рецептора интерлейкина-6 IL-6, гуманизированное антитело РМ-1. Преимущество изобретения заключается в повышении эффективности. 2 н. и 3 з.п. ф-лы.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)**C12N 5/12** (2006.01)**A61P 19/02** (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2003132066/15, 02.04.2002**(24) Effective date for property rights:
02.04.2002(30) Priority:
02.04.2001 JP 2001-103627
06.04.2001 JP 2001-109131(43) Application published: **10.04.2005**(45) Date of publication: **20.07.2009 Bull. 20**(85) Commencement of national phase: **03.11.2003**(86) PCT application:
JP 02/03312 (02.04.2002)(87) PCT publication:
WO 02/080969 (17.10.2002)Mail address:
103735, Moskva, ul. Il'inka, 5/2, OOO
"Sojuzpatent", pat.pov. A.P.Agureevu

(72) Inventor(s):

ESIZAKI Kazujuki (JP),
NISIMOTO Norikhiro (JP),
IVAMOTO Masakhiro (JP),
MINOTA Sejdzi (JP),
EKOTA Sumpej (JP),
MIJamaE Takako (JP)

(73) Proprietor(s):

TUGAI SEJJaKU KABUSIKI KAJSJa (JP)**(54) THERAPEUTIC AGENT FOR DISEASES, RELATED TO CHILDREN'S CHRONIC ARTHRITIC DISEASES**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention concerns area of medicine and concerns the therapeutic agent for treatment of diseases related to children's chronic arthritic diseases, for example, actually children's chronic arthritic diseases, Still's disease and

similar to it, including an antagonist of the interleukin-6 IL-6 receptor as an active ingredient, humanised antibody PM-1. Advantage of the invention consists in efficiency increase.

EFFECT: efficiency increase.

5 cl, 4 ex

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение касается лекарственного средства для "заболеваний родственных детским хроническим артритным заболеваниям", включающего в качестве активного ингредиента антагонист интерлейкина-6 (IL-6). Заболевания, родственные детским хроническим артритным заболеваниям, включают собственно детские хронические артритные заболевания, болезнь Стилла и им подобные.

Уровень техники

Цитокин IL-6 называют стимулирующим В-клетки фактором-2 (BSF2) или β -интерфероном. IL-6 был открыт как фактор дифференцировки, ответственный за активацию лимфоидных В-клеток (Hirano T. et al., Nature (1986) 324, 73-76). После этого было обнаружено, что он является многофункциональным цитокином, влияющим на функции различных клеток (Akira S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78). Сообщалось, что IL-6 индуцирует созревание лимфоидных Т-клеток (Lotz M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258).

IL-6 осуществляет свою биологическую активность посредством двух белков на поверхности клетки. Одним из них является лигандсвязывающий белок, рецептор IL-6, молекулярный вес которого составляет около 80 кД, с которым связывается 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 существует не только в мембрано-связанной форме, которая пронизывает клеточную мембрану и экспрессируется на ней, но также в виде растворимого рецептора IL-6, который в основном состоит из внеклеточной части.

Другим белком является не связывающий лиганды мембранный белок gp130 с молекулярным весом около 130 кД, принимающий участие в передаче сигнала. IL-6 и рецептор IL-6 образуют комплекс IL-6/ рецептор IL-6, с которым связывается gp130, и таким образом биологическая активность IL-6 передается внутрь клетки (Taga et al., Cell (1983) 58, 573-581).

Антагонисты IL-6 - это вещества, ингибирующие передачу биологических активностей IL-6. К настоящему времени известны антитела к IL-6, антитела к рецептору IL-6, антитела к gp130, перестроенный IL-6, частичные пептиды IL-6 или рецептора IL-6 и т.п.

Антитела к рецептору IL-6 описаны в ряде обзоров (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). Гуманизированное антитело PM-1 было получено путем введения участка комплиментарности (CDR) мышиного антитела PM-1 (одного из антител к рецептору IL-6, Hirata et al., J. Immunology (1989), 143, 2900-2906) в антитело человека (International Patent Application WO 92-19759).

Детские хронические артритные заболевания в основном представлены хроническими артритами, возникающими до 16-летнего возраста, которые являются наиболее распространенными заболеваниями из коллагеновых заболеваний, возникающих у детей. В отличие от ревматоидного артрита (RA) у взрослых, они не считаются однородным заболеванием и представлены несколькими типами, поэтому их обычно рассматривают, как заболевания, отличающиеся от ревматоидного артрита у взрослых.

В отношении детских хронических артритных заболеваний в Японии применяется название "юношеский ревматоидный артрит" в соответствии с диагностическими критериями Соединенных Штатов, тогда как в Европе в основном применяют термин "юношеский хронический артрит". Недавно стали применять и такие термины, как идиопатический хронический артрит (ICA) и юношеский идиопатический артрит (IA).

Типы детских хронических артритных заболеваний классифицировали различным образом. Согласно Американской коллегии ревматологии (ACR), они, то есть артритные заболевания, возникающие у детей до 16 лет и продолжающиеся в течение 6

недель и больше, подразделяются на 3 типа: 1) системные, 2) многосуставные, 3) малосуставные (JRA Criteria Subcommittee of the Diagnostic and Therapeutic Committee of the American Rheumatism Association, *Arthritis Rheum* 20 (Suppl): 195, 1977). В Европе Европейская лига против ревматизма (EULAR) составила классификацию, которая
 5 хотя и отличается от вышеприведенной классификации ARA тем, что продолжительность артрита составляет 3 месяца и более, и тем, что из нее исключены артриты, вызванные псориазом, анкилозирующим спондилитом и др., однако она признает те же 3 типа заболеваний (*Bulletin* 4, *Nomenclature and Classification of Arthritis in Children*. Basel, National Zeitung AG, 1977).

10 Недавно была предпринята попытка пересмотра классификации и Международная лига Ассоциаций по ревматологии (ILAR) предложила в 1995 г. проект классификации детских идиопатических артритных заболеваний (Fink CW, *Proposal for the development of classification criteria for idiopathic arthritides of childhood*. *J. Rheumatol*, 22: 1566 (1995)), а в 1997 г. этот вариант был выдвинут в качестве проекта ILAR (Southwood
 15 TR, *Classifying childhood arthritis*, *Ann. Rheum. Dis.* 56: 79 (1997)). Эта классификация предусматривает деление на 1) системный артрит, 2) RF-положительный полиартрит, 3) RF-отрицательный полиартрит, 4) олигоартрит, 5) расширенный олигоартрит, 6) артрит, связанный с энтезитом, 7) псориазный артрит и 8) другие.

Кроме того, авторы настоящего изобретения предлагали способ классификации
 20 детских хронических артритных заболеваний на:

1) первичные детские хронические артритные заболевания, в том числе:

(1) синдром SPRASH (острые приступы лихорадки, перикардит, сыпь, артрит, спленомегалия, гепатомегалия). Начинается с повышения температуры при
 25 расслаблении и появления высыпаний, наблюдается серозит и гепатомегалия с одновременным или отсроченным возникновением артрита, хотя иногда артрит и не наблюдается;

(2) идиопатические детские хронические артритные заболевания. Отсутствует основное заболевание, главная патология - артрит;

а) положительные на ревматоидный фактор (RF-положительный тип)

30 б) положительные на антиядерные антитела (ANA-положительный тип)

с) RF/ANA-отрицательный тип.

2) вторичные детские хронические артритные заболевания. Артрит может сопутствовать первичным наследственным или ненаследственным
 35 заболеваниям (Shunpei Yokota, "Advances in recent therapeutic methods for chronic arthritides diseases of childhood", *Rheumatism*, 39:860 (1999)).

Сообщалось, что в детских хронических артритных заболеваниях играют роль различные цитокины. В частности, полагают, что с этим заболеванием связаны нарушения баланса воспалительных цитокинов IL-1, IL-6, IL-12, TNF- α и
 40 противовоспалительных цитокинов IL-1ra (антагонист рецептора IL-1), IL-10, IL-13, sTNFR (растворимый рецептор TNF).

Для лечения детских хронических артритных заболеваний применялись нестероидные противовоспалительные средства, кортикостероиды, противоревматические средства (соединения золота и др.), иммунодепрессанты, метотрексат (MTX и др.). Однако, поскольку лечебные эффекты отличаются от
 45 пациента к пациенту, следует ожидать разработки более эффективных терапевтических схем.

Болезнь Стилла, впервые описанная британским педиатром Стиллом в 1897 г., имеет клиническую картину, четко отличающуюся от ревматоидного артрита у взрослых, и представляет собой заболевание, встречающееся и у детей, и у взрослых
 50 (особенно у подростков), при этом основные симптомы - лихорадка, эритема, артрит, серозит и т.п. Возникающий у взрослых тип называют взрослой формой болезни Стилла. При болезни Стилла анализ на ревматоидный фактор обычно отрицательный.

У детей болезнь Стилла является другим наименованием юношеского

ревматоидного артрита системного типа (он же юношеский ревматоидный артрит (JRA), юношеский хронический артрит (JCA), юношеский идиопатический артрит (JIA)), который представляет собой хронический артрит, возникающий у детей до 16 лет. В качестве причин болезни Стилла называли такие экологические факторы, как вирусы, такие факторы организма, как антигены HLA, и иммунологические расстройства, однако этиология все еще остается неясной.

Болезнь Стилла у взрослых и болезнь Стилла у детей считаются почти одинаковыми заболеваниями, хотя и наблюдаются небольшие отличия в клинической картине, наряду с возрастом возникновения болезни. Болезнь Стилла у детей означает JRA системного типа, как описано выше. Однако JRA и ревматоидный артрит (RA) у взрослых отличаются клинически по многим признакам и рассматриваются как разные заболевания, поэтому болезнь Стилла у взрослых часто рассматривается как особое независимое заболевание среди ревматических болезней.

Диагностические критерии болезни Стилла у взрослых известны в изложении Yamaguchi (Journal of Rheumatology 19(3): 424-30, 1992), Reginato (Seminars in Arthritis & Rheumatism 17(1): 39-57, 1987), Cush (Rheumatology Grand Rounds, University of Pittsburgh Medical Center; Jan. 30, 1984), Goldman (Southern Medical Journal 73: 555-563, 1980) и др.

Что касается взаимоотношений между болезнью Стилла и цитокинами, то были сообщения о связи с такими цитокинами, как IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ , а такие воспалительные цитокины, как IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ , считаются вовлеченными в патологию болезни Стилла.

В отношении IL-6 было сообщение de Benedetti et al. о том, что уровень IL-6 повышается при болезни Стилла у детей (Arthritis Rheum. 34: 1158, 1991), а в сыворотке детей, страдающих болезнью Стилла, обнаружено высокое содержание комплекса IL-6/ растворимый рецептор IL-6 (sIL-6R) и наблюдается корреляция между уровнем этого комплекса и уровнем С-реактивного белка (CRP) (J. Clin. Invest. 93: 2114, 1994). Кроме того, Rooney et al. сообщали, что уровни IL-6 и TNF- α в плазме повышаются у детей, страдающих болезнью Стилла (Br. J. Rheumatol. 34: 454, 1995).

В качестве способа лечения болезни Стилла применялись нестероидные противовоспалительные средства, кортикостероиды, противоревматические средства, (соединения золота и др.), иммунодепрессанты, композиции γ -глобулина, метотрексат (MTX и др.). Однако, поскольку лечебные эффекты отличаются от пациента к пациенту, следует продолжить разработку более эффективных терапевтических схем.

Сущность изобретения

Итак, астоящее изобретение предусматривает новое терапевтическое средство для заболеваний, родственных детским хроническим артритным заболеваниям, причем данное средство принадлежит к другому типу, чем традиционные терапевтические средства для заболеваний, родственных детским хроническим артритным заболеваниям. В соответствии с настоящим изобретением заболевания, родственные детским хроническим артритным заболеваниям, включают собственно детские хронические артритные заболевания и болезнь Стилла.

После интенсивного и всестороннего исследования этих проблем авторы настоящего изобретения обнаружили, что антагонист интерлейкина-6 (IL-6) обладает лечебным эффектом при заболеваниях, родственных детским хроническим артритным заболеваниям, и совершили настоящее изобретение.

Итак, настоящее изобретение предусматривает терапевтическое средство для заболеваний, родственных детским хроническим артритным заболеваниям, включающее антагонист интерлейкина-6 (IL-6) в качестве активного ингредиента.

В частности, настоящее изобретение предусматривает терапевтическое средство для детских хронических артритных заболеваний, включающее антагонист интерлейкина-6 (IL-6) в качестве активного ингредиента.

Настоящее изобретение также предусматривает терапевтическое средство для

болезни Стилла, включающее антагонист интерлейкина-6 (IL-6) в качестве активного ингредиента.

Раскрытие сущности изобретения

Вышеупомянутый антагонист IL-6 предпочтительно представляет собой антитело к рецептору IL-6, предпочтительно моноклональное антитело к рецептору IL-6 человека или моноклональное антитело к рецептору IL-6 мыши. В качестве примера моноклонального антитела к рецептору IL-6 человека можно привести антитело PM-1, а в качестве моноклонального антитела к рецептору IL-6 мыши можно привести антитело MR 16-1.

Указанное антитело предпочтительно представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или антитело человека, например гуманизированное антитело PM-1.

К детским хроническим артритным заболеваниям, являющимся предметом лечения с помощью терапевтического средства настоящего изобретения, относятся все заболевания в вышеприведенных классификациях ARA, EULAR и ILAR, а также в классификации авторов настоящего изобретения. С дальнейшим прогрессом в методах серологической диагностики и прогрессом в методах терапии классификация типов детских хронических артритных заболеваний сейчас подвергается пересмотру во всем мире, можно сказать, она находится в состоянии неопределенности.

Предпочтительными предметами лечения с помощью терапевтического средства настоящего изобретения являются: по классификации ARA - системные, многосуставные и малосуставные; по классификации EULAR - системные, многосуставные и олигосуставные; по классификации ILAR - системные, многосуставные (RF-положительные), многосуставные (RF-отрицательные), олигоартрит и расширенный олигоартрит; по классификации авторов настоящего изобретения - первичные детские хронические артритные заболевания (синдром SPRASH, идиопатические детские хронические артритные заболевания - а) положительные на ревматоидный фактор (RF-положительный тип), б) положительные на антиядерные антитела (ANA-положительный тип), с) RF/ANA-отрицательный тип); а наиболее предпочтительными предметами лечения являются: по классификации ARA - системные и многосуставные; по классификации EULAR - системные и многосуставные; по классификации ILAR - системные, многосуставные (RF-положительные), многосуставные (RF-отрицательные) и расширенный олигоартрит; по классификации авторов настоящего изобретения - первичные детские хронические артритные заболевания (синдром SPRASH, идиопатические детские хронические артритные заболевания - а) RF-положительный тип, б) ANA-положительный тип). Еще более предпочтительными предметами лечения являются: по классификации ARA - системные и многосуставные; по классификации EULAR - системные и многосуставные; по классификации ILAR - системные, многосуставные (RF-положительные) и расширенный олигоартрит; а по классификации авторов настоящего изобретения - первичные детские хронические артритные заболевания (синдром SPRASH, идиопатические детские хронические артритные заболевания - а) RF-положительный тип).

Антагонисты IL-6 для настоящего изобретения могут быть любого происхождения, любого типа и любого вида, если только они обладают терапевтическим эффектом на заболевания, родственные детским хроническим артритным заболеваниям.

Антагонисты IL-6 - это вещества, которые блокируют передачу сигнала от IL-6 и ингибируют биологическую активность IL-6. Антагонисты IL-6 - это вещества, которые предпочтительно обладают ингибирующим действием на связывание самого IL-6, связывание с рецептором IL-6 или с gp130. В качестве примера антагонистов IL-6 можно привести антитела к IL-6, антитела к рецептору IL-6, антитела к gp130, перестроенный IL-6, растворимый перестроенный рецептор IL-6, частичные пептиды IL-6 или рецептора IL-6, а также низкомолекулярные вещества,

обладающие сходной активностью.

Антитела к IL-6 для настоящего изобретения можно получить в виде поликлональных или моноклональных антител, используя один из известных методов. В качестве антител к IL-6 для настоящего изобретения предпочтительны

5 моноклональные антитела, особенно происходящие от млекопитающих.

Моноклональные антитела, происходящие от млекопитающих, включают антитела, полученные в гибридоме, и антитела, полученные методами генной инженерии в организме хозяина, трансформированного экспрессионным вектором, содержащим ген антитела. Такие антитела, посредством связывания IL-6, блокируют связывание IL-6 с рецептором IL-6 и тем самым блокируют распространение биологической

10 активности IL-6 в клетке.

Примеры таких антител включают антитело MH166 (Matsuda et al., Eur. J. Immunology (1998) 18, 951-956), или антитело SK2 (Sato et al., The 21st General Meeting of the Japanese Society for Immunology, Gakujutu Kiroku (1991) 21, 166) и др.

15 Гибридому, продуцирующую антитела к IL-6, по существу можно создать одним из известных методов, как описано ниже. Так, IL-6 используют в качестве сенситизирующего антигена для проведения иммунизации стандартным методом иммунизации, а полученные при этом иммунные клетки сливают с известными родительскими клетками стандартным методом слияния клеток, после чего

20 скринируют клетки, продуцирующие моноклональное антитело, стандартным методом скринирования.

В частности, антитела к IL-6 можно получить следующим образом. Например, IL-6 человека, используемый в качестве сенситизирующего антигена для получения антител, можно получить с помощью гена или аминокислотной

25 последовательности IL-6, которые описаны в Eur. J. Biochem. (1987) 168, 543-550; J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541; Agr. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688.

После введения последовательности гена IL-6 в известный экспрессионный вектор и трансформации подходящих клеток хозяина белок IL-6 можно выделить из клеток хозяина или из супернатанта его культуры одним из известных методов и

30 использовать очищенный белок IL-6 в качестве сенситизирующего антигена. В качестве альтернативы можно использовать слитый белок, состоящий из белка IL-6 и еще одного белка, в качестве сенситизирующего антигена.

Антитела к рецептору IL-6 для настоящего изобретения можно получить в виде поликлональных или моноклональных антител, используя один из известных методов.

35 В качестве антител к рецептору IL-6 для настоящего изобретения предпочтительны моноклональные антитела, особенно происходящие от млекопитающих.

Моноклональные антитела, происходящие от млекопитающих, включают антитела, полученные в гибридоме, и антитела, полученные методами генной инженерии в организме хозяина, трансформированного экспрессионным вектором, содержащим ген антитела. Такие антитела, посредством связывания IL-6, блокируют связывание IL-6 с рецептором IL-6 и тем самым блокируют распространение биологической

40 активности IL-6 в клетке.

Примеры таких антител 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. Immunology (1989) 143, 2900-2906), антитело AUK12-20, AUK64-7 или AUK146-15 (International Patent Application WO 92-19759) и др. Из них наиболее предпочтительно антитело PM-1.

45 Кстати, линия клеток гибридомы, продуцирующей антитело PM-1, была сдана 12 июля 1988 г. на международное хранение по условиям Будапештского договора в виде PM-1 в Международный депозитарий патентуемых организмов в Национальном институте промышленной науки и технологии (Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba City, Ibaraki Pref., 305-5466 Japan) как FERM BP-2998. Также и линия клеток гибридомы, продуцирующей антитело MR16-1, была сдана 13 марта 1997 г. на международное хранение по условиям Будапештского договора в виде гибридомы крыса/мышь MR16-

1 в Международный депозитарий патентуемых организмов в Национальном институте промышленной науки и технологии (Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba City, Ibaraki Pref., 305-5466 Japan) как FERM BP-5875.

Гибридому, продуцирующую моноклональные антитела к рецептору IL-6, по
5 существу можно создать одним из известных методов, как описано ниже. Так, рецептор IL-6 используют в качестве сенситизирующего антигена для проведения иммунизации стандартным методом иммунизации, а полученные при этом иммунные клетки сливают с известными родительскими клетками стандартным методом слияния клеток, после чего скринируют клетки, продуцирующие моноклональное антитело,
10 стандартным методом скринирования.

В частности, антитела к рецептору IL-6 можно получить следующим образом. Например, рецептор IL-6 человека, используемый в качестве сенситизирующего антигена для получения антител, можно получить с помощью гена или
15 аминокислотной последовательности рецептора IL-6, описанных в European Patent Application No. EP 325474, а рецептор IL-6 мыши можно получить с помощью гена или аминокислотной последовательности рецептора IL-6, описанных в Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 3-155795.

Существует 2 типа рецепторов IL-6: рецептор IL-6, экспрессируемый на клеточной мембране, и IL-6, отделенный от клеточной мембраны (растворимый рецептор
20 IL-6, Yasukawa et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676). Растворимый рецептор IL-6 в основном состоит из внеклеточной части рецептора IL-6, связанного с клеточной мембраной, и отличается от мембрано-связанного рецептора IL-6 тем, что у него отсутствует трансмембранная часть либо и трансмембранная часть, и внутриклеточная часть. Белок рецептора IL-6 может быть любым из рецепторов IL-6,
25 лишь бы его можно было использовать в качестве сенситизирующего антигена для получения антител к рецептору IL-6 для настоящего изобретения.

После введения гена, кодирующего рецептор IL-6, в известный экспрессионный вектор и трансформации подходящих клеток хозяина требуемый белок рецептора IL-6 можно выделить из клеток хозяина или из супернатанта его культуры одним из
30 известных методов и использовать очищенный при этом белок рецептора IL-6 в качестве сенситизирующего антигена. В качестве альтернативы можно использовать клетки, экспрессирующие белок рецептора IL-6, или слитый белок, состоящий из белка рецептора IL-6 и еще одного белка, в качестве сенситизирующего антигена.

Клетки Escherichia coli (E. coli), содержащие плазмиду pIBISF2R, несущую кДНК, кодирующую рецептор IL-6 человека, были сданы 9 января 1989 г. на международное
35 хранение по условиям Будапештского договора в виде HB 101-pIBISF2R в Международный депозитарий патентуемых организмов в Национальном институте промышленной науки и технологии (Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba City, Ibaraki Pref., 305-5466 Japan) как FERM BP-2232.

Антитела к gp130 для настоящего изобретения можно получить в виде
40 поликлональных или моноклональных антител, используя один из известных методов. В качестве антител к gp130 для настоящего изобретения предпочтительны моноклональные антитела, особенно происходящие от млекопитающих. Моноклональные антитела, происходящие от млекопитающих, включают антитела,
45 полученные в гибридоме, и антитела, полученные методами генной инженерии в организме хозяина, трансформированного экспрессионным вектором, содержащим ген антитела. Такие антитела, посредством связывания gp130, блокируют связывание gp130 с комплексом IL-6/ рецептор IL-6 и тем самым блокируют распространение биологической активности IL-6 в клетке.

Примеры таких антител включают антитело AM64 (Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 3-219894), антитело 4B11 и антитело 2H4 (US 5571513),
50 антитело B-S12 и антитело B-P8 (Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 8-291199) и др.

Гибридому, продуцирующую антитела к gp130, по существу можно создать одним из известных методов, как описано ниже. Так, gp130 используют в качестве сенситизирующего антигена для проведения иммунизации стандартным методом иммунизации, а полученные при этом иммунные клетки сливают с известными
 5 родительскими клетками стандартным методом слияния клеток, после чего скринируют клетки, продуцирующие моноклональное антитело, стандартным методом скринирования.

В частности, антитела к рецептору IL-6 можно получить следующим образом. Например, gp130, используемый в качестве сенситизирующего антигена для получения
 10 антител, можно получить с помощью гена или аминокислотной последовательности gp130, описанных в Европейской патентной заявке №EP 411946.

Последовательность гена gp130 можно встроить в известный экспрессионный вектор и использовать этот вектор для трансформации подходящих клеток хозяина. Из клеток хозяина или из супернатанта его культуры можно выделить белок gp130
 15 одним из известных методов и использовать очищенный белок IL-6 в качестве сенситизирующего антигена. В качестве альтернативы можно использовать клетки, экспрессирующие gp130, или слитый белок, состоящий из белка gp130 и еще одного белка, в качестве сенситизирующего антигена.

Предпочтительно млекопитающих для иммунизации сенситизирующим антигеном
 20 выбирают с учетом их совместимости с родительскими клетками, используемыми для слияния клеток, и обычно к ним относятся такие грызуны, как мыши, крысы и хомяки, не ограничиваясь только ими.

Иммунизацию животных сенситизирующим антигеном проводят известными методами. Например, общепринятый метод включает внутрибрюшинное или
 25 подкожное введение сенситизирующего антигена млекопитающему. В частности, сенситизирующий антиген, разбавленный и суспендированный в надлежащем объеме фосфатного буфера (PBS) или физраствора и т.д., смешивают с соответствующим количеством распространенного адъюванта, такого как полный адъювант Фрейнда. После эмульгирования его предпочтительно вводят млекопитающему несколько раз
 30 через каждые 4-21 дня. Кроме того, можно использовать подходящий носитель при иммунизации сенситизирующим антигеном.

После иммунизации и подтверждения повышения уровня требуемых антител в сыворотке соответствующим методом выделяют иммунные клетки из животного и подвергают слиянию. В качестве предпочтительного примера иммунных клеток,
 35 подвергаемых слиянию, можно отметить клетки селезенки.

Родительские клетки, с которыми проводят слияние вышеуказанных иммунных клеток, - это клетки миеломы млекопитающих, к которым предпочтительно относятся различные известные клеточные линии, такие как P3×63Ag8.653 (Kearney J.F. et al., J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3×63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and
 40 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), S194 (Trowbridge I.S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323), R210 (Galfre G. et al., Nature (1979) 217, 131-133) и др., которые можно использовать при необходимости.

Слияние между вышеуказанными иммунными клетками и клетками миеломы по сути можно проводить в соответствии с одним из известных методов, например, описанным в Milstein et al. (Kohler G. and Milstein C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) и др.
 45

В частности, слияние указанных клеток проводят в стандартной питательной среде в присутствии, к примеру, ускорителя слияния клеток. В качестве ускорителя слияния
 50 клеток можно использовать, к примеру, полиэтиленгликоль (PEG), вирус Сендай (HVJ) и др., и можно добавить адъювант типа диметилсульфоксида для повышения эффективности слияния.

Предпочтительно соотношение между иммунными клетками и клетками миеломы составляет, к примеру, в 1-10 раз больше иммунных клеток, чем клеток миеломы. Примеры культуральных сред для слияния указанных клеток включают, к примеру, среду RPMI 1640 и культуральную среду МЕМ, которые пригодны для выращивания

5 указанных клеточных линий миеломы, а также стандартные культуральные среды, применяемые для культивирования клеток этого типа, с добавлением сыворотки, например, эмбриональной телячьей сыворотки (FCS).

При слиянии клеток заданные количества указанных иммунных клеток и клеток миеломы тщательно смешивают в указанной культуральной среде, в которую

10 добавлен раствор PEG, заранее подогретый примерно до 37°C, например, раствор PEG со средним молекулярным весом от 1000 до 6000, в концентрации от 30 до 60% (вес./об.), и перемешивают для получения требуемых слитых клеток (гибридом). Затем, повторяя поочередно добавление соответствующей культуральной среды и центрифугирование с удалением супернатанта, можно устранить те средства для

15 слияния клеток, которые нежелательны для роста гибридомы.

Гибридому подвергают селекции путем культивирования в стандартной селективной среде, например, культуральной среде НАТ (она содержит гипоксантин, аминоптерин и тимидин). Культивирование в среде НАТ обычно продолжают в течение времени, достаточного для гибели всех клеток, кроме требуемой гибридомы

20 (то есть не слившихся клеток), обычно от нескольких дней до нескольких недель. Выполняется стандартный метод предельного разведения, при этом проводится скринирование и клонирование гибридом, продуцирующих нужное антитело.

Наряду с получением гибридомы путем иммунизации животного (не человека) антигеном, также возможно сенситизировать лимфоциты человека *in vitro* с помощью

25 нужного антигенного белка или антиген-экспрессирующих клеток и получить сенситизированные В-лимфоциты, затем провести слияние их с клетками миеломы, например, линии U266, обладающей способностью к постоянному делению, и получить гибридому, продуцирующую нужное антитело человека, обладающее способностью к связыванию с требуемым антигеном или антиген-экспрессирующими

30 клетками (Japanese Post-examined Patent Publication (Kokoku) 1-59878). Кроме того, трансгенное животное с репертуаром генов антител человека можно иммунизировать антигеном или антиген-экспрессирующими клетками и получить нужное антитело человека в соответствии с указанным методом (см. International Patent Applications WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735).

Полученные таким образом гибридомы, продуцирующие моноклональные антитела, можно подрастить в стандартной культуральной среде или хранить в течение длительного времени в жидком азоте.

Для того чтобы получить моноклональные антитела из гибридомы, можно применить метод, в котором гибридому культивируют стандартным методом и

40 получают антитела в виде супернатанта, или метод, в котором гибридому имплантируют млекопитающему, совместимому с данной гибридомой, и выращивают в нем, а антитела получают в виде асцитов. Первый метод пригоден для получения антител высокой степени чистоты, тогда как второй подходит для широкомасштабной продукции антител.

Например, из гибридомы, продуцирующей антитело к рецептору IL-6, можно получить полипептид способом, раскрытым в Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 3-139293. Можно воспользоваться способом, в котором гибридому, продуцирующую антитело PM-1, которая была сдана 12 июля 1988 г. на

международное хранение по условиям Будапештского договора в Международный депозитарий патентуемых организмов в Национальном институте промышленной

50 науки и технологии (Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba City, Ibaraki Pref., 305-5466 Japan) как FERM BP-2998, вводят внутрибрюшинно мышам BALB/c для получения асцитов, из которых можно выделить антитело PM-1, или способом, в котором гибридому

культивируют в среде RPMI 1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 5% BM-Codimed H1 (фирмы Boehringer Mannheim), или в среде SFM для гибридом (фирмы Gibco BRL), среде PFHM-II (фирмы Gibco BRL) и т.п., из супернатанта которой можно выделить антитело PM-1.

5 В соответствии с настоящим изобретением в качестве моноклонального антитела можно использовать рекомбинантное антитело, полученное путем клонирования гена антитела из гибридомы, встраивания этого гена в соответствующий вектор, который вводится в организм хозяина для получения рекомбинантного антитела методами

10 генной инженерии (например, см. Borrebaeck C.A.K. and Larrick J.W., *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, published in the United Kingdom by Macmillan Publishers Ltd. 1990).

В частности, можно выделить мРНК, кодирующую переменную область (V-область) антитела, из клеток, продуцирующих данное антитело, например, гибридомы. Выделение мРНК проводится путем получения тотальной РНК одним из

15 известных методов, например, гуанидиновым методом с ультрацентрифугированием (Chirgwin J.M. et al., *Biochemistry* (1979) 18, 5294-5299), методом AGPC (Chomczynski P. et al., *Anal. Biochem.* (1987) 162, 156-159), после чего из тотальной РНК очищают мРНК с помощью набора для очистки мРНК (фирмы Pharmacia) и т.п. С другой стороны, можно сразу получить мРНК с помощью

набора для очистки мРНК Quick Prep (фирмы Pharmacia).

20 Из полученной таким образом мРНК можно синтезировать кДНК V-области антитела с помощью обратной транскриптазы. Синтезировать кДНК можно с помощью набора для синтеза первой нити кДНК с обратной транскриптазой AMV и т.п. С другой стороны, для синтеза и амплификации кДНК можно использовать набор 5'-Ampli Finder RACE (фирмы Clontech) и метод 5'-RACE (Frohman M.A. et

25 al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky A. et al., *Nucleic Acids Res.* (1989) 17, 2919-2932), в котором применяется ПЦР. Нужный фрагмент ДНК очищают из полученного продукта ПЦР и лигируют с ДНК вектором. Кроме того, из него конструируют рекомбинантный вектор и вводят его в *E. coli*, колонии которых подвергают селекции для получения нужного рекомбинантного вектора.

30 Последовательность оснований данной ДНК можно установить известным методом, например методом дидезоксиоснований.

После получения ДНК, кодирующей V-область требуемого антитела, ее можно лигировать с ДНК, кодирующей константную область (С-область) требуемого антитела, а затем встроить в экспрессионный вектор. С другой стороны,

35 кодирующую V-область антитела ДНК можно встроить в экспрессионный вектор, уже содержащий ДНК, кодирующую С-область антитела.

Для того чтобы получить антитело для использования в настоящем изобретении, ген антитела встраивают в экспрессионный вектор так, чтобы он экспрессировался под управлением особого регуляторного участка, например энхансера и/или

40 промотора. После этого экспрессионный вектор вводят путем трансформации в клетки хозяина, которые могут экспрессировать антитело.

В соответствии с настоящим изобретением, с целью уменьшения гетерологичной антигенности в отношении человека, могут применяться искусственно

45 модифицированные рекомбинантные антитела, такие как химерные антитела, гуманизированные антитела и антитела человека. Такие модифицированные антитела можно получить известными методами.

Химерные антитела можно получить путем лидирования уже полученной ДНК, кодирующей V-область антитела, с ДНК, кодирующей С-область антитела человека, а затем встроить в экспрессионный вектор и ввести в клетки хозяина для выработки в

50 них антител (см. European Patent Application EP 125023 и International Patent Application WO 92-19759). При помощи этого известного метода можно получить химерные антитела, применимые в настоящем изобретении.

Плазмиды, содержащие V-область L-цепи или V-область H-цепи химерного

антитела РМ-1, получили наименования рРМ-k3 и рРМ-h1, соответственно, и клетки *E. coli*, содержащие соответствующие плазмиды, были сданы 11 февраля 1991 г. на международное хранение по условиям Будапештского договора как NCIMB40366 и NCIMB40362 в Национальную коллекцию промышленных и морских бактерий (NCIMB Limited).

Гуманизированные антитела, которые также называют перестроенными антителами человека, получают путем пересадки участка комплементарности (CDR) из антитела млекопитающего (не человека), к примеру, антитела мыши, в CDR антитела человека. Общая технология рекомбинантной ДНК для получения таких антител также известна (см. European Patent Application EP 125023 и International Patent Application WO 92-19759).

В частности, последовательность ДНК, предназначенную для лигирования CDR антитела мыши с каркасным участком (FR) антитела человека, синтезируют из нескольких отдельных олигонуклеотидов, которые частично перекрывают друг друга на концах. Полученную при этом ДНК лигируют с ДНК, кодирующей С-область антитела человека, а затем встраивают в экспрессионный вектор, который вводят в клетки хозяина для получения антител (см. European Patent Application EP 239400 и International Patent Application WO 92-19759).

Для лигирования FR антитела человека с CDR выбирают такой CDR, который имеет подходящий антигенсвязывающий сайт. При желании можно заменить аминокислоты в участке FR V-области антитела с тем, чтобы CDR гуманизированного антитела мог образовать соответствующий антигенсвязывающий сайт (Sato K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

В качестве С-области антитела человека можно использовать, к примеру, С_γ1, С_γ2, С_γ3 или С_γ4. С-область антитела человека также можно модифицировать для того, чтобы улучшить стабильность антитела и его выработку.

Химерные антитела состоят из V-области антитела, происходящего не из человека, и С-области антитела человека, а гуманизированные антитела состоят из участка комплементарности (CDR) антитела, происходящего не из человека, и каркасного участка (FR) антитела человека, при этом их антигенность в организме человека уменьшается, поэтому они применимы в качестве антител для настоящего изобретения.

В качестве предпочтительного воплощения гуманизированного антитела для настоящего изобретения можно отметить гуманизированное антитело РМ-1 (см. International Patent Application WO 92-19759).

В качестве метода получения антител человека, наряду с описанными выше, известен метод получения антител человека посредством "кадрирования". Например, вариабельную область антитела человека экспрессируют на поверхности фага методом фагового дисплея в виде одноцепочечного антитела (scFv) и проводят селекцию фага, связывающего антиген. Анализируя ген отобранного фага, можно идентифицировать последовательность ДНК, кодирующую вариабельную область антитела человека, которая связывается с антигеном. После выяснения последовательности ДНК того scFv, которое связывается с антигеном, эту последовательность можно использовать для создания соответствующего экспрессионного вектора и получения антитела человека. Такие методы уже известны и их можно найти в WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 и WO 95/15388.

Гены антител, созданные как изложено выше, могут быть экспрессированы и получены одним из известных способов. В случае клеток млекопитающих экспрессия может осуществляться с помощью ДНК, в которой функционально связаны один из общеупотребительных промоторов, экспрессируемый ген антитела и сигнал полиА по 3'-сторону от него, либо с помощью содержащего ее вектора. В качестве промотора/ энхансера можно отметить, к примеру, самый ранний промотор/ энхансер

цитомегаловируса человека.

Кроме того, в качестве промотора/энхансера, который можно использовать для экспрессии антитела для настоящего изобретения, можно отметить промоторы/энхансеры таких вирусов, как ретровирусы, вирусы полиомы, аденовирусы и вирус-40 обезьян (SV40), и промоторы/энхансеры из клеток млекопитающих, такие как фактор элонгации человека 1 α (HEF1 α).

Например, экспрессию можно легко осуществить по методу Mulligan et al. (Mulligan R.C. et al., Nature (1979) 277, 108-114), если применяется промотор/энхансер SV40, и по методу Mizushima et al. (Mizushima S. and Nagata S., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322), если применяется промотор/энхансер HEF1 α .

В случае *E. coli* экспрессия может проводиться путем функционального соединения одного из общеупотребительных промоторов, сигнальной последовательности для секреции антитела и экспрессируемого гена антитела с последующей экспрессией. В качестве промотора можно отметить, к примеру, промотор lacZ и промотор araB. Можно использовать 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), если применяется промотор lacZ, и метод Better et al. (Better M. et al., Science (1988) 240, 1041-1043), если применяется промотор araB.

В качестве сигнальной последовательности для секреции антител, если они продуцируются в периплазме *E. coli*, можно использовать сигнальную последовательность pe1B (Lei S.P. et al., J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383). После выделения антител, продуцируемых в периплазме, структуру антител надлежащим образом восстанавливают перед употреблением (например, см. WO 96-30394).

В качестве начала репликации можно использовать те, что происходят из SV40, вируса полиомы, аденовирусов, вируса бычьей папилломы (BPV) и т.п. Кроме того, для амплификации числа копий гена в системе клеток хозяина, экспрессионные векторы могут включать, в качестве селективируемых маркеров, ген аминокликозидтрансферазы (APH), ген тимидинкиназы (ТК), ген ксантин-гуанин фосфорибозилтрансферазы *E. coli* (Ecogpt), ген дигидрофолатредуктазы (dhfr) и т.п.

Для получения антител для настоящего изобретения можно использовать любые системы продукции, причем системы продукции для получения антител включают системы продукции *in vitro* или *in vivo*. В качестве системы продукции *in vitro* можно отметить системы продукции, в которых применяются эукариотические клетки, и системы продукции, в которых применяются прокариотические клетки.

При использовании эукариотических клеток в системах продукции применяются клетки животных, клетки растений или клетки грибов. Известные клетки животных включают (1) клетки млекопитающих, такие как клетки CHO, клетки COS, клетки миеломы, почечные клетки хомячков (ВНК), клетки HeLa и клетки Vero; (2) клетки амфибий, такие как ооциты *Xenopus*; (3) клетки насекомых, такие как sf9, sf21 и Tn5. Известные клетки растений включают, к примеру, клетки из каллюсных культур *Nicotiana tabacum*. Известные клетки грибов включают дрожжевые клетки, например, из рода *Saccharomyces*, в частности *Saccharomyces cerevisiae*, или нитчатых грибов, например, из семейства *Aspergillus*, в частности *Aspergillus niger*.

При использовании прокариотических клеток в системах продукции применяются клетки бактерий. Известные клетки бактерий включают *Escherichia coli* и *Bacillus subtilis*.

При введении, путем трансформации, гена требуемого антитела в эти клетки и культивировании трансформированных клеток *in vitro* можно получить антитело. Культивирование проводится известными методами. Так, в качестве культуральной среды для клеток млекопитающих можно использовать DMEM, MEM, RPMI 1640, IMDM и т.п., в сочетании с добавлением сыворотки типа эмбриональной телячьей сыворотки (FCS). Кроме того, антитела можно получать *in vivo*, имплантируя клетки, в которые был введен ген антитела, в брюшную полость животного и т.д.

В качестве систем продукции *in vivo* можно отметить системы, в которых применяются животные, и системы, в которых применяются растения. При использовании животных в системах продукции применяются млекопитающие или насекомые.

Из млекопитающих можно использовать коз, свиней, овец, мышей и коров (Vicki Glaser, Spectrum Biotechnology Applications, 1993). Из насекомых можно использовать шелковичных червей, а в случае растений, к примеру табак.

Гены антител вводят в такие животные и растения, в которых их продуцируют, а затем выделяют. Например, гены антител встраивают посреди гена, кодирующего белок, который непременно вырабатывается в молоке, к примеру, козий β -казеин, и получают слитые гены. Фрагменты ДНК, содержащие слитый ген, в который был вставлен ген антитела, впрыскивают в козий эмбрион и вводят его козе. Требуемое антитело получают из молока, вырабатываемого трансгенной козой, рожденной от той козы, что получила эмбрион или его потомство. Для того чтобы повысить количество молока, содержащего требуемое антитело, вырабатываемое трансгенной козой, ей можно вводить гормоны при необходимости (Ebert K.N. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702).

При использовании шелковичных червей их инфицируют бакуловирусом, в который был вставлен ген нужного антитела, и требуемое антитело можно получить из жидкой среды организма шелковичного червя (Maeda S. et al., Nature (1985) 315, 592-594). Кроме того, при использовании табака ген нужного антитела встраивают в экспрессионный вектор для растений, к примеру pMON530, а затем вектор вводят в бактерию типа *Agrobacterium tumefaciens*. Затем бактерию используют для инфицирования табака типа *Nicotiana tabacum* для получения требуемого антитела из листьев табака (Julian K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138).

При получении антител в системе продукции *in vitro* или *in vivo*, как указано выше, ДНК, кодирующую тяжелую цепь (Н-цепь) или легкую цепь (L-цепь) антитела, по отдельности встраивают в экспрессионный вектор, а клетки хозяина трансформируют одновременно, либо ДНК, кодирующую Н-цепь или L-цепь антитела, встраивают в один экспрессионный вектор и трансформируют им клетки хозяина (см. International Patent Application WO 94-11523).

Антитела для настоящего изобретения могут представлять собой фрагменты антител или их модифицированные варианты, если только они предпочтительно применяются в настоящем изобретении. Например, в качестве фрагментов антител можно отметить Fab, F(ab)₂, Fv или одноцепочечные Fv (scFv), в которых Fv цепей Н и L соединены через соответствующий линкер.

В частности, антитела обрабатывают ферментом, например папаином или пепсином, получая фрагменты антител, либо конструируют гены, кодирующие эти фрагменты антител, а затем встраивают в экспрессионный вектор, который экспрессируют в соответствующих клетках хозяина (к примеру, см. 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 можно получить путем лигирования V-области Н-цепи с V-областью L-цепи антитела. В scFv V-область Н-цепи лигирована с V-областью L-цепи предпочтительно через линкер, предпочтительно пептидный линкер (Huston J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 5879-5883). V-область Н-цепи и V-область L-цепи в scFv могут происходить из любого из вышеуказанных антител. В качестве пептидного линкера для лигирования этих V-областей можно использовать любой одноцепочечный пептид, к примеру, состоящий из 12-19 аминокислотных остатков.

ДНК, кодирующую scFv, можно получить, используя в качестве матрицы ДНК, кодирующую Н-цепь или V-область Н-цепи данного антитела, и ДНК, кодирующую

L-цепь или V-область L-цепи данного антитела, амплифицируя отрезок ДНК, кодирующей требуемую аминокислотную последовательность из числа указанных, методом ПЦР с помощью пары праймеров, определяющих оба конца ее, а затем амплифицируя ДНК, кодирующую отрезок пептидного линкера, вместе с парой праймеров, определяющих, что оба конца данной ДНК будут дотированы с Н-цепью и L-цепью соответственно.

После конструирования ДНК, кодирующей scFv, можно получить стандартными методами экспрессионный вектор и клетки хозяина, трансформированные данным вектором, после чего получить scFv из клеток хозяина стандартными методами.

Такие фрагменты антител можно получить, создавая их гены таким же образом, как указано выше, и осуществляя их экспрессию в клетках хозяина. "Антитело" в настоящем изобретении охватывает и эти фрагменты антител.

Из числа модифицированных антител можно использовать антитела, связанные с различными молекулами типа полиэтиленгликоля (PEG). "Антитело" в настоящем изобретении охватывает и эти модифицированные антитела. Их можно получить путем химической модификации полученных антител. Такие методы уже признаны в этой области.

Антитела, экспрессированные и полученные, как описано выше, можно выделить из внутренней или внешней среды клеток или хозяина, а затем очистить до гомогенного состояния. Выделение и очистка антител для настоящего изобретения может осуществляться методом аффинной хроматографии. Из колонок, применяемых для аффинной хроматографии, можно отметить колонки с белком А и колонки с белком G. Примеры носителей для колонок с белком А включают, к примеру, Нурер D, POROS, Sepharose F.F. (Pharmacia) и т.п. Кроме того, можно использовать общепотребительные методы выделения и очистки белков, без какого-либо ограничения.

Другие методы хроматографии, отличные от аффинной хроматографии, фильтры, гель-фильтрацию, высаливание, диализ и т.д. можно выбирать и комбинировать соответствующим образом для выделения и очистки антител для настоящего изобретения. Хроматография включает, к примеру, ионообменную хроматографию, гидрофобную хроматографию, гель-фильтрацию и т.п. Эти разновидности хроматографии можно применять в виде высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Также можно использовать обратнотазовую HPLC (rpHPLC).

Концентрацию антител, полученных как описано выше, можно определить путем измерения поглощения или методом ELISA и др. Так, при использовании измерений поглощения полученные антитела соответствующим образом разводят буфером PBS(-) и измеряют поглощение при 280 нм, после чего проводят расчеты, используя коэффициент поглощения 1,35 OD при 1 мг/мл. При использовании метода ELISA измерения проводят следующим образом. Так, в микропланшет на 96 лунок (фирмы Nunc) вносят по 100 мкл козьих антител против IgG человека (фирмы Tago), разведенных до 1 мкг/мл в 0,1 М бикарбонатном буфере, pH 9,6, и инкубируют при 4°C для иммобилизации антител. После блокирования добавляют по 100 мкл разведенных антител для настоящего изобретения или содержащих антитела образцов, либо IgG человека (фирмы Carpel) в качестве стандарта, и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа.

После отмывки добавляют 100 мкл разведенного в 5000 раз меченного щелочной фосфатазой антитела против IgG человека (фирмы BioSource) и инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа. После отмывки добавляют раствор субстрата и инкубируют, после чего измеряют поглощение при 405 нм на считывающем приборе для микропланшетов Model 3550 (фирмы Bio-Rad) и рассчитывают концентрацию данных антител.

Перестроенный IL-6 для настоящего изобретения представляет собой вещество, обладающее активностью связывания с рецептором IL-6, но не вызывающее передачи

биологической активности IL-6. Так, несмотря на то, что перестроенный IL-6 конкурирует с IL-6 за связывание с рецептором IL-6, он не распространяет биологическую активность IL-6, поэтому перестроенный IL-6 блокирует передачу сигналов IL-6.

5 Перестроенный IL-6 можно получить введением мутаций путем замены аминокислотных остатков в аминокислотной последовательности IL-6. Перестроенный IL-6 можно получить из IL-6 любого происхождения, однако предпочтительно он представляет собой IL-6 человека, учитывая антигенность и т.п.

В частности, можно установить вторичную структуру аминокислотной
10 последовательности IL-6 с помощью одной из известных программ молекулярного моделирования типа WHATIF (Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 32-56) и оценить влияние на нее всех замен аминокислотных остатков. После определения подходящих аминокислотных остатков можно ввести мутации, используя вектор, содержащий последовательность оснований IL-6 человека, в качестве матрицы для
15 общеупотребительного метода ПЦР с тем, чтобы произвести замену аминокислот и тем самым получить ген, кодирующий перестроенный IL-6. Его можно встроить, соответствующим образом, в подходящий экспрессионный вектор для получения перестроенного IL-6 в соответствии с указанными выше методами экспрессии, продукции и очистки рекомбинантных антител.

20 Конкретные примеры перестроенных IL-6 раскрыты в Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93; Saviono et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367; WO 96-18648 и WO 96-17869.

Частичные пептиды IL-6 или частичные пептиды рецептора IL-6 для настоящего изобретения представляет собой вещества, обладающие активностью связывания с
25 рецептором IL-6 или IL-6 соответственно, но не вызывающие передачи биологической активности IL-6. Так, частичные пептиды IL-6 или частичные пептиды рецептора IL-6 связываются с и захватывают рецептор IL-6 или IL-6 соответственно, и таким образом специфически ингибируют связывание IL-6 или рецептора IL-6. В результате этого они не позволяют передачу биологической активности IL-6 и тем самым блокируют
30 передачу сигналов IL-6.

Частичные пептиды IL-6 или частичные пептиды рецептора IL-6 - это пептиды, содержащие часть или всю аминокислотную последовательность, участвующую в связывании IL-6 или рецептора IL-6, в аминокислотной последовательности IL-6 или рецептора IL-6. Такие пептиды обычно содержат 10-80 аминокислотных остатков,
35 предпочтительно 20-50 аминокислотных остатков, более предпочтительно 20-40 аминокислотных остатков.

Частичные пептиды IL-6 или частичные пептиды рецептора IL-6 определяются участками, участвующими в связывании IL-6 или рецептора IL-6, в аминокислотной последовательности IL-6 или рецептора IL-6, и часть или всю эту аминокислотную
40 последовательность можно получить одним из общеизвестных методов, таких как методы генной инженерии или пептидного синтеза.

Для того чтобы получить частичные пептиды IL-6 или частичные пептиды рецептора IL-6 методами генной инженерии, последовательность ДНК, кодирующую требуемый пептид, можно встроить в экспрессионный вектор таким образом, что их
45 можно будет получить указанными выше методами экспрессии, продукции и очистки рекомбинантных антител.

Для того чтобы получить частичные пептиды IL-6 или частичные пептиды рецептора IL-6 методами пептидного синтеза, можно использовать один из общеупотребительных методов пептидного синтеза, например твердофазного синтеза
50 или жидкофазного синтеза.

В частности, можно использовать методы, описанные в "Zoku Iyakuhinno Kaihatsu, Vol. 14: Peptide Synthesis" edited by Haruaki Yajima, Hirokawa Shoten, 1991. Из методов твердофазного синтеза можно использовать метод, в котором аминокислоту,

соответствующую С-концу синтезируемого пептида, присоединяют к подложке, нерастворимой в органических растворителях, а затем проводят реакцию конденсации аминокислот, у которых α -аминогруппа и функциональная группа боковой цепи были заблокированы соответствующими защитными группами, одну за одной в направлении от С-конца к N-концу, чередуясь с реакцией, в которой группа, блокирующая α -аминогруппу аминокислоты или пептида, связанного со смолой, подвергается элиминации, и происходит удлинение цепи пептида. Твердофазный пептидный синтез ориентировочно подразделяется на метод Вос и метод Fmoc в зависимости от типа защитных групп.

После синтеза нужного пептида может проводиться реакция деблокирования или реакция отщепления пептидной цепи от подложки. Для реакции отщепления пептидных цепей в методе Вос применяется HF или трифторметансульфоновая кислота, а в методе Fmoc обычно применяется TFA. В методе Вос смоле с заблокированным пептидом обрабатывают HF в присутствии анизол. После этого можно проводить элиминацию защитной группы и отщепление от подложки для получения пептида. После его лиофилизации получают неочищенный пептид. С другой стороны, в методе Fmoc реакцию деблокирования и реакцию отщепления пептидной цепи от подложки можно проводить способом, аналогичным вышеописанному.

Полученный неочищенный пептид можно подвергнуть HPLC для его выделения и очистки. При элюировании можно использовать растворитель вода-ацетонитрил, обычно применяемый при очистке белков, в оптимальных условиях. Собирают фракции, соответствующие пикам на хроматограмме, а затем лиофилизируют. В очищенных таким образом пептидных фракциях проводится определение молекулярного веса методом масс-спектропии, анализ аминокислотного состава или анализ аминокислотной последовательности для их идентификации.

Конкретные примеры частичных пептидов IL-6 и частичных пептидов рецептора IL-6 раскрыты в Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 2-188600, Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 7-324097, Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) No. 8-311098 и U.S. Patent Publication US 5210075.

Ингибирование активности сигнального пути IL-6 антагонистами IL-6 настоящего изобретения можно оценить общеизвестными методами. В частности, выращивают культуру IL-6-зависимой линии клеток миеломы человека (S6B45, KPM2), Т-лимфомы Леннерта КТ3 или IL-6-зависимых клеток HN60, BSF2, в нее добавляют IL-6 и в то же время, в присутствии антагониста IL-6, определяют включение меченного ^3H -тимидина IL-6-зависимыми клетками. В качестве альтернативы можно добавлять меченный ^{125}I -IL-6 одновременно с антагонистом IL-6, а затем для оценки определять количество меченного ^{125}I -IL-6, связавшегося с экспрессирующими IL-6 клетками. В этих системах определения, наряду с группой, в которой присутствует антагонист IL-6, также ставят пробы на отрицательный контроль, не содержащие антагониста IL-6, и сравнивают результаты, полученные в обеих группах, для оценки ингибирования активности IL-6 антагонистом IL-6.

Как показывают приведенные ниже Примеры, поскольку наблюдались терапевтические эффекты при введении антител к рецептору IL-6 детям, страдающим хроническим артритом, то это свидетельствует, что антагонисты IL-6 типа антител к рецептору IL-6 обладают терапевтическим эффектом в отношении заболеваний, родственных детским хроническим артритным заболеваниям.

Объектами лечения в настоящем изобретении являются млекопитающие. Из млекопитающих объектом лечения предпочтительно является человек.

Терапевтические средства по настоящему изобретению для заболеваний, родственных детским хроническим артритным заболеваниями, можно назначать перорально или парентерально, для системного или местного применения. Например, можно выбрать внутривенное введение типа капельного вливания, внутримышечное

введение, внутривенное введение, подкожное введение, свечи, клизмы, таблетки с энтеросолюбильным покрытием и т.д., а дозовую схему выбирают по обстановке в зависимости от возраста и состояния пациента. Эффективную дозу выбирают в пределах от 0,01 мг до 100 мг на 1 кг веса тела за один прием. С другой стороны, можно выбрать дозу от 1 до 1000 мг, предпочтительно от 5 до 50 мг, на одного пациента.

Предпочтительно доза и способ введения, например, в случае антител к рецептору IL-6, составляют такую эффективную дозу, которая обеспечивает свободные антитела в крови, в частности от 0,5 мг до 40 мг, предпочтительно от 1 мг до 20 мг на 1 кг веса тела за 1 месяц (4 недели), которые можно вводить за один прием или разделить на несколько приемов, например, 2 раза в неделю, 1 раз в неделю, 1 раз в 2 недели, 1 раз в 4 недели и т.д., например внутривенно, к примеру, капельным вливанием, или подкожно. Схему введения можно модифицировать, удлиняя интервалы от 2 раз в неделю или 1 раза в неделю до 1 раза в 2 недели, 1 раза в 3 недели, 1 раза в 4 недели и т.д., в зависимости от наблюдаемых симптомов и анализов крови.

Терапевтические средства по настоящему изобретению для заболеваний, родственных детским хроническим артритным заболеваниям, могут содержать фармацевтически приемлемые носители и добавки в зависимости от способа введения. Примеры таких носителей или добавок включают воду, фармацевтически приемлемые органические растворители, коллаген, поливиниловый спирт, поливинилпирролидон, карбоксиполимерные полимеры, натриевую карбоксиметилцеллюлозу, полиакрилат натрия, альгинат натрия, водорастворимый декстран, натриевый карбоксиметилкрахмал, пектин, метилцеллюлозу, этилцеллюлозу, ксантан, гуммиарабик, казеин, желатин, агар, диглицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, вазелин, парафин, стеариловый спирт, стеариновую кислоту, сывороточный альбумин человека (BSA), маннитол, сорбитол, лактозу, фармацевтически приемлемые детергенты и т.п. Фактически используют добавки, выбранные из вышеперечисленных, не ограничиваясь ими, или их комбинации, в зависимости от лекарственной формы.

Примеры

Настоящее изобретение раскрывается более конкретно ниже с привлечением Рабочих примеров и Контрольных примеров, однако следует иметь в виду, что настоящее изобретение не ограничивается этими примерами никоим образом.

Рабочий пример 1

Лечению с помощью MRA (гуманизированного антитела к рецептору IL-6) подвергали пациента (5 лет, мужского пола) с юношеским ревматоидным артритом системного типа со следующей историей болезни.

История болезни до лечения

Развивались симптомы с повышением температуры при расслаблении (лихорадка с одним подъемом температуры до 40°C в течение нескольких дней), артралгией в обоих коленях и антемой. После постановки диагноза на основании лейкоцитоза, отрицательного анализа на антиядерные антитела, отрицательного анализа на ревматоидный фактор, повышенной скорости оседания эритроцитов, высокого уровня С-реактивного белка (CRP) и т.д. было начато введение аспирина, однако не наблюдалось уменьшения температуры при расслаблении и артралгии, и общее состояние ухудшилось. Поэтому его заменили пероральным введением ударной дозы стероида (преднизолон, 30 мг/день) для скорейшего улучшения различных симптомов. Однако при постепенном снижении дозы преднизолона симптомы возобновились при 10 мг/день, пациент снова был госпитализирован, подвергнут курсу лечения метилпреднизолоном (mPSL) и плазмаферезу, а затем комбинировали с циклоспорином А (CsA) без какого-либо улучшения. Симптомы были тяжелыми (лейкоциты 25 400/мкл, CRP 11,2 мг/дл), проводили плазмаферез + курс лечения mPSL +

CsA и пациент перешел в состояние ремиссии. В качестве долечивания давали преднизолон + фробен для уменьшения температуры при расслаблении и было клинически отмечено снижение температуры, однако связанные с воспалением анализы крови оставались высокими (CRP > 5 мг/дл) и после выписки из больницы периодически отмечалось повышение температуры при расслаблении, однако лечение и наблюдение продолжали в основном амбулаторно. Но пациент начал жаловаться на боли в спине, которые осложнялись высокой температурой, и после тщательного осмотра при помощи МВІ и т.д. были выявлены деструктивные повреждения в 4-м и 5-м грудных позвонках, свидетельствующие о компрессионных переломах. Из-за необходимости облегчить нагрузку на грудные позвонки был прописан постельный режим на 1 год, вследствие чего мышцы нижних конечностей заметно ослабели и хождение стало совсем невозможным. Была продолжена тройная терапия преднизолон + фробен + CsA, но CRP не уменьшался ниже 5 мг/дл.

Результат лечения

Введение начали с 2 мг/кг. Поскольку не наблюдалось побочных эффектов, дозу увеличили до 4 мг/кг по схеме 1 раз в неделю. Наблюдавшаяся до этого лихорадка быстро прошла, а примерно через 2 недели анализ на CRP дал отрицательный результат. Общее недомогание прошло и состояние пациента несколько улучшилось. Стало возможным постепенное снижение дозы преднизолона до 1 мг/день.

Как видно из этих результатов, MRA оказался эффективным при лечении детского хронического артритного заболевания, симптомы которого не удавалось контролировать даже такими нестероидными противовоспалительными препаратами, как аспирин и фробен, длительным приемом ударных доз стероидов (преднизолона и метилпреднизолона) и такими иммунодепрессантами, как циклоспорин А и метотрексат. Следовательно, можно утверждать, что антагонисты IL-6, в частности антитела к рецептору IL-6, эффективны в качестве терапевтического средства для детских хронических артритных заболеваний, в частности системного типа по классификации ARA, системного типа по классификации EULAR, системного типа по классификации ILAR и синдрома SPRASH по классификации авторов настоящего изобретения.

Рабочий пример 2

Женщина 22 лет. В апреле 1998 г. возникла пятнистая эритема на бедре, в области сердца и на пальцах, а в мае появилась артралгия в области плеча, локтей и коленей, а также температура от 38 до 39°C. Несмотря на прием нестероидных противовоспалительных препаратов (NSAIDs), температура оставалась высокой, и в июле с показателями лейкоцитов 18 100/мкл, CRP 18,3 мг/дл и ферритина в сыворотке 440 нг/мл пациентке был поставлен диагноз взрослой формы болезни Стилла. С начала января 2000 г. появилась температура от 39 до 40°C и артралгия, что приписали приступу взрослой формы болезни Стилла (CRP 15,8 мг/дл, ферритин 205,8 нг/мл).

Поскольку было трудно уменьшить дозу стероидов, их применяли в комбинации с метотрексатом (MTX) и циклоспорином А (CsA), но это не помогло сдержать развитие болезни, которая затрудняла дыхание, так что пациентку поставили под надзор на случай искусственного дыхания. Несмотря на то, что стероидная терапия несколько улучшила течение болезни, было начато лечение с помощью гуманизированного антитела к рецептору IL-6 вследствие осложнения тяжелым остеопорозом. MRA (200 мг) вводили путем капельного внутривенного вливания через каждые 2 недели. Воспалительная реакция стала отрицательной на 6-й день после введения, снижение дозы кортикостероидов протекало спокойно и не наблюдалось тяжелых побочных эффектов.

Как видно из этих результатов, MRA оказался эффективным при лечении взрослой формы болезни Стилла, симптомы которой не удавалось контролировать даже при комбинированном применении MTX и CsA. Следовательно, можно утверждать, что

антагонисты IL-6, в частности антитела к рецептору IL-6, эффективны в качестве терапевтического средства для болезни Стилла, в частности взрослой формы болезни Стилла.

Контрольный пример 1. Получение растворимого рецептора IL-6 человека

Растворимый рецептор IL-6 был получен методом ПЦР с помощью плазмиды pBSF2R.236, содержащей кДНК, кодирующую рецептор IL-6 и полученную методом Yamasaki et al. (Yamasaki et al., Science (1988) 241, 825-828).

Плазмиду pBSF2R.236 расщепляли рестрикционным ферментом SphI, получая кДНК рецептора IL-6, которую вставляли в mp18 (фирмы Amersham). С помощью синтетического праймера, созданного для введения стоп-кодона в кДНК рецептора IL-6, вводили мутацию в кДНК рецептора IL-6 методом ПЦР при помощи системы мутагенеза in vitro (фирмы Amersham). Таким способом был введен стоп-кодон в положении аминокислоты 345 и была получена кДНК, кодирующая растворимый рецептор IL-6.

Для экспрессии растворимого рецептора IL-6 в клетках CHO ее лигировали с плазмидой pSV (фирмы Pharmacia), получая плазмиду pSVL344. кДНК растворимого рецептора IL-6, расщепленную ферментами HindIII-SalI, встраивали в плазмиду pCEdhfr, содержащую кДНК dhfr, получая плазмиду pCEdhfr344 для экспрессии в клетках CHO.

10 мкг плазмиды pCEdhfr344 трансфецировали в клетки dhfr-CHO линии DXB-11 (Urlaub G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) методом осаждения фосфатом кальция (Chen et al., Mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745-2751). Трансфецированные клетки CHO культивировали в течение 3 недель в лишенной нуклеозидов селективной среде α MEM, содержащей 1 mM глутамина, 10% диализованной FCS, пеницилин и стрептомицин (по 100 ед./мл).

Прошедшие селекцию клетки CHO скринировали методом предельного разведения до получения единичного клона клеток CHO. Клон клеток CHO выращивали в присутствии 20-200 нМ метотрексата для выделения продуцирующей растворимый рецептор IL-6 человека линии 5E27 клеток CHO. Клетки CHO линии 5E27 культивировали в модифицированной Iscov среде Дюльбекко (IMDM, фирмы Gibco) с добавлением 5% FCS. Собирали супернатант культуры и определяли в нем концентрацию растворимого рецептора IL-6 методом ELISA. Результаты подтвердили присутствие растворимого рецептора IL-6 в супернатанте культуры.

Контрольный пример 2. Получение антитела к IL-6 человека

Для иммунизации мышей BALB/c использовали 10 мкг IL-6 тканевого типа (Hirano et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41) вместе с полным адъювантом Фрейнда, повторяя иммунизацию каждую неделю до тех пор, пока не обнаруживались антитела к IL-6 в сыворотке. Иммунные клетки выделяли из местных лимфатических узлов и сливали с клетками миеломы линии P3U1 с помощью полиэтиленгликоля 1500. Селекцию гибридом проводили по методу Oi et al. (Selective Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980), используя культуральную среду НАТ, чтобы получить гибридому, продуцирующую антитела к IL-6 человека.

Гибридому, продуцирующую антитела к IL-6 человека, подвергали анализу на связывание IL-6 следующим образом. Так, микропланшет на 96 лунок (фирмы Dynatech Laboratories Inc., Alexandria, VA) из гибкого поливинила покрывали в течение ночи 100 мкл козьих антител против IgG мыши (10 мкг/мл, фирмы Cooper Biomedical Inc., Malvern, PA) в 0,1 М бикарбонатном буфере (pH 9,6) при 4°C. Затем планшет обрабатывали 100 мкл PBS, содержащего 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA), при комнатной температуре в течение 2 часов.

После отмывки планшета PBS в каждую лунку добавляли 100 мкл супернатанта культуры гибридомы и инкубировали в течение ночи при 4°C. После отмывки планшета в каждую лунку добавляли меченный 125 I-IL-6 рекомбинантного типа до 2000 cpm/0,5 нг/ лунку и после отмывки измеряли радиоактивность в каждой лунке

на гамма-счетчике (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA). Из 216 клонов гибридомы 32 клон были положительными при анализе на связывание IL-6. Наконец, из этих клонов был отобран стабильный клон МН166.BSF2. Антитело МН166 к IL-6 принадлежит к подтипу к-IgG1.

Затем, с помощью IL-6-зависимого клон МН60.BSF2 гибридомы мыши, исследовали нейтрализующую активность антитела МН166 в отношении роста гибридомы. Клетки МН60.BSF2 разделяли на порции по 1×10^4 /200 мкл/лунку, к ним добавляли образец, содержащий антитело МН166, и культивировали в течение 48 часов. После добавления 0,5 мкКи/лунку ^3H -тимидина (New England Nuclear, Boston, MA) культивирование продолжали еще 6 часов. Клетки помещали на стекловолоконный фильтр и подвергали обработке на автоматическом манипуляторе (Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan). В качестве контроля использовали кроличье антитело к IL-6.

Результаты показали, что антитело МН166 ингибировало индуцированное IL-6 включение ^3H -тимидина клетками МН60.BSF2 дозозависимым образом. Это показывает, что антитело МН166 нейтрализует активность IL-6.

Контрольный пример 3. Получение антитела к рецептору IL-6 человека

Антитело МТ18 к рецептору IL-6, полученное по методу Hirata et al. (Hirata Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906), конъюгировали с CNBr-активированной сефарозой 4В (фирмы Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) для очистки рецептора IL-6 (Yamasaki et al., Science (1988) 241, 825-828). Клетки миеломы человека линии U266 солибилизировали в дигитониновом буфере, содержащем 1% дигитонина (фирмы Wako Pure Chemicals), 1 мМ пара-аминофенилметансульфонилфторид гидрохлорида (фирмы Wako Pure Chemicals), 10 мМ триэтаноламина (pH 7,8) и 0,15 М NaCl, и смешивали с антителом МТ18, конъюгированным с бусинами сефарозы 4В. После этого бусины промывали 6 раз дигитониновым буфером перед выделением частично очищенного рецептора IL-6.

Мышей BALB/c иммунизировали этим частично очищенным рецептором IL-6, полученным из 3×10^9 клеток U266, четыре раза через каждые 10 дней, а затем получали гибридому стандартным методом. Супернатанты культуры гибридомы из положительных по росту лунок анализировали на активность связывания рецептора IL-6 следующим образом. 5×10^7 клеток U266 метили ^{35}S -метионином (2,5 мКи) и солибилизировали в дигитониновом буфере. Солиблизированные клетки U266 смешивали с 0,04 мл антитела МТ18, конъюгированного с бусинами сефарозы 4В, а затем промывали 6 раз дигитониновым буфером. Меченный ^{35}S -метионином рецептор IL-6 элюировали при помощи 0,25 мл дигитонинового буфера (pH 3,4) и нейтрализовали с помощью 0,025 мл 1 М трис, pH 7,4.

0,05 мл супернатанта культуры гибридомы смешивали с 0,01 мл белок G-сефарозы (фирмы Pharmacia). После отмывки сефарозу инкубировали с 0,005 мл раствора меченого ^{35}S -метионином рецептора IL-6. Выпавшие при иммунопреципитации вещества анализировали методом SDS-PAGE для выявления супернатанта культуры гибридомы, реагирующего с рецептор IL-6. В результате этого был установлен положительный клон гибридомы РМ-1. Антитело, полученное из гибридомы РМ-1, принадлежит к подтипу к-IgG1.

Активность антитела, вырабатываемого гибридомой РМ-1, в ингибировании связывания IL-6 с рецептором IL-6 оценивали с помощью клеток миеломы человека линии U266. Рекомбинантный IL-6 человека получали из E. coli (Hirano et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41-45) и метили ^{125}I с помощью реактива Болтона-Хантера (New England Nuclear, Boston, MA) (Taga et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981).

4×10^5 клеток U266 культивировали в присутствии 70% (V/V) супернатанта культуры гибридомы РМ-1 и 14 000 cpm меченого ^{125}I -IL-6 в течение 1 часа. Отбирали 70 мкл и наслаивали на 300 мкл FCS в полиэтиленовой микроцентрифужной пробирке на 400

мкл, центрифугировали, а затем определяли радиоактивность клеток.

Результаты показали, что антитело, вырабатываемое гибридомой РМ-1, ингибирует связывание IL-6 с рецептором IL-6.

Контрольный пример 4. Получение антитела к рецептору IL-6 мыши

Моноклональное антитело к рецептору IL-6 мыши получали по методу Saito T. et al., J. Immunol. (1991) 147, 168-173.

Клетки СНО, вырабатывающие растворимый рецептор IL-6 мыши, культивировали в среде IMDM с добавлением 10% FCS. Из супернатанта культуры очищали растворимый рецептор IL-6 мыши на колонке для аффинной хроматографии, в которой антитело RS12 (см. выше Saito T. et al.) к рецептору IL-6 мыши было иммобилизовано в геле Affigel 10 (фирмы BioRad).

50 мкг полученного при этом растворимого рецептора IL-6 мыши смешивали с полным адъювантом Фрейнда и вводили внутривентрально крысам Вистар. Через 2 недели крысы получали подкрепляющую иммунизацию с неполным адъювантом Фрейнда. На 45-й день извлекали клетки селезенки и 2×10^8 клеток подвергали слиянию с 1×10^7 клеток миеломы мыши линии Р3У1 стандартным методом с помощью 50% PEG 1500 (фирмы Boehringer Mannheim), а затем скринировали гибридомы в среде НАТ.

После нанесения супернатанта культуры на планшет, покрытый кроличьим антителом против IgG крыс (фирмы Cappel), проводили реакцию с растворимым рецептором IL-6 мыши. Затем проводили скринирование гибридом, вырабатывающих антитела к растворимому рецептору IL-6 мыши, методом ELISA с применением кроличьего антитела к рецептору IL-6 мыши и меченного щелочной фосфатазой овечьего антитела против IgG кролика. Клоны гибридомы, у которых была подтверждена продукция антител, подвергали повторному скринированию еще 2 раза для получения одиночного клона гибридомы. Этот клон получил обозначение MR 16-1.

Нейтрализующую активность антитела, вырабатываемого этой гибридомой, в отношении передачи сигнала IL-6 мыши исследовали по включению ^3H -тимидина клетками МН60.BSF2 (Matsuda T. et al., J. Immunol. (1988) 18, 951-956). На 96-луночный планшет наносили клетки МН60.BSF2 по 1×10^4 клеток/200 мкл/ лунку. В тот планшет добавляли 10 пг/мл мышинового IL-6 и антитело MR16-1 или RS12 в количестве от 12,3 до 1000 нг/мл и культивировали при 37°C в 5% CO_2 в течение 44 часов, после чего добавляли 1 мКи/ лунку ^3H -тимидина. Через 4 часа измеряли включение ^3H -тимидина. Результаты показали, что антитело MR16-1 ингибировало включение ^3H -тимидина клетками МН60.BSF2.

Таким образом, было показано, что антитело, вырабатываемое гибридомой MR16-1 (FERM BP-5874), ингибирует связывание IL-6 с рецептором IL-6.

Формула изобретения

1. Применение гуманизированных антител РМ-1 к человеческому рецептору интерлейкина-6 (IL-6R) для получения терапевтического агента для лечения детских хронических артритных заболеваний.

2. Применение по п.1, при котором гуманизированное антитело к IL-6R представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело или человеческое гуманизированное антитело.

3. Применение по п.2, при котором гуманизированное антитело к IL-6R представляет собой гуманизированное антитело РМ-1.

4. Применение по любому из пп.1-3, где детские хронические артритные заболевания представляют собой: по классификации АРА-системные, многосуставные и малосуставные; по классификации EULAR-системные, многосуставные и олигосуставные; по классификации ILAR-системные, многосуставные (RF - положительные), многосуставные (RF - отрицательные), олигоартрит и расширенный

олигоартрит; по классификации авторов настоящего изобретения - первичные детские хронические артритные заболевания (синдром SPRASH, идиопатические детские хронические артритные заболевания - а) положительные на ревматоидный фактор (RF - положительный тип), б) положительные на антиядерные антитела (ANA - положительный тип), с) RF/ANA - отрицательный тип).

5. Применение гуманизированных антител РМ-1 к человеческому IL-R6 для получения терапевтического агента для лечения детской формы болезни Стилла.

10

15

20

25

30

35

40

45

50