



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 86587

(13) C2

(51) МПК (2009)

A61K 39/395

A61K 31/519

A61P 19/02 (2008.04)

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(54) ЛІКУВАННЯ РЕВМАТОЇДНОГО АРТРИТУ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ АНТИТІЛА ПРОТИ РЕЦЕПТОРА IL-6 І МЕТОТРЕКСАТУ

1

(21) а200511196

(22) 28.04.2004

(24) 12.05.2009

(86) РСТ/JP2004/006211, 28.04.2004

(31) 0309619.5

(32) 28.04.2003

(33) GB

(46) 12.05.2009, Бюл.№ 9, 2009 р.

(72) ОКУДА ОСАМУ, JP/JP, ЙОСИДА НОРИАКИ,  
JP/JP, МАЙНІ РАВІНДЕР НАТ, GB/GB

(73) ЦУГАЙ СЕЙЯКУ КАБУСІКІ КАЙСА

(56) US 5210075 A, 11.05.1993

CHOY E H S ET AL: "Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial." ARTHRITIS AND RHEUMATISM. DEC 2002, vol. 46, no. 12, December 2002 (2002-12), pages 3143-3150, XP002298379

NISHIMOTO ET AL: "Safety and efficacy of repetitive treatment with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody (MRA) in rheumatoid arthritis." ARTHRITIS AND RHEUMATISM, vol. 44, no. S9-191, 2002, pages S84-S84, XP002298380

EP 1074268 A, 07.02.2001

WO 97/10338 A, 20.03.1997

WO 99/64070 A, 16.12.1999

(57) 1. Фармацевтична композиція для лікування ревматоїдного артриту, що включає антитіло проти рецептора IL-6 (антитіло до IL-6R) і Метотрексат (MTX).

2. Фармацевтична композиція за п. 1, в якій антитіло до IL-6R є моноклональним антитілом.

3. Фармацевтична композиція за п. 1 або 2, в якій антитіло до IL-6R є антитілом до IL-6R людини.

4. Фармацевтична композиція за п. 1, в якій антитіло до IL-6R є рекомбінантним антитілом.

5. Фармацевтична композиція за п. 1, в якій антитіло до IL-6R є химерним антитілом, гуманізованим антитілом або людським антитілом.

2

6. Фармацевтична композиція за п. 1, в якій антитіло до IL-6R є антитілом РМ-1.

7. Фармацевтична композиція за п. 1, в якій антитіло до IL-6R є гуманізованим антитілом РМ-1.

8. Застосування антитіла до IL-6R і МТХ для виробництва фармацевтичної композиції для лікування ревматоїдного артриту.

9. Застосування за п. 8, при якому антитіло до IL-6R є моноклональним антитілом.

10. Застосування за пп. 8 або 9, при якому антитіло до IL-6R є антитілом до людського рецептора IL-6.

11. Застосування за п. 8, при якому антитіло до IL-6R є рекомбінантним антитілом.

12. Застосування за п. 8, при якому антитіло до IL-6R є химерним антитілом, гуманізованим антитілом або людським антитілом.

13. Застосування за п. 8, при якому антитіло до IL-6R є антитілом РМ-1.

14. Застосування за п. 8, при якому антитіло до IL-6R є гуманізованим антитілом РМ-1.

15. Спосіб, що включає введення антитіла до IL-6R і МТХ пацієнтові, що потребує такого лікування, як спосіб лікування ревматоїдного артриту.

16. Спосіб за п. 15, в якому антитіло до IL-6R є моноклональним антитілом.

17. Спосіб за п. 15 або 16, в якому антитіло до IL-6R є моноклональним антитілом до людського рецептора IL-6.

18. Спосіб за п. 15, в якому антитіло до IL-6R є рекомбінантним антитілом.

19. Спосіб за п. 15, в якому антитіло до IL-6R є химерним антитілом, гуманізованим антитілом або людським антитілом.

20. Спосіб за п. 15, в якому антитіло до IL-6R є антитілом РМ-1.

21. Спосіб за п. 15, в якому антитіло до IL-6R є гуманізованим антитілом РМ-1.

(13) C2

(11) 86587

(19) UA

Даний винахід має відношення до способів лікування інтерлейкіну-6 (IL-6) - залежних захворювань за допомогою комбінації антагоніста інтерлейкіну-6 (антагоніст IL-6), особливо антитіла до рецептора інтерлейкіну-6 (IL-6R) (антитіло до IL-6R), та імунодепресантів, і за допомогою введення антитіла до IL-6R у високому дозуванні.

IL-6 є цитокіном, що його також називають фактором-2, який стимулює В-клітини (BSF2, B cell stimulating factor-2), чи інтерфероном  $\beta 2$ . IL-6 було відкрито як фактор диференціювання, який приймає участь в активації клітин, що походять з В-лімфоцитів (Hirano T. et al., Nature, 324:73-76, 1986), і згодом було виявлено, що IL-6 є поліфункціональним цитокіном, який впливає на функції різних клітин (Akira S. et al., Adv. in Immunology, 54:1-78, 1993). Було показано, що IL-6 індукуює дозрівання клітин, що походять з Т-лімфоцитів (Lotz M. et al., J. Exp. Med., 167:1253-1258, 1998).

IL-6 надає клітинам своєї біологічної активності через два типи білків. Один з них - рецептор IL-6 (IL-6R), який є ліганд-зв'язуючим білком, з молекулярною масою близько 80кДа, до якого приєднується IL-6 (Taga T. et al., J. Exp. Med., 166:967-981, 1987; Yamasaki K. et al., Science, 241:825-828, 1987). Крім мембрано-зв'язаного типу, який проникає і експресується в клітинній мембрані, рецептор IL-6 також був виявлений у вигляді розчинного рецептора IL-6, який складається в основному з екстраклітинної частини рецептора. Міжнародна публікація WO 92/19759 описує різні типи антитіл до IL-6R, такі як гуманізовані антитіла до IL-6R і химерні антитіла до IL-6R. WO 96/11020 описує терапевтичний засіб при ревматоїдному артриті й інгібітор росту синовіальних клітин (клітини внутрішньої оболонки суглобів), первинним інгредієнтом якого є антагоніст IL-6, такий як антитіло до IL-6R. WO 96/12503 описує лікування захворювань, для яких властиве продукування IL-6, таких як плазмодіоз, гіперімунноглобулінемія, анемія, нефрит, кахексія, ревматоїдний артрит, хвороба Кастлемана (CastleMan's disease) і мезангіальний проліферативний нефрит. WO 98/42377 описує захисні/терапевтичні засоби при захворюваннях, які мають відношення до сенситивізованих Т-клітин, таких як множинний склероз, увеїт, хронічний тиреоїдит, уповільнена гіперчутливість, контактний дерматит і atopічний дерматит, активним інгредієнтом яких є антитіло до IL-6R.

WO 98/42377 описує терапевтичні засоби при системному еритематозі, активним інгредієнтом яких є антитіло до IL-6R. WO 99/47170 описує терапевтичні засоби при хворобі Крона, активним інгредієнтом яких є антитіло до IL-6R. WO 00/10607 описує терапевтичні засоби при панкреатиті, активним інгредієнтом яких є антитіло до IL-6R. WO 02/3492 описує терапевтичні засоби при псоріазі, активним інгредієнтом яких є антитіло до IL-6R. Крім того, WO 02/080969 описує терапевтичні засоби при ювенільному ідіопатичному артриті, активним інгредієнтом яких є антитіло до IL-6R.

Як було описано вище, були відомі різні превентивні і терапевтичні засоби, активним інгредієнтом яких є антитіло до IL-6R. Однак не було відомо, що при лікуванні IL-6-залежних захворювань

комбінацією антитіла до IL-6R і імунодепресантів, таких як метотрексат (MTX), можна одержати синергічні ефекти, що імунодепресант, такий як метотрексат (MTX) може послабити чи попередити алергійні реакції при лікуванні ревматоїдного артрити за допомогою антитіла до IL-6R, і що антитіло до IL-6R у високому дозуванні може знизити або попередити алергійні реакції при лікуванні ревматоїдного артрити за допомогою метотрексату.

Отже, даний винахід забезпечує фармацевтичну композицію для лікування IL-6-залежних захворювань, яка включає антагоніст інтерлейкіну-6 (антагоніст IL-6) і імунодепресанти.

Винахід також забезпечує фармацевтичну композицію, яка включає імунодепресанти, для посилення ефекту при використанні антагоніста IL-6R при лікуванні IL-6-залежних захворювань.

Винахід також забезпечує фармацевтичну композицію, яка включає імунодепресанти, для попередження чи послаблення алергійних реакцій при лікуванні IL-6-залежних захворювань за допомогою антагоніста IL-6.

Винахід також забезпечує терапевтичний засіб, який включає антагоніст IL-6, для лікування IL-6-залежних захворювань шляхом прийому високої дози препарату.

Винахід також забезпечує фармацевтичну композицію, яка включає антагоніст IL-6 у високій дозі, для попередження чи послаблення алергійних реакцій при лікуванні IL-6-залежних захворювань.

Антагоніст IL-6 переважно є антитілом до IL-6R. Антитіло до IL-6R переважно є моноклональним антитілом до IL-6R. Бажано, щоб антитіло до IL-6R було моноклональним антитілом до IL-6R людини. Або бажано, щоб антитіло до IL-6R було моноклональним антитілом до IL-6R миші. Краще, щоб антитіло до IL-6R було антитілом рекомбінантного типу. Бажано, щоб моноклональне антитіло до IL-6R людини було, наприклад, антитілом PM-1. Краще, коли моноклональне антитіло до IL-6R миші є, наприклад, антитілом MR16-1. Крім того, антитіло може бути химерним антитілом, гуманізованим антитілом чи людським антитілом до IL-6R. Найкращим антитілом до IL-6R є, наприклад, гуманізоване антитіло PM-1.

При використанні антагоніста IL-6, особливо антитіла до IL-6R, поєднаному з використанням імунодепресанта, дозування антагоніста IL-6, особливо антитіла до IL-6R, становить, наприклад, при внутрішньовенному введенні від 0,02 до 150мг/кг/за 4 тижні чи дозування, при якому у крові досягаються еквівалентна концентрація антитіла до IL-6R, бажано використовувати від 0,5 до 30мг/кг/за 4 тижні або дозування, при якому у крові досягається еквівалентна концентрація антитіла до IL-6R, та найкраще використання від 2 до 8мг/кг/за 4 тижні або дозування, при якому у крові досягається еквівалентна концентрація антитіла до IL-6R.

При введенні антагоніста IL-6, особливо антитіла до IL-6R у високій дозі, дозування антагоніста IL-6, особливо антитіла до IL-6R, складає, наприклад, при внутрішньовенному введенні не менше ніж 4мг/кг/за 4 тижні чи дозування, при якому у

крові досягаються еквівалентна концентрація антитіла до IL-6R, а краще використовувати від 6 до 16мг/кг/за 4 тижні або дозування, при якому у крові досягається еквівалентна концентрація антитіла до IL-6R, та найкраще використання від 6 до 10мг/кг/за 4 тижні або дозування, при якому у крові досягається еквівалентна концентрація антитіла до IL-6R. При використанні MTX як імунодепресанта дозування MTX складає, наприклад, від 1 до 100мг/людину/ тиждень або дозування, при якому у крові досягається еквівалентна концентрація MTX, краще використання від 4 до 50мг/людину/ тиждень або дозування, при якому у крові досягається еквівалентна концентрація MTX, та найкраще використання від 10 до 25мг/людину/ тиждень або дозування, при якому у крові досягається еквівалентна концентрація MTX.

Дозування, при якому у крові виявляють лікарський засіб (наприклад, антитіло до IL-6R чи MTX), вважають за таке, що дає еквівалентний терапевтичний ефект, і навіть у тому випадку, коли певні концентрації в крові розрізняються внаслідок різних способів уведення засобу, наприклад, при внутрішньовенній ін'єкції чи підшкірній ін'єкції, його розцінюють як дозування, при якому у крові виявляють таку концентрацію лікарського засобу (наприклад, антитіла до IL-6R чи MTX), при якій досягається еквівалентний терапевтичний ефект.

Приклади IL-6-залежних захворювань включають

гострі хронічні запальні захворювання й аутоімунні захворювання: нефрит, мезангіальний проліферативний нефрит, хвороба Крона, виразковий коліт, панкреатит, ювенільний ідіопатичний артрит чи системний ювенільний ідіопатичний артрит, васкуліт, хвороба Кавасакі, ревматоїдний артрит, системний еритематоз, псоріаз, синдром Шегрена, хвороба Стілла у дорослих;

пухлинні захворювання: множинна мієлома, хвороба Кастлемана, злоякісна лімфома, рак нирок;

інфекційні захворювання: інфекція ВІЛ, інфекція вірусом Епштейн-Барр (EBV);

кахексія: кахексія;

інші захворювання: плазмоцитоз, гіперімунноглобулінемія, анемія і т.п., та переважно це ревматоїдний артрит, плазмоцитоз, гіперімунноглобулінемія, анемія, нефрит, кахексія, множинна мієлома, хвороба Кастлемана, мезангіальний проліферативний нефрит, системний еритематоз, хвороба Крона, панкреатит, псоріаз, ювенільний ідіопатичний артрит чи системний ювенільний ідіопатичний артрит.

Фармацевтичну композицію даного винаходу можна вводити перорально чи парентерально і систематично або за необхідності. Наприклад, можна вибрати внутрішньовенну ін'єкцію, таку як введення за допомогою крапельниці, внутрішньом'язову ін'єкцію, внутрішньочеревинну ін'єкцію, підшкірну ін'єкцію, суппозиторій, введення в пряму кишку, пероральні лікарські засоби, покриті кишковорозчинною оболонкою, і т.п., та придатний спосіб уведення лікарських засобів можна вибирати правильним чином залежно від віку і стану пацієнта. Верхня і нижня межі ефективного дозування залежать від частоти введення засобу, наприклад,

дозування засобу за один прийом збільшують при тривалому інтервалі між прийомами, тоді як дозування засобу знижують при короткому інтервалі між прийомами.

Кращим ефективним дозуванням і способом введення антитіла до рецептора IL-6, наприклад, є така кількість, при якій з крові виявляють вільне антитіло. Як типові приклади існують способи введення лікарського засобу з поділом дози на кілька прийомів, наприклад, за допомогою внутрішньовенної ін'єкції, такої як краплинне введення, і підшкірної ін'єкції, що проводять відповідно до розкладу прийому двічі на тиждень, один раз на тиждень, один раз на два тижні, один раз на 4 тижні, один раз на 6 тижнів, один раз на 8 тижнів і т.п. Розклад прийому можна регулювати шляхом збільшення інтервалу між прийомами від двох разів на тиждень чи одного разу на тиждень до одного разу на 2 тижні, одного разу на 3 тижні, один раз на 4 тижні, один раз на 6 тижнів і один раз на 8 тижнів при контролі за перебігом захворювання і змінами результатів лабораторних досліджень крові.

При прийомі антитіла до IL-6R поєднаному з MTX дозування антитіла є звичайним, наприклад, при лікуванні ревматоїдного артрити це дозування більше ніж 0,5мг/кг на тиждень чи дозування, при якому у крові досягається еквівалентний або більш високий антиревматичний ефект. Наприклад, при внутрішньовенному введенні, проведеному один раз на чотири тижні, дозування становить від 0,02 до 150мг/кг, переважно від 0,5 до 30мг/кг, а ще краще від 2 до 8мг/кг.

Антитіло до IL-6R та імунодепресант вводять одночасно чи з інтервалом у часі.

Імунодепресанти також включають антиревматичні засоби, адренокортикоїдні гормональні засоби і т.п. та включають, наприклад, наступні на лікарські засоби.

Імунодепресанти, антиревматичні засоби, засоби, які включають адренокортикоїдні гормони

Імунодепресанти

Алкіліруючі засоби

Циклофосфамід

Метаболічні антагоністи

Азатиопрін, метотрексат, мізорібін

Інгібітори активності Т-клітин

Циклоспорин, такролімус

Антиревматичні засоби:

Гідроксихлороквін, сульфасалазін, лефлуномід, етанерсепт, інфліксимаб, адаліумаб, Д-пеніцилламін, пероральні препарати золота, препарати золота для ін'єкцій (для внутрішньом'язової ін'єкції), міноциклін, золота натрію тіомалат, ауранофін, лобензарит, буцилламін, актарит;

Засоби, які включають адренокортикоїдні гормони:

Кортизон, гідрокортизони

Кортизону ацетат, гідрокортизон, гідрокортизону натрію фосфат, гідрокортизону натрію сукцинат, фторокортизону ацетат

Преднізолон, преднізолони

Преднізолон, преднізолону натрію сукцинат, преднізолону натрію фосфат, галопредона ацетат

Метилпреднізолон

Метилпреднізолон, метилпреднізолону ацетат, метилпреднізолону натрію сукцинат

Триамцінолони

Триамцінолон, триамцінолону ацетат, триамцінолону актинід

Дексаметазони

Дексаметазон, дексаметазону ацетат, дексаметазону натрію фосфат, дексаметазону пальмітат

Бетаметазони

Бетаметазон, бетаметазону натрію фосфат

Параметазони

Параметазону ацетат

Дозування імунодепресанта, наприклад, при його прийомі поєднаному з МТХ для лікування ревматоїдного артрити, наприклад, при пероральному прийомі, складає від 1 до 100мг/людину на тиждень, краще від 4 до 50мг, і найкраще від 7,5 до 25мг/людину.

Також високе дозування антитіла до IL-6R передбачає дозування, яке здатне попередити чи послабити алергійну реакцію, таке дозування еквівалентне або перевищує мінімальне дозування, ефективне для лікування IL-6-залежних захворювань. Наприклад, при лікуванні ревматоїдного артрити при внутрішньовенному краплинному вливанні, яке проводять кожні чотири тижні, дозування становить 4мг/кг або більше, переважно від 6 до 16мг/кг та найкраще від 6 до 10мг/кг.

Описані вище способи прийому, інтервал між прийомами і дозування є ілюстрацією кращих прикладів, отож належним чином можна вибрати спосіб прийому, інтервал і дозування, при якому досягається подібний терапевтичний ефект. Наприклад, вимірюючи концентрації різних лікарських засобів у крові, можна вибрати спосіб прийому, інтервал і дозування, при яких досягаються ефекти, подібні до тих, котрі приведені вище як приклади. Винахід включає спосіб прийому, інтервал і дозування, при яких у крові досягаються концентрації, еквівалентні тим, що описані в приведених вище прикладах.

Здійснення винаходу.

Антагоністи IL-6, застосовувані в даному винаході, можуть бути використані не залежно від їхнього походження, типу і форми доти, доки вони демонструють превентивний або терапевтичний ефект при IL-6-залежних захворюваннях.

Антагоністи IL-6 є речовинами, які інгібують біологічну активність IL-6. Антагоністи IL-6 бажано є речовинами, які проявляють інгібуючу активність щодо зв'язування будь-яких білків з IL-6, IL-6R чи gp130. Антагоністи IL-6 включають антитіло до IL-6, антитіло до IL-6R, антитіло до gp130, модифікований IL-6, модифікований розчинний IL-6R або неповні пептиди IL-6 чи IL-6R, а також речовини з низькою молекулярною масою, які проявляють подібну активність.

Антитіло до IL-6, застосовуване в даному винаході, можна одержати у вигляді поліклональних або моноклональних антитіл, використовуючи засоби, відомі в цій області техніки. Кращими антитілами до IL-6, застосовуваними в даному винаході, є моноклональні антитіла, які походять від ссавців. Моноклональні антитіла ссавців включають антитіла, які продукуються гібридомами, і антитіла, які

продукуються клітинами хазяїна, що були трансформовані за допомогою експресійного вектора, який включає генетично сконструйований ген антитіла. Це антитіло, зв'язуючись з IL-6, блокує зв'язування IL-6 з рецептором IL-6 і, таким чином, блокує передачу біологічно активного сигналу IL-6 у клітини.

Приклади таких антитіл включають антитіло MH166 (Matsuda T. et al., Eur. J. Immunol., 18:951-956, 1988) і антитіло SK2 (Sato K. et al., The 21st Proceedings of the Japanese Society for Immunology, 21:166, 1991).

Гібридоми, які продукують антитіла до IL-6, можна в основному сконструювати, використовуючи відому процедуру, описану нижче. Тобто, гібридоми можна одержати, проводячи імунізацію, використовуючи як сенсibilізуючий антиген IL-6, відповідно до традиційного методу імунізації; зливаючи отримані імунні клітини з відомими в технології батьківськими клітинами в звичайному методі клітинного злиття; і відбираючи клітини, які продукують моноклональне антитіло, за допомогою традиційного методу скринінгу.

Зокрема, антитіло до IL-6 можна отримати в такий спосіб. Наприклад, людський IL-6, застосовуваний як сенсibilізуючий антиген для одержання антитіла, можна одержати, використовуючи ген/амінокислотну послідовність IL-6, докладно описану в Eur. J. Biochem., 168:543-550, 1987; J. Immunol., 140:1534-1541, 1987; чи в Agr. Biol. Chem., 54:2685-2688, 1990.

Послідовність гена IL-6 вставляють у відомий експресійний вектор, яким трансформують придатні для цього клітини хазяїна, потім за допомогою відомого методу цікавлячий білок IL-6 очищають з клітин або супернатанта культури клітин, і очищений білок IL-6 може бути використаний як сенсibilізуючий антиген. Також, як сенсibilізуючий антиген можна використовувати злитий білок, утворений комбінацією білка IL-6 та іншого білка.

Антитіло до рецептора IL-6, що його застосовують в даному винаході, може бути отримане у вигляді поліклонального або моноклонального антитіла з використанням методу, відомого в даній галузі техніки. В даному винаході, має перевагу моноклональне антитіло, яке застосовують як антитіло до рецептора IL-6, особливо, антитіло, яке походить від ссавців. Моноклональні антитіла ссавців включають антитіла, які продукуються гібридомами, і антитіла, які продукуються в клітинах хазяїна, що були трансформовані за допомогою експресійного вектора, який включає генетично сконструйований ген антитіла. Це антитіло, зв'язуючись з рецептором IL-6, блокує зв'язування IL-6 з рецептором IL-6 і, таким чином, блокує передачу біологічно активного сигналу IL-6 у клітини.

Приклади таких антитіл включають антитіло MR16-1 (Tamura T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11924-11928, 1993), антитіло PM-1 (Hirata Y. et al., J. Immunol., 143:2900-2906, 1989), антитіло AUK12-20, антитіло AUK64-7 чи антитіло AUK146-15 (International Patent Application Publication No. WO 92-19759). Серед них найкращим є антитіло PM-1.

Клітинна лінія гібридоми PM-1, яка продукує антитіло PM-1, була депонована для міжнародного

визнання 12 липня 1989 року за умовами Будапештського договору як FERM BP-2998 Міжнародним депозитарієм для патентованих мікроорганізмів (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki Pref.). Клітинна лінія пацюково-мишиної гібридоми MR16-1, яка продукує антитіло MR 16-1, була депонована для міжнародного визнання 13 березня 1997 року за умовами Будапештського договору як FERM BP-5875 Міжнародним депозитарієм для патентованих мікроорганізмів (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki Pref.).

Гібридоми, які продукують моноклональне антитіло до рецептора IL-6, можуть бути отримані за допомогою відомої процедури, описаної нижче. Тобто, гібридоми можна одержати, проводячи імунізацію, використовуючи як сенсibilізуючий антиген рецептор IL-6, відповідно до традиційного методу імунізації; зливаючи отримані імунні клітини з відомими в технології батьківськими клітинами в звичайному методі клітинного злиття; і відбираючи клітини, які продукують моноклональне антитіло, за допомогою традиційного методу скринінгу.

Зокрема, антитіло до рецептора IL-6 можна одержати в такий спосіб. Наприклад, людські рецептори IL-6, що їх застосовують як сенсibilізуючий антиген для одержання антитіла, можна одержати, використовуючи генну чи амінокислотну послідовність рецептора IL-6, докладно описані в European Patent Application Publication No. EP325474 і JP-A-3-155795, відповідно.

Існує два типи білків рецептора IL-6: один з них експресований на клітинах, а інший - відділений від клітинної мембрани (розчинний рецептор IL-6) (Yasukawa K. et al, J. Biochem., 108:673-676, 1990). Розчинний рецептор IL-6 формується значною мірою з екстраклітинної ділянки рецептора IL-6 і відрізняється від мембрано-зв'язаного рецептора IL-6 тим, що не містить трансмембранну ділянку або трансмембранну ділянку разом із внутрішньоклітинною ділянкою. Обидва білки рецептора IL-6 можна використовувати в як сенсibilізуючий антиген для продукції антитіла до рецептора IL-6, що його застосовують в даному винаході.

Послідовність гена рецептора IL-6 включають у відомий експресійний вектор, яким трансформують клітини придатного хазяїна, потім цікавлячий білок рецептора IL-6 очищають з клітин чи супернатанта культури за допомогою відомого методу, і очищений білок рецептора IL-6 може бути використаний у як сенсibilізуючий антиген. Також, у як сенсibilізуючий антиген можна використовувати клітини, експресуючі рецептор IL-6, або злитий білок, утворений комбінацією білка рецептора IL-6 і іншого білка.

Штам E.coli HB101-pIBBSF2R, клітини якого містять плазмиду pIBBSF2R, яка включає кДНК, що кодує рецептор IL-6 людини, був депонований для міжнародного визнання 9 січня 1989 року за умовами Будапештського договору як FERM BP-2232 Міжнародним депозитарієм для патентованих мікроорганізмів (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki Pref.).

Антитіло до gp130, яке застосовується в даному винаході, може бути отримане у вигляді поліклонального чи моноклонального антитіла з вико-

ристанням відомого методу. Як антитіло до gp130, що його застосовують в даному винаході, переважно використовується моноклональне антитіло, яке походить від ссавців. Моноклональні антитіла ссавців включають антитіла, продуковані гібридомами, та антитіла, продуковані в клітинах хазяїна, які були трансформовані за допомогою експресійного вектора, що включає генетично сконструйований ген антитіла. Це антитіло, зв'язуючись з gp130, інгібує зв'язування комплексу IL-6/рецептор IL-6 з gp130, блокує передачу біологічно активного сигналу IL-6 у клітини.

Приклади таких антитіл включають антитіло AM64 (JP-A-3-219894), антитіло 4B11 і антитіло 2H4 (US 5571513), антитіло B-S12 і антитіло B-P8 (JP-A-8-291199).

Гібридоми, які продукують моноклональне антитіло до gp130, можуть бути отримані за допомогою відомої процедури, описаної нижче. Тобто, гібридоми можна одержати, проводячи імунізацію, використовуючи як сенсibilізуючий антиген gp130, відповідно до традиційного методу імунізації; зливаючи отримані імунні клітини з відомими в технології батьківськими клітинами в звичайному методі клітинного злиття; і відбираючи клітини, які продукують моноклональне антитіло, за допомогою традиційного методу скринінгу.

Зокрема, моноклональне антитіло можна одержати в такий спосіб. Наприклад, gp130, що його застосовують як сенсibilізуючий антиген для одержання антитіла, можна одержати, використовуючи ген/амінокислотну послідовність gp130, докладно описану в European Patent Application Publication No. EP 411946.

Послідовність гена gp130 включають у відому систему експресійного вектора, яким трансформують клітини придатного хазяїна, потім цікавлячий білок gp130 очищають з клітин чи супернатанта клітинної культури за допомогою відомого методу, і очищений білок gp130 може бути використаний як сенсibilізуючий антиген. Також як сенсibilізуючий антиген можна використовувати клітини, експресуючі gp130, чи злитий білок, утворений комбінацією gp130 і іншого білка.

Перелік тварин - ссавців, імунізованих за допомогою сенсibilізуючого антигену, ніяк не обмежено, але бажано їх відбирати виходячи з їх сумісності з батьківськими клітинами, що їх використовують для клітинного злиття. Звичайно даний перелік включає гризунів, таких як миша, пацюк і хом'як.

Імунізацію тварини сенсibilізуючим антигеном проводять, використовуючи відомий спосіб. Як основні способи, наприклад, застосовують внутрішньочеревинну або підшкірну ін'єкцію тварини сенсibilізуючим антигеном. Зокрема, у кращому варіанті сенсibilізуючий антиген, який придатним способом розводять і суспендують у PBS (фосфатно-сольовий буфер) або фізіологічному розчині, змішують для емульгування з придатною кількістю звичайного ад'юванта, наприклад, повного ад'юванта Фрейнда, і потім вводять його ссавцю впродовж декількох прийомів з інтервалом від 4 до 21 днів. Також під час імунізації сенсibilізуючим антигеном може бути використаний придатний носій.

Тварину імунізують в такий спосіб, і імунізацію підтверджують тим, що в сироватці крові підвищується рівень цікавлячого антитіла. Потім імунізовані клітини видаляють із організму ссавця і використовують для клітинного злиття. Кращими клітинами для клітинного злиття, зокрема, є клітини селезінки.

Серед клітин мієломи ссавців, що їх застосовують як батьківські клітини-партнери для злиття з описаними вище імунізованими клітинами, переважно використовують уже відомі клітинні лінії, такі як P3X63Ag8.653 (Kearney J. F. et al., *J. Immunol.*, 123:1548-1550, 1979), P3X63Ag8U.I (Current Topics in Microbiology and Immunology, 81:1-7, 1978), NS-1 (Kohler G. and Milstein C, *Eur. J. Immunol.*, 6:511-519, 1976), MOC-11 (Margulies D.H. et al., *Cell*, 8:405-415, 1976), SP2/0 (Shulman M. et al., *Nature*, 276:269-270, 1978), FO (de St. Groth S. F. et al., *J. Immunol. Methods*, 35:1-21, 1980), S194 (Trowbridge, I.S., *J. Exp. Med.*, 148:313-323, 1978) і R210 (Galfre G. et al., *Nature*, 277:131-133, 1979).

Злиття зазначених вище імунних клітин із клітинами мієломи власне кажучи може бути проведене відповідно до відомого способу, такого як спосіб, описаний у роботі Milstein et al. (Kohler G. and Milstein C, *Methods Enzymol.*, 73:3-46, 1981).

Більш конкретно, зазначене злиття клітин проводять, наприклад, у звичайному поживному культуральному середовищі в присутності каталізатора клітинного злиття. Як каталізатор клітинного злиття можна використовувати, наприклад, поліетиле-нгліколь (PEG), вірус Сендай (HVJ) або щось подібне, і, крім того, щоб підсилити ефективність злиття, потім за бажанням можна додати/використовувати допоміжний засіб, такий як диметилсульфоксид.

Кращим співвідношенням імунних клітин до клітин мієломи є, наприклад, від 1- до 10-кратного надлишку імунних клітин відносно клітин мієломи. Як середовище для клітинного злиття, можливе використання середовища RPMI 1640, середовища MEM, яке підходить для росту клітинної лінії мієломи, і іншого стандартного середовища, яке застосовують для такого типу клітинної культури, і, крім цього, можна вводити сироваткові добавки, такі як фетальна сироватка теляти (FCS).

Для клітинного злиття, цікавлячі злиті клітини (гібриди) формують шляхом ретельного змішування певної кількості описаних вище імунізованих клітин із клітинами мієломи в зазначеному вище середовищі, додаючи розчин PEG, наприклад, розчин PEG з молекулярною масою від 1000 до 6000, попередньо прогрітий до 37°C, у стандартній концентрації від 30 до 60% (вага/об'єм), з наступним перемішуванням. Потім, за допомогою процедури повторного, послідовного додавання придатного культурального середовища і центрифугування можна видалити супернатант, агенти клітинного злиття і т.п., присутність яких небажана для росту гібридоми.

Гібридоми можуть бути відібрані за допомогою культивування в звичайному селекційному середовищі, наприклад, у культуральному середовищі НАТ (середовище, яке містить гіпоксантин, аміноптерин і тімідин). Культивування в середовищі НАТ продовжують звичайно від декількох днів до

декількох тижнів, протягом часу, достатнього для загибелі клітин (тих, що не злилися), які відрізняються від бажаних гібридом. Потім застосовують звичайний метод граничного розведення і проводять скринінг і клонування гібридом, які продукують бажане антитіло.

Крім одержання зазначеної вище гібридоми, імунізуючи антигеном тварину (але не людину) за допомогою сенсibiliзування лімфоцитів людини білком-антигеном або клітинами, які експресують антиген *in vitro*, і злиття сенсibiliзованих В-лімфоцитів із клітинами мієломи людини, наприклад, із клітинами U26.6 (див. JP-B-1-59878), можна одержати бажане антитіло людини, яке проявляє активність зв'язування з бажаним антигеном або клітинами, які експресують антиген. Крім цього, антиген чи клітини, які експресують антиген, можна ввести трансгенним тваринам, які мають набір генів антитіл людини, щоб одержати бажане людське антитіло у відповідності зі способом, описаним вище (див. International Patent Application Publication Nos. WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735).

Сконструйовану в такий спосіб гібридоми, яка продукує моноклональне антитіло, можна культивувати в стандартному культуральному середовищі або можна зберігати тривалий час у замороженому стані при температурі рідкого азоту.

Щоб одержати моноклональне антитіло з гібридом, можна використовувати спосіб, у якому гібридоми культивують звичайним чином і одержують моноклональне антитіло у вигляді супернатанта клітинної культури, або за допомогою способу, у якому гібридоми вводять і вирощують у тваринах, сумісних із зазначеною гібридою, а антитіла одержують у вигляді асцитів. Перший спосіб підходить для одержання високоочищених антитіл, тоді як останній спосіб підходить для виробництва великих кількостей антитіл.

Наприклад, одержання гібридоми, яка продукує антитіло до рецептора IL-6, можна проводити, використовуючи спосіб, розкритий у JP-A-3-139293. Можна застосувати спосіб, у якому гібридоми, які продукують антитіло PM-1, депоновані для міжнародного визнання 12 липня 1989 року за умовами Будапештського договору як FERM BP-2 998 Міжнародним депозитарієм для патентованих мікроорганізмів (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki Pref.), вводять внутрішньочеревинно мишам BALB/c для одержання асцитів, і антитіла PM-1 очищають з цих асцитів. Також, можна застосувати спосіб, у якому зазначені гібридоми культивують у придатному культуральному середовищі, наприклад, у середовищі RPMI 1640, у гібридомному середовищі SFM (виробництво фірми GIBCO-BRL), у середовищі PFHM-II (виробництво фірми GD3CO-BRL), що містять 10%-ну фетальну сироватку теляти і 5%-ний MB-Condimed HI (виробництво фірми Boehringer Mannheim), і антитіло PM-1 очищають із супернатанта клітинної культури.

У даному винаході як моноклональне антитіло можна використовувати антитіло рекомбінантного типу, продукowane за допомогою клонування гена антитіла з гібридоми, включення цього гена в при-

датний вектор, введення його в клітину хазяїна, і використання генно-інженерних технологій (див., наприклад, Borrebaeck S.A.K., and Larrick J.W. *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, published in the United Kingdom by Macmillan Publishers Ltd. 1990).

Зокрема, мРНК, яка кодує варіабельну (V) область бажаного антитіла, виділяють із клітин, яка продукує цікавляче антитіло, таких як гібридоми. Для виділення мРНК одержують сумарний препарат РНК із використанням відомого способу, такого, наприклад, як метод ультрацентрифугування в присутності гуанідину (Chirgwin J.M. et al., *Biochemistry*, 18:5294-5299, 1979), метод AGPC (Chomczynski P. et al., *Anal. Biochem.*, 162:156-159, 1987), і мРНК одержують, використовуючи набір фірми Pharmacia «mRNA Purification Kit». Також мРНК можна виділити безпосередньо, використовуючи набір фірми Pharmacia «QuickPrep mRNA Purification Kit».

кДНК V-області антитіла синтезують з отриманої мРНК, використовуючи зворотну транскриптазу. Синтез кДНК проводять, використовуючи набір «AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit» і подібні набори. Також, для синтезу й ампліфікації кДНК можна використовувати набір «5'-Ampli FINDER RACE kit» (виробництво фірми Clontech), і метод 5'-RACE, в якому використовуюється полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) (Frohman M.A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8998-9002, 1988; Belyavsky A. et al., *Nucleic Acids Res.*, 17:2919-2932, 1989). Бажаний фрагмент ДНК очищають із продукту ПЛР і лігують у ДНК вектора. Потім отриманий рекомбінантний вектор вводять в *E. coli*, і відбирають колонії для виділення бажаного рекомбінантного вектора. Послідовність основ бажаної ДНК підтверджують за допомогою відомого способу, такого як дідезокси-метод секвенування.

Якщо одержують ДНК, що кодує V-область бажаного антитіла, її лігують у молекулу ДНК, що кодує константну область (С-область) бажаного антитіла, і потім її включають у експресійний вектор. Або ДНК, що кодує V-область антитіла, можна включити в експресійний вектор, який містить С-область антитіла.

Щоб продукувати антитіло, застосовуване в даному винаході, ген антитіла включають у експресійний вектор для того, щоб його експресія йшла під контролем експресійних регуляторних ділянок, наприклад, енхансера і промотору, як описано нижче. Потім, за допомогою цього експресійного вектора можна трансформувати клітини хазяїна.

У даному винаході з метою зниження алогенної антигенності для людини можна застосовувати рекомбінантне антитіло зі штучно модифікованим геном, наприклад, химерне антитіло, гуманізоване антитіло і людське антитіло. Ці модифіковані антитіла можна одержати за допомогою відомих методів.

Химерне антитіло можна одержати за допомогою літування отриманої, як описано вище, ДНК, що кодує V-область антитіла, у ДНК, що кодує С-область антитіла людини, з наступним її включенням у експресійний вектор, який вводять у клітини хазяїна для продукування (див. European Patent

Application Publication No. EP 125023, International Patent Application Publication No. WO 92/19759). За допомогою цих відомих методів можна одержати химерне антитіло, корисне в даному винаході.

Наприклад, плазмиди, які містять ДНК, що кодує V-області L- і H-ланцюги химерного антитіла PM-1, були названі рPM-к3 і рPM-h1, відповідно, і штами *E. coli*, які мають вказані плазмиди, були депоновані для міжнародного визнання 12 лютого 1991 року за умовами Будапештського договору як NCIMB 40366 і NCIMB 40362, відповідно, Компанією Національної колекції промислових, харчових і морських бактерій (23 St. Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Scotland, United Kingdom).

Гуманізовані антитіла, які відносяться до людських антитіл зі зміненою формою, є антитілами, у яких ділянка, яка детермінує компліментарність антитіла (CDR, complementarity determining region) ссавця, але не людини, наприклад, мишачого антитіла, трансплантують у CDR ділянку антитіла людини за допомогою відомого, загальноприйнятого методу рекомбінантних ДНК (див. European Patent Application Publication No. EP 125023, International Patent Application Publication No. WO 92/19759).

Зокрема, послідовність ДНК, яка була сконструйована для літування CDR мишачого антитіла в антитіло людини без порушення рамки зчитування (FR, framework region), синтезується за допомогою методу ПЛР із використанням олігонуклеотидів, які мають на кінцях області, які перекриваються. Отриману ДНК літують у ДНК, що кодує С-область антитіла людини, і потім включають у експресійний вектор, який вводять у клітини хазяїна для продукції гуманізованого антитіла (див. European Patent Application Publication No. EP 239400, International Patent Application Publication No. WO 92/19759).

Серед FR антитіл людини, лігованих через CDR, вибирають ті, у яких ділянка, що визначає компліментарність, формує придатну область зв'язування антигену. При бажанні можна замінити амінокислоти без порушення рамки зчитування у варіабельній ділянці антитіла, так щоб ділянка, що визначає компліментарність антитіла людини зі зміненою формою, могла утворити відповідну область зв'язування антигену (Sato K. et al., *Cancer Res.*, 53:851-856, 1993).

Для химерного антитіла і гуманізованого антитіла використовують С-область антитіла людини. С-область антитіла людини включає C $\gamma$ 1, і, наприклад, можна використовувати C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3 і C $\gamma$ 4. С-область антитіла людини можна модифікувати для поліпшення стабільності антитіла чи його продукції.

Химерне антитіло включає варіабельну область антитіла, що походить із ссавця, відмінного від людини, і С-область, що походить з антитіла людини. Гуманізоване антитіло включає CDR ділянку антитіла, що походить із ссавця, відмінного від людини, а також область рамки зчитування і С-область, що походить з антитіла людини. Відповідно до цього, вони мають низку антигенності в організмі людини і, таким чином, корисні як антитіла, застосовувані у даному винаході.

Кращі характерні приклади гуманізованого антитіла, застосовуваного в даному винаході, вклю-

чають гуманізоване антитіло PM-1 (див. International Patent Application Publication No. WO 92/19759).

Також, у доповненні до способів, описаних вище, для одержання антитіла людини відома технологія, яка використовує перегляд бібліотеки людських антитіл.

Наприклад, варіабельну область антитіла людини можна експресувати на поверхні фага у вигляді окремого ланцюга антитіла (scFv) за допомогою методу фагового відображення (phage display), і з бібліотеки можна відібрати фаги, які зв'язуються з антигеном. При генному аналізі відібраного фага можна визначити послідовність ДНК, що кодує варіабельну область антитіла людини, яка зв'язується з антигеном. Якщо послідовність ДНК ланцюга scFv, яка зв'язує антиген, була виявлена, то за допомогою придатного експресійного вектора можна сконструювати послідовність для одержання антитіла людини. Ці способи вже добре відомі, і їх можна знайти в WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 і WO 95/15388.

Ген антитіл, сконструйований, як було описано вище, можна експресувати і одержати за допомогою відомого методу. У випадку клітин ссавців ген антитіла можна експресувати за допомогою ДНК, у якій ефективно з'єднані звичайно використовуваний промотор, експресований ген антитіла і сигнальна послідовність полі-А, розташована на 3'-кінці ДНК, або за допомогою вектора, що включає їх. Наприклад, як промотор/енхансер можна використовувати ближній ранній промотор/енхансер цитомегаловірусу людини.

Крім того, серед інших промоторів/енхансерів, які можуть бути використані для експресії антитіла, застосовуваного в даному винаході, можна використовувати вірусні промотори/енхансери ретровірусу, вірусу полііоми, аденовірусу і вірусу 40 мавп (SV40), а також промотор/енхансер, який походить з гена фактора елонгації людини 1 $\alpha$  (HEF1 $\alpha$ ) клітин ссавців.

Наприклад, експресію можна проводити за допомогою методу Mulligan et al. (Mulligan R. et al., Nature, 277:108-114, 1979) при використанні промотору/енхансера SV40 чи за допомогою методу Mizushima et al. (Mizushima S. and Nagata S., Nucleic Acids Res., 18:5322, 1990) при використанні промотору/енхансера гена HEF1 $\alpha$ .

У випадку E.coli ген можна експресувати за допомогою ефективної сполуки звичайно використовуваного промотору, сигнальної послідовності для секреції антитіла і експресованого гена антитіла. Наприклад, промотори можуть включати промотори генів lacZ і araB. При використанні промоторів генів lacZ і araB можна застосовувати метод Ward et al. (Ward E. S. et al., Nature, 341:544-546, 1989; Ward E. S. et al., FASEB J., 6:2422-2427, 1992) та метод Better et al. (Better M. et al., Science, 240:1041-1043, 1988), відповідно.

Як сигнальну послідовність для секреції антитіла можна використовувати сигнальну послідовність pelB (Lei S. P. et al., J. Bacteriol., 169:4379-4383, 1987) у випадку продукування білка в периплазмі E. coli. Антитіло, яке продукується в периплазмі, виділяють і потім використовують після

придатної зміни просторової структури антитіла (див., наприклад, WO 96/30394).

Як точки початку реплікації (origin) можна використовувати вірусні оріджини, отримані з SV40, вірусу полііоми, аденовірусу, вірусу бичачої папіломи (BPV). Крім того, для збільшення числа копій гена в клітинній системі хазяїна, експресійний вектор може включати як селективні маркери ген аміноглікозидфосфотрансферази (APH), ген тімидинкінази (TK), ген ксантин-гуанінфосфорибозилтрансферази E. coli (Ecoopt), ген дигідрофолатредуктази (dhfr) і т.п.

Для продукування антитіла, застосовуваного в даному винаході, можна використовувати будь-яку продукуючу систему. Для одержання антитіла існують системи продукування in vitro і in vivo. Система продукування in vitro включає продукуючу систему, у якій використовують еукаріотичні клітини, і продукуючу систему, у якій використовують прокаріотичні клітини.

При використанні еукаріотичних клітин існують продукуючі системи, в яких використовують клітини тварин, рослинні клітини або клітини грибів. Клітини тварин включають (1) клітини ссавців, такі як CHO, COS, клітини мієломи, BHK (клітини з нирок дитинчат хом'яка), HeLa, Vero і т.п. (2) клітини амфібій, такі як ооцити Xenopus або (3) клітини комах, такі як sf9, sf21, Tn5 і т.п. Серед клітин рослин відомі, наприклад, клітини, які походять з Nicotiana tabacum, і які можна культивувати у вигляді каллуса (недиференційована тканина рослин, яку можна культивувати in vitro). Клітини грибів включають дріжджі, наприклад, рід Saccharomyces, зокрема, Saccharomyces cerevisiae, або нитчасті гриби, такі як рід Aspergillus, зокрема, Aspergillus niger.

Якщо використовують прокаріотичні клітини, то існують продукуючі системи, у яких застосовують бактеріальні клітини. Бактеріальні клітини включають E. coli і Bacillus subtilis.

Антитіло можна одержати шляхом введення гена бажаного антитіла в ці клітини за допомогою їх трансформації і культивування трансформованих клітин in vitro. Культивування проводять за допомогою відомих методів. Наприклад, як культуральне середовище можна використовувати DMEM, MEM, RPMI 1640 і IMDM, і разом з ними можна використовувати сироваткові добавки, такі як фетальна сироватка теляти (FCS). Антитіла можна одержувати in vivo за допомогою переносу клітин, до яких було введено ген антитіла, у черевну порожнину тварини.

З іншого боку, системи, які продукують in vivo, включають системи, у яких використовують тварин, і ті, у яких використовують клітини рослин. При використанні клітин тварин існують продукуючі системи, у яких застосовують ссавців і комах.

Серед ссавців можуть бути використані кози, свині, вівці, миші, велика рогата худоба і т.п. (Vicki Glaser, Spectrum Biotechnology Application, 1993). Також, серед комах може бути використаний шовковичний шовкопряд. При використанні рослин можна застосовувати, наприклад, тютюн.

Гени антитіла вводять до клітин названих тварин або рослин, і в організмі таких тварин чи рослин продукуються антитіла, які потім виділяють.



Наприклад, ген антитіла одержують у вигляді злитого гена шляхом вставки в середину гена, який кодує білок, що спадково продукується в молоко, наприклад, у такий як ген  $\beta$ -казеїну кози. Фрагмент ДНК, що містить злитий ген, у котрий було вставлено ген антитіла, вводять за допомогою ін'єкції в ембріон кози, і ембріон вводять у самку кози. Бажане антитіло одержують з молока, виробленого трансгенною козою, народженою від кози, якій було підсаджено ембріон, чи з молока потомства такої трансгенної кози. Щоб збільшити кількість молока, що містить бажане антитіло, трансгенній козі можна давати придатні гормони (Ebert K. M. et al., *Bio/Technology*, 12:699-702, 1994).

Якщо використовують шовковичного шовкопряда, то його інфікують бакуловірусом, у який вставили ген бажаного антитіла, і бажане антитіло виділяють з рідини, одержаної з тіла шовкопряда (Maeda S. et al., *Nature*, 315:592-594, 1985). Крім цього, якщо використовують тютюн, то ген бажаного антитіла вставляють у рослинний експресійний вектор, наприклад, у рMON 530, і цей вектор вводять у бактерію, таку як *Agrobacterium tumefaciens*. Тютюн, наприклад, *Nicotiana tabacum*, інфікують цими бактеріями, і з листів цього тютюну одержують бажане антитіло (Julian K. C. Ma, et al., *Eur. J. Immunol.*, 24:131-138, 1994).

Якщо антитіло одержують за допомогою продукуючої системи *in vitro* чи *in vivo*, як описано вище, ДНК, що кодує важкий ланцюг (Н-ланцюг) або легкий ланцюг (L-ланцюг) антитіла можна окремо інтегрувати в експресійні вектори, якими можна одночасно трансформувати хазяїна, або ДНК, яка кодує Н- і L-ланцюги можна включити в той же самий експресійний вектор, яким можна трансформувати хазяїна (див. International Patent Application Publication No. WO 94-11523).

Антитіло, що його застосовують в даному винаході, може бути фрагментами антитіла або їх модифікованими варіантами до тієї межі, поки антитіло можна адекватно використовувати. Наприклад, фрагменти антитіла можуть включати Fab,  $F(ab')^2$ , Fv чи одноланцюговий Fv (scFv), у яких Fv фрагменти Н-ланцюга і L-ланцюга з'єднані за допомогою придатного лінкера.

Зокрема, щоб одержати фрагменти антитіла, антитіло обробляють за допомогою ферменту, наприклад, папаїну, пепсину, чи конструюють ген, що кодує фрагмент антитіла, і вставляють його в експресійний вектор, який експресують у клітинах придатного хазяїна (див., наприклад, Co M. S. et al., *J. Immunol.*, 152:2968-2976, 1994; Better M. and Horwitz A. N., *Methods in Enzymology*, 178:476-496, 1989; Plueckthun A. and Scerra A., *Methods in Enzymology*, 178:497-515, 1989; Lamoyi E., *Methods in Enzymology*, 121:652-663, 1989; Rousseaux J. et al., *Methods in Enzymology*, 121, 663-666, 1989; Bird R. E. et al., *TIBTECH*, 9:132-137, 1991).

Фрагмент scFv можна одержати літуванням V-області Н-ланцюга і V-області L-ланцюга антитіла. У цьому scFv V-область Н-ланцюга і V-область L-ланцюга переважно з'єднують через лінкер, бажано це пептидний лінкер (Huston J. S., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:5879-5883, 1988). V-область Н-ланцюга і V-область L-ланцюга в scFv можуть походити з кожного зі згаданих вище анти-

тіл. Як пептидний лінкер для з'єднання V-областей може бути використаний, наприклад, певний одноланцюговий пептид, який включає 12-19 амінокислотних залишків.

ДНК, яка кодує scFv, одержують методом ПЛР за допомогою ампліфікації ділянки ДНК, що кодує бажану амінокислотну послідовність, ділянки ДНК, що кодує Н-ланцюг чи V-область Н-ланцюга зазначеного вище антитіла, які використовують як матриці, застосовуючи пару праймерів, що визначають обидва їх кінці; потім на наступному етапі ампліфікують ДНК, що кодує ділянку пептидного лінкера, і обидва кінці зазначеної ДНК з'єднують з парою праймерів, які визначають їх з'єднання з Н-ланцюгом і L-ланцюгом, відповідно.

Крім того, після конструювання молекул ДНК, що кодують scFv, за допомогою загальноприйнятих методів можна одержати експресійний вектор, який містить ці ДНК, і хазяїна, якого трансформовано експресійним вектором, і відповідно до загальноприйнятих методів, можна одержати scFv, використовуючи отриманий трансформований організм хазяїна.

Для таких фрагментів антитіла можна одержати їх гени, експресувати і продукувати їх в організмі хазяїна, як було відзначено вище. Термін «антитіло», як його вживають у даному винаході також включає ці фрагменти антитіла.

Як модифіковане антитіло можна використовувати антитіло, зв'язане з різними молекулами, такими як поліетиленгліколь (PEG). Термін «антитіло», як його вживають у даному винаході також включає ці модифікації антитіла. Щоб одержати такі модифікації антитіла, отримане антитіло хімічно модифікують. Ці методи є вже добре відомими в даній галузі техніки.

Отримане і експресоване, як описано вище, антитіло можна ізолювати із зовнішніх і внутрішніх компартментів клітин і хазяїна й очистити до гомогенного стану. Виділення і очищення антитіла, застосовуваного в даному винаході, можуть бути виконані за допомогою афінної хроматографії. Колонки, які використовують для афінної хроматографії, включають Protein A та Protein G колонки. Носії, які використовуються в Protein A колонці, включають Hyper D, POROS, Сефарозу F і т.п. Без яких-небудь обмежень можуть бути використані будь-які придатні загальноприйняті методи розділення/очищення звичайних білків.

Наприклад, антитіло, застосовуване в даному винаході, може бути виділене за допомогою вибраної певним чином і комбінованої хроматографії, відмінної від зазначеної вище афінної хроматографії, за допомогою фільтрації, ультрафільтрації, знеосолення, діалізу і т.п. Приклади хроматографії включають іонообмінну хроматографію, гідрофобну хроматографію, гель-фільтрацію і т.п. Ці різновиди хроматографії можна застосовувати в HPLC (рідинна хроматографія високого розрізнення). Також можна використовувати обернено-фазову HPLC.

Вимірювання концентрації антитіла, отриманого, як описано вище, можна проводити, вимірюючи оптичне поглинання чи за допомогою імуноферментного аналізу (ELISA). Тобто, при вимірюванні оптичного поглинання, антитіло розводять певним

чином за допомогою PBS (-) а потім вимірюють оптичне поглинання при 280нм і розраховують концентрацію, приймаючи, що 1мг/мл дає поглинання, рівне 1,35 OD. При використанні методу ELISA вимірювання проводять у такий спосіб. Отже, 100мкл козячих антитіл до імуноглобулінів IgG людини (виробництво фірми TAG), розведених до концентрації 1мкг/мл у 0,1М бікарбонатному буфері (pH 9, 6), вносять у 96-лунковий планшет (виробництво фірми NUNC) та інкубують протягом ночі при 4°C для іммобілізації антитіл. Після блокування, вносять по 100мкл кожного розведеного певним чином антитіла, застосовуваного в даному винаході, або зразка, що включає антитіло, або IgG людини (виробництво фірми Carpe) як стандарт і інкубують при кімнатній температурі протягом 1 години.

Після промивання вносять 100мкл розведених у 5000 разів антитіл до імуноглобулінів IgG людини, мічених лужною фосфатазою (виробництво фірми Bio Source), і інкубують при кімнатній температурі протягом 1 години. Після промивання додають і інкубують розчин субстрату, а потім, щоб розрахувати концентрацію бажаного антитіла, вимірюють поглинання при 405 нм за допомогою фотометра Microplate Reader Model 3550 (виробництво фірми Bio-Rad).

Модифікований IL-6, застосовуваний у даному винаході, належить до речовин, які проявляють активність зв'язування з рецептором IL-6 і які не передають біологічно активного сигналу IL-6. Модифікований IL-6 не передає біологічно активного сигналу IL-6 тому, що він конкурентно щодо IL-6 зв'язується з рецептором IL-6, блокуючи, таким чином, передачу сигналу IL-6.

Модифікований IL-6 конструюють шляхом одержання варіантів IL-6 за допомогою заміни амінокислотних залишків в амінокислотній послідовності IL-6. IL-6, який є джерелом модифікованого IL-6, може бути будь-якого походження, але якщо брати до уваги антигенність, то бажано він повинний бути IL-6 людини.

Зокрема, модифікацію IL-6 проводять, прогнозуючи вторинну структуру амінокислотної послідовності IL-6 з використанням відомої в цій галузі техніки програми молекулярного моделювання амінокислотної послідовності, наприклад, програми WHATIF (Vriend et al. J. Mol. Graphics, 8:52-56, 1990), оцінюючи потім вплив заміни окремих амінокислотних залишків у цілому білку. Після того, як було зроблено вибір придатних амінокислотних залишків для амінокислотної заміни, одержують ген, який кодує модифікований IL-6, одержуючи його варіанти за допомогою методу, який звичайно застосовують для цього полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), у якому амінокислоти заміщують, використовуючи як матрицю вектор, який включає послідовність основ, яка кодує людський ген IL-6. Модифікований IL-6 можна одержати, за необхідності, вставляючи його в придатний експресійний вектор у відповідності зі способами експресії, продукції й очищення згаданого вище рекомбінантного антитіла.

Типові приклади модифікованого IL-6 розкриті в роботі Brakenhoff et al., J. Biol. Chem., 269:86-93,

1994 і Savino et al., EMBO J., 13:1357-1367, 1994, WO 96/18648 і WO 96/17869.

Неповні пептиди IL-6 чи неповні пептиди рецептора IL-6, застосовувані в даному винаході, проявляють активність зв'язування з рецептором IL-6 чи з IL-6, відповідно, і є речовинами, які не передають біологічної активності IL-6. Тобто, неповні пептиди IL-6 або неповні пептиди рецептора IL-6 специфічно інгібують зв'язування IL-6 з рецептором IL-6, приєднуючись до рецептора IL-6 або IL-6, відповідно, і фіксуючи їх. У результаті, оскільки вони не передають біологічно активного сигналу IL-6, вони блокують передачу сигналу IL-6.

Неповний пептид IL-6 чи неповний пептид рецептора IL-6 є пептидами, які включають деяку частину чи повну амінокислотну послідовність, яка приймає участь у зв'язуванні IL-6 з рецептором IL-6, в амінокислотній послідовності IL-6 чи рецептора IL-6. Такий пептид звичайно включає від 10 до 80, краще від 20 до 50, ще краще від 20 до 40 амінокислотних залишків. Неповний пептид IL-6 чи неповний пептид рецептора IL-6 можуть бути сконструйовані шляхом визначення ділянки, яка приймає участь в зв'язуванні з IL-6 або з рецептором IL-6 в амінокислотній послідовності IL-6 чи рецептора IL-6, і за допомогою синтезу деякої частини або всієї амінокислотної послідовності загальноприйнятими методами, такими як генна інженерія або метод пептидного синтезу.

Щоб одержати неповний пептид IL-6 чи неповний пептид рецептора IL-6 за допомогою генної інженерії, послідовність ДНК, що кодує бажаний пептид, вводять у експресійний вектор, використовуючи способи експресії, продукції й очищення, згадані вище для рекомбінантного антитіла.

Щоб одержати неповний пептид IL-6 чи неповний пептид рецептора IL-6 за допомогою пептидного синтезу, можна використовувати методи, звичайно застосовувані в пептидному синтезі, наприклад, твердофазовий метод синтезу або рідиннофазовий метод синтезу.

Зокрема, можна проводити синтез відповідно до методу, описаного у роботі Zoku Iyakuin, Kaihatsu, Vol. 14, Peptido Gousei, (Ed. Yajima, H., Hirokawa Shoten, 1991). Як твердофазовий метод синтезу застосовується, наприклад, метод, у якому пептидний ланцюг нарощують шляхом приєднання амінокислоти, яка відповідає С-кінцю синтезованого пептиду, до підложки, яка нерозчинна в органічних розчинниках, і потім повторюють реакцію, у якій певну амінокислоту послідовно конденсують у напрямку від С- до N-кінців в амінокислотах, у яких  $\alpha$ -аміногрупа і функціональні групи бічного ланцюга захищені за допомогою придатних захисних груп, і реакцію, у якій зазначену захисну групу  $\alpha$ -аміногрупи амінокислоти видаляють з амінокислот чи пептиду, приєднаних до підложки. Методи твердофазового пептидного синтезу загалом класифікуються як Вос-метод і Fmoc-метод, залежно від типу захисних груп, які застосовуються.

Після синтезу бажаного пептиду, проведеного таким способом, проводять реакцію зняття захисту і реакцію відщеплення пептидного ланцюга від підложки. У реакції відщеплення пептидного ланцюга від носія у Вос-методі звичайно використо-

вують фтористий водень або трифторметансульфонат, а у Fmoc-методі - TFA. У Boc-методі згадану вище підложку захищеного пептиду обробляють фтористим воднем у присутності анізолу. Потім для одержання пептиду проводять видалення захисної групи і відщеплення пептиду від підложки. Для одержання неочищеного препарату пептиду його ліофілізують. З іншого боку, у Fmoc-методі, наприклад, у TFA, реакцію зняття захисту і реакцію відщеплення пептиду з підложки можна проводити за допомогою процедури, подібної до описаної вище.

Отриманий неочищений пептид можна виділити й очистити за допомогою методу HPLC. Елювання можна проводити за оптимальних умов, використовуючи систему розчинників вода-ацетонітрил, яку звичайно використовують для очищення білків. Фракції, що відповідають пікам профілю результуючої хроматографії, збирають і ліофілізують. Очищені в такий спосіб пептидні фракції ідентифікують, аналізуючи молекулярну масу за допомогою мас-спектроскопічного аналізу, аналізу амінокислотного складу чи аналізу амінокислотної послідовності.

Типові приклади неповних пептидів IL-6 і рецептора IL-6 розкриті в JP-A-2-188600, 7-324097 і 8-311098, а також у патенті US 5210075.

Фармацевтичні композиції даного винаходу можуть включати фармацевтично прийнятні носії або добавки, вибір яких залежить від способу введення засобу. Приклади таких носіїв або добавок включають воду, фармацевтично прийнятні органічні розчинники, колаген, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, карбоїссивініловий полімер, натрієву сіль карбоксиметилцелюлози, поліакрилат натрію, альгінат натрію, водорозчинний декстран, натрієву сіль карбоксиметильованного крохмалю, пектин, метилцелюлозу, етилцелюлозу, ксантанову камедь, гуміарабік, казеїн, желатин, агарозу, дигліцерин, пропіленгліколь, поліетиленгліколь, вазелін, парафін, стеариловий спирт, стеаринову кислоту, сироватковий альбумін людини (HSA), маніт, сорбіт, лактозу, фармацевтично прийнятні поверхнево-активні речовини і т.п. У залежності від композиції добавки, які застосовуються вибирають з перерахованих вище сполук або їх комбінацій, але цим списком не обмежуються.

#### Приклади.

Даний винахід тепер буде детально описано нижче за допомогою прикладів і типових прикладів, але обсяг даного винаходу не обмежується цими прикладами.

#### Приклад 1.

MRA є рекомбінантним гуманізованим моноклональним антитілом (підтипу IgG1) до рецептора інтерлейкіну-6 людини, який інгібує функцію цитокіну інтерлейкіну-6 (IL-6). У ранніх дослідженнях у Японії і Європі MRA демонстрував перспективи в лікуванні ревматоїдного артриту і добре переносився пацієнтами.

Це був великомасштабні клінічні випробування MRA II стадії для визначення оптимальної дози MRA, що давали окремо або в комбінації з метотрексатом для лікування ревматоїдного артриту. Потенційна ефективність багаторазових внутрішньовенних прийомів MRA як при монотерапії, так і

в комбінації з метотрексатом, оцінювалася в пацієнтів з активним ревматоїдним артритом, незважаючи на лікування метотрексатом протягом певного проміжку часу, і її порівнювали з монотерапією метотрексатом. Оцінювали ефективність, безпеку і легкість перенесення MRA.

#### Методи.

Суб'єкти. Реєстрували пацієнтів з ревматоїдним артритом, який було діагновано на підставі класифікації захворювань Американської колегії ревматології (ACR) 1987 року, і який тривав, щонайменше, 6 місяців. У пацієнтів повинна була бути активна форма захворювання і неадекватна відповідь чи спалах захворювання після прийому тільки метотрексата (MTX), який давали пацієнтам, щонайменше, протягом 6 місяців у дозуванні, щонайменше, 12,5мг щотижня чи 10мг щотижня у випадку важкого перенесення.

Модель вивчення. Двічі сліпий, рандомізований (випадковий) метод, вивчення паралельних груп за допомогою центрального рандомізованого методу.

Дозування і прийом засобу. Сім груп: 0 мг/кг MRA (плацебо, лікарська форма, що містить нейтральні речовини) + MTX, 2мг/кг MRA+ MTX, 4мг/кг MRA+ MTX, 8мг/кг MRA+ MTX, 2мг/кг MRA+ MTX плацебо, 4мг/кг MRA+ MTX плацебо і 8мг/кг MRA+ MTX плацебо. Прийом MRA чи плацебо здійснюють за допомогою внутрішньовенного введення з інтервалами в 4 тижні.

Прийом MTX чи MTX плацебо здійснюють перорально, один раз на тиждень у дозуванні 10-25мг/тиждень.

Спосіб вивчення. Призначену дозу вводили за допомогою внутрішньовенного введення за чотири рази з 4х-тижневими інтервалами, і ефективність і безпеку оцінювали з 2х-тижневими інтервалами протягом 16 тижнів, і заключне спостереження проводили на 20 тижні. Вихідною границею ефективності був рівень ACR, рівний 20, на 16 тижні (4 тижні після останньої дози). Вторинні границі включали рівні ACR, рівні 50 і 70, на 16 тижні (4 тижні після останньої дози).

Критерії поліпшення ACR. Випадки, коли в наступних 7 пунктах за числом опухлих суглобів і числом суглобів, які болять відбувається поліпшення на 201 чи більше, і поліпшення на 20% чи більше спостерігається в трьох з п'яти пунктів, що залишилися, визначаються як 20%-ний чи більш високий відсоток поліпшення за критеріями ACR. Крім цього, випадки 50%- і 70%-ного поліпшення означають випадки, коли стан більше ніж 20% частин тіла пацієнта з поліпшеними показниками поліпшується на 50% і 70%, відповідно:

(1) число опухлих суглобів;

(2) число суглобів, що болять;

(3) оцінка болю пацієнтом;

(4) загальна оцінка активності хвороби пацієнтом;

(5) загальна оцінка активності захворювання терапевтом;

(6) оцінка фізичної функції пацієнтом;

(7) CRP або ESR.

Статистично значимий у порівнянні з контрольною групою відсоток поліпшення, більш високий, ніж ACR 20, спостерігався у всіх групах, за винятком

ком групи, яка одержувала тільки MRA у кількості 2мг/кг. У групі (MRA 8мг/кг + MTX) відсоток поліпшення ACR 50 і 70 складав 53,1% і 36,7%, відпові-

дно, що статистично було більш значиме в порівнянні з контрольною групою, у якій ці показники складали 28,6% і 16,3%, відповідно (таблиця 1).

Таблиця 1

	2мг/кг MRA	4мг/кг MRA	8мг/кг MRA	MTX
ACR 20	30,8%	61,1%	62,7%	40,8*
ACR 50	5,8%	27,8%	41,2%	26,6%
ACR 70	1,9%	5,6%	15,7%	16,3%
	2мг/кг MRA+MTX	4мг/кг MRA+MTX	8мг/кг MRA+MTX	
ACR 20	64,0%	63,3%	73,5%	
ACR 50	32,0%	36,7%	53,1%	
ACR 70	14,0%	12,2%	36,7%	

У групах, які приймали тільки MRA, статистично значиму дозо-залежність спостерігали для ACR 20. Крім того, для ACR 50 і ACR 70 статистично значиму дозо-залежну відповідь спостерігали як у групі, яка приймала тільки MRA, так і в MTX-комбінованій групі.

Зменшення числа опухлих суглобів (Таблиця 2).

Усереднена кількість опухлих суглобів на вихідному рівні була однаковою серед усіх груп, підданих лікуванню.

Відбувалося зменшення, яке накопичувалось, середньої кількості опухлих суглобів при збільшенні часу впливу у всіх сімох групах, підданих лікуванню. Середнє зменшення кількості опухлих

суглобів у «MRA 8мг/кг» групі було статистично значимим у порівнянні зі зменшенням у «MTX» групі ( $p=0,010$ ). На 16-ому тижні середнє розходження (95% CI) між «MRA 8мг/кг» групою і «MTX» групою склало -2,31 (-4,07, -0,55). Виявлена статистично значима лінійна дозо-залежність між групами, підданими монотерапії MRA ( $p<0,001$ ). Середнє зменшення числа опухлих суглобів у «MRA 8мг/кг + MTX» групі було статистично значимим у порівнянні зі зменшенням у «MTX» групі ( $p<0,001$ ). Середнє розходження (95% CI) між «MRA 8мг/кг» групою і «MTX» групою склало -3,62 (-5,39, -1,84).

Виявлена статистично значима лінійна дозо-залежність між групами, підданими монотерапії MRA ( $p=0,004$ ).

Таблиця 2

	2мг/кг MRA	4мг/кг MRA	8мг/кг MRA	MTX
Базова лінія: N Середнє $\pm$ SD	52 11,6 $\pm$ 4,6	54 11,1 $\pm$ 4,4	51 12,2 $\pm$ 5,2	49 12,7 $\pm$ 4,2
Зміна базової лінії: 16 тижнів, N Середнє $\pm$ SD	42 -4,5 $\pm$ 5,7	43 -5,8 $\pm$ 4, 1	43 -8,4 $\pm$ 4,6	39 -5,7 $\pm$ 6,1
	2мг/кг MTX + MRA	4мг/кг MTX +MRA	8мг/кг MRA +MTX	
Базова лінія: N Середнє $\pm$ SD	50 11,9 $\pm$ 4,3	49 11,9 $\pm$ 3,9	49 11,8 $\pm$ 3,9	
Зміна базової лінії: 16 тижнів, N Середнє $\pm$ SD	46 -6,2 $\pm$ 4,6	42 -6,8 $\pm$ 5,4	44 -9,4 $\pm$ 4,0	

Серед 359 зареєстрованих пацієнтів групи оцінки безпеки, повного аналізу і PPS (на набір протоколів) склали 359, 354 і 307 чоловік, відповідно. Усього було зареєстровано 359 пацієнтів, 299 провели повне дослідження і 60 пацієнтів були виключені. Серед виключених пацієнтів у 33 були несприятливі наслідки, в одного виникло ускладнення іншого захворювання, сім чоловік відмовилося від дослідження через ліки, заборонені для одночасного використання, п'ять - через небажання довести дослідження до кінця і 22 через відсутність ефективності (включаючи множинні причини).

Серед серйозних несприятливих випадків, причинні зв'язки яких не були з'ясовані, було повідомлено про п'ять випадків інфекції. Тобто, було повідомлено про одного пацієнта з абсцесом ступні й остеомієлітом у «2мг/кг MRA» групі, про один пацієнта з інфекцією грудної клітини і плевритом,

про одного пацієнта із сепсисом у «8мг/кг MRA + MTX» групі і про одного пацієнта з інфекцією суглоба в «8мг/кг MRA + MTX» групі. Крім того, було повідомлено про п'ять випадків гіперчутливості як серйозного ускладнення, причинний зв'язок якої встановлено не було, це чотири пацієнти з гіперчутливістю в «2мг/кг MRA» групі й один пацієнт із гіперчутливістю в «4мг/кг MRA» групі. Усі ці випадки гіперчутливості спостерігалися при лікуванні без MTX після 3-його і 4-ого прийому.

Що стосується лабораторних даних дослідження функцій печінки, то хоча в результаті застосування MRA і спостерігали підвищення рівнів ALT і AST, таке підвищення було еквівалентно тим, які спостерігалися у інших пацієнтів з ревматоїдним артритом. У «MRA» групах спостерігали підвищення показників у результатах лабораторних досліджень, які мають відношення до ліпідів (загальний холестерин, HDL-холестерин і триглі-

цериди). Однак сумарних змін в атерогенному індексі виявлено не було.

У деяких пацієнтів спостерігали невелике тимчасове зниження кількості нейтрофілів. Клінічно значимі зміни параметрів, що спостерігались, характерні для активного захворювання, наприклад, зменшення CRP і ESR і підвищення гемоглобіну, відбувалися дозо-залежним чином.

Реакція на введення.

Реакцію на введення визначали як несприятливий вплив, що відбувався протягом 24 годин дослідження після введення засобу. Число пацієнтів, які пережили реакцію на введення, у кожній групі, підданій лікуванню, дозволило припустити існування можливої інверсійної дозо-залежності від MRA.

Антитіло до MRA.

Досліджували появу антитіл до MRA. У групах 8мг/кг (монотерапія чи комбінована терапія з MTX) таких антитіл виявлено не було. У групах 2 чи 4 мг/кг число випадків було менше в групах з комбінованою терапією з MTX у порівнянні з групами, підданими монотерапії MRA.

Результати.

При монотерапії MRA і комбінованій терапії MRA і метотрексатом спостерігали виражену дозо-залежну відповідь. Ефективність MRA для лікування пацієнтів з ревматоїдним артритом була підтверджена як для монотерапії MRA, так і для комбінованої терапії MRA і метотрексатом. Також безпека використання MRA була підтверджена як для монотерапії MRA, так і для комбінованої терапії MRA і метотрексатом.

Типовий приклад 1. Одержання розчинного рецептора IL-6 людини.

Розчинний рецептор IL-6 одержували за допомогою методу ПЛР із використанням плазмиди pBSF2R.236, яка містить кДНК, що кодує рецептор IL-6, і отриманої відповідно до методу Yamasaki et al. (Yamasaki K. et al., Science, 241:825-828, 1988). Плазмиду pBSF2R.236 розщеплювали за допомогою рестриктази SphI, щоб одержати кДНК для рецептора IL-6, яку потім вставили у вектор tr18 (виробництво фірми Amersham). Використовуючи синтетичні олігопраймери, сконструйовані для введення стоп-кодона в кДНК рецептора IL-6, за допомогою методу ПЛР із використанням «in vitro Mutagenesis System» (виробництво фірми Amersham) вводили варіанти в кДНК рецептора IL-6. У результаті цієї процедури відбулося введення стоп-кодона в 345-те положення амінокислотного ланцюга, що привело до одержання кДНК, який кодує розчинний рецептор IL-6.

Для того щоб експресувати кДНК у клітинах CHO, кДНК розчинного рецептора IL-6 лігували в плазмиду pSV (виробництво фірми Pharmacia), щоб одержати плазмиду pSVL344. кДНК розчинного рецептора IL-6, розщеплену за допомогою рестриктаз HindIII і Sail, вставляли в плазмиду pCEdhfr, яка містить кДНК dhfr, щоб одержати експресійну плазмиду pCEdhfr344 для клітин CHO.

За допомогою методу осадження фосфатом кальцію (Chen C. et al., Mol. Cell. Biol., 7:2745-2751, 1987) 10мкг плазмиди pCEdhfr344 трансферували в dhfr-CHO-лінію клітин DXB-11 (Urlaub G. et al.,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216-4220, 1980). Трансферовані CHO-клітини вирощували протягом 3 тижнів у селекційному середовищі  $\alpha$ -MEM, яка не містила нуклеозидів і яка містила 1мМ глутаміну, 10%-ний діалізований FCS, 100 Од/мл пеніциліну і 100мкг/мл стрептоміцину.

Селекцію CHO-клітин проводили за допомогою методу граничного розведення, щоб одержати клон від єдиної CHO-клітини. Клітинний клон CHO був розмножений у середовищі, яке містить від 20нм до 200нм метотрексата (MTX), для одержання лінії CHO-клітин 5E27, яка продукує розчинний рецептор IL-6 людини. Лінію CHO-клітин 5E27 культивували в середовищі Дульбекко в модифікації Іскова (IMDM, виготовлено фірмою Gibco), яка містить 5%-ний FBS. Супернатант культури клітин збирали й визначали за допомогою методу ELISA концентрацію розчинного рецептора IL-6 у супернатанті клітинної культури. Результати підтвердили, що в супернатанті клітинної культури присутній розчинний рецептор IL-6.

Типовий приклад 2. Одержання антитіла до IL-6 людини.

Миші BALB/c були імунізовані 10мкг рекомбінантного IL-6 (Hirano et al., Immunol. Lett., 17:41, 1988) разом з повним ад'ювантом Фрейнда, і імунізацію повторювали щотижня доти, доки в сироватці не були виявлені антитіла до IL-6. Імунні клітини видаляли з локальних лімфатичних вузлів і потім їх зливали з лінією клітин мієломи P3U1, використовуючи для цього поліетиленгліколь 1500. Гібридами відбирали відповідно до методу Oi et al. (Selective Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980), у якому використовують середовище HAT, і переконувалися в одержанні гібридом, що продукує антитіла до IL-6 людини.

Для гібридом, яка продукує антитіла до IL-6 людини, проводили вимірювання зв'язування IL-6, як описано нижче. Отже, 96-лунковий мікротитрувальний планшет, зроблений із гнучкого полівінілу (виробництво фірми Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA), покривали 100мкл козячих антитіл до імуноглобулінів IgG миші (10мкл/мл, виробництво фірми Cooper Biomedical, Inc., Malvern, PA) у 0,1М карбонат-гідрокарбонатному буфері (pH 9,6) при 4°C протягом ночі. Потім планшет обробляли 100мкл PBS, який містить 1%-ний бичачий сироватковий альбумін (BSA) протягом 2 годин при кімнатній температурі.

Планшет промивали PBS-буфером, у кожному лунку вносили по 100мкл супернатанта гібридомної культури, і інкубували при 4°C протягом ночі. Планшет промивали, у кожному лунку вносили  $^{125}$ I-мічений рекомбінантний IL-6 до концентрації 2000 cpm/0,5 нг/лунку, планшет промивали і потім за допомогою гама-лічильника (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA) вимірювали радіоактивність у кожній лунці. У результаті з 216 клонів гібридом 32 клони були позитивними при вимірюванні зв'язування IL-6. З цих клонів в остаточному підсумку було отримано стабільний клон MH166.BSF2. Антитіла до IL-6 MH166, продуковані, відносилися до субтипу IgG1k.

Потім вивчали активність антитіла MH166 по нейтралізації росту клітин гібридом, використовую-

ючи IL-6-залежний клон MH166.BSF2 мишачої гібридоми. Клітини MH166.BSF2 вносили в кількості  $1 \times 10^4$ /200мкл/лунку, туди ж вносили зразок, що містить антитіла MH166, потім інкубували протягом 48 годин і додавали 0,5мкКи/лунку  $^3\text{H}$ -тімідину (New England Nuclear, Boston, MA). Після додаткового росту протягом наступних 6 годин клітини поміщали на фільтр із скловолокна й обробляли його за допомогою автоматичного пристрою «Харвестер» (Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan). Як контроль використовували кролячі антитіла до IL-6.

У результаті антитіла MH166 інгібували дозозалежним способом включення  $^3\text{H}$ -тімідину в клітини MH60.BSF2, індуковані IL-6. Це показало, що антитіла MH166 нейтралізують активність IL-6.

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

Для очищення специфічного до рецептора IL-6 антитіла MT18/ отриманого за методом Hirata et al. (Hirata Y. et al. J. Immunol., 143:2900-2906, 1989), воно було приєднано до CNBr-активованої Сефарози 4В (виробництво фірми Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) відповідно до прикладеного протоколу (Yamasaki K. et al., Science, 241:825-828, 1988). Лінія клітин мієломи людини U2 66 була солюбілізована в 1мМ розчині пара-амінофенілметансульфонілфторидгідрохлориду (виробництво фірми Wako Chemicals), розчиненому в 1%-ному дигітоніні, 10мМ етаноламіні (pH 7,8) і 1,5 М NaCl (дигітоніновий буфер), і змішана з антитілом MT18, приєднаним до кульок Сефарози 4В. Потім кульки промивали шість разів дигітоніновим буфером і представляли їх як частково очищений препарат рецептора IL-6 для імунізації.

Миші BALB/c були імунізовані чотири рази через кожні десять днів зазначеним вище частково очищеним рецептором IL-6, отриманим з  $3 \times 10^9$  клітин U2 66, і потім за допомогою стандартного методу одержували гібридоми. Супернатанти гібридомної культури з лунок з позитивним ростом аналізували на активність зв'язування з рецептором IL-6 у відповідності зі способом, описаним нижче.  $5 \times 10^7$  клітин U266 були помічені  $^{35}\text{S}$ -метіоном (2,5 мКи) і були солюбілізовані в зазначеному вище дигітоніновому буфері. Солюбілізовані клітини U266 були змішані з 0,04мл об'єму антитіла MT18, приєднаного до кульок сефарози 4В, і потім були промиті шість разів дигітоніновим буфером, потім  $^{35}\text{S}$ -метіонін-мічений рецептор IL-6 елюювали 0,25мл дигітонінового буфера (pH 3,4) і нейтралізували 0,025мл 1М триса (pH 7,4).

Супернатант культури клітин гібридоми (0,05мл) змішували з 0,01мл Protein G-Сефарози (виробництво фірми Pharmacia). Після промивання Сефарозу інкубували з 0,005мл розчину  $^{35}\text{S}$ -метіонін-міченого рецептора IL-6, отриманого, як було описано вище. Імунопреципітат аналізували за допомогою ПААГ електрофорезу в присутності додецилсульфата натрію (SDS), і досліджували супернатанти культури клітин гібридоми, які реагували з рецептором IL-6. У результаті був виявлений реакційно-позитивний клон гібридоми PM-1 (FERM BP-2998). Антитіло, яке продукується гібридомною PM-1, відноситься до підтипу IgG1K.

За допомогою лінії клітин мієломи людини U266 вивчали інгібуючу активність антитіла, яке продукується гібридомною PM-1, націлену на процес зв'язування IL-6 з рецептором IL-6 людини. Рекомбінантний IL-6 людини був отриманий з E. coli (Hirano et al., Immunol. Lett., 17:41-45, 1988) і помічений  $^{125}\text{I}$  (Тада Т. et al., J. Exp. Med., 166:967-981, 1987) з використанням реагенту Болтона-Хантера (New England Nuclear, Boston, MA).

Клітини U266 у кількості  $4 \times 10^5$  вирощували в 70% (v/v) супернатанті культури клітин гібридоми PM-1 і в присутності IL-6, міченого  $^{125}\text{I}$  (14000 cpm). Зразок (70мкл) нашаровували на 300мкл FCS у мікроцентрифужній поліетиленовій пробірці об'ємом 400мкл і центрифугували з наступним вимірюванням радіоактивності клітин.

У результаті було показано, що антитіло, яке продукується гібридомною PM-1, інгібує зв'язування IL-6 з рецептором IL-6.

Типовий приклад 4. Одержання мишачого антитіла до рецептора IL-6

Моноклональне антитіло, спрямоване проти мишачого рецептора IL-6, було отримано за методом, описаним в роботі Saito et al., J. Immunol., 147:168-173, 1991.

Клітини CHO, які продукують розчинний мишачий рецептор IL-6, вирощували в культуральному середовищі IMDM, яке містить 10%-ний FCS, і розчинний мишачий рецептор IL-6 очищували із супернатанта культури клітин за допомогою афінної колонки, у якій антитіла RS12 (див. Saito et al., J. Immunol., 147:168-173, 1991) до мишачого рецептора IL-6 були пришиті до гелю Affigel 10 (виробництво фірми Biorad).

Отриманий у такий спосіб розчинний мишачий рецептор IL-6 (50мкг) змішували з повним ад'ювантом Фрейнда, який вводили за допомогою ін'єкції в черевну порожнину пацюків Wistar. Через два тижні проводили додаткову імунізацію тварин повним ад'ювантом Фрейнда. На 45 день відбирали клітини селезінки пацюка, і  $2 \times 10^8$  клітин зливали з  $1 \times 10^7$  клітин мишачої мієломи P3U1 відповідно до традиційного методу, використовуючи 50%-ний PEG 1500 (виробництво фірми Boehringer Mannheim) з наступним скринінгом гібридом у культуральному середовищі НАТ.

Супернатанти культури клітин гібридоми вносили в лунки планшета, покриті кролячим антитілом до імуноглобулінів IgG пацюка (виробництво фірми Cappel), де мишачий розчинний рецептор IL-6 вступав у реакцію. Потім, використовуючи кролячі антитіла до мишачого рецептора IL-6 і баранячі антитіла до кролячих імуноглобулінів IgG, мічені лужною фосфатазою, за допомогою методу ELISA відбирали гібридоми, які продукують антитіла до розчинного мишачого рецептора IL-6. Клон гібридоми, для якого була показана здатність продукувати таке антитіло, двічі субклонували й одержали одиничний клон гібридоми. Цей клон був названий MR16-1.

Нейтралізуючу активність антитіла, продукованого цією гібридомною, спрямовану на процес передачі сигналу від IL-6 миші, вивчали за допомогою включення  $^3\text{H}$ -тімідину з використанням клітин MH60.BSF2 (Matsuda T. et al., J. Immunol., 18:951-956, 1988). Клітини MH60.BSF2 поміщали в

96-лунковий планшет з розрахунку  $1 \times 10^4$  клітин/200мкл/лунку. У планшет вносили 10пг/мл мишачого IL-6 і антитіла MR 16-1 або антитіла RS12 у кількості від 12,3 до 1000нг/мл, потім клітини вирощували при температурі 37°C протягом 44 годин при 5%-ному вмісті CO<sub>2</sub>, і потім до них додавали 1мкКі/лунку <sup>3</sup>H-тімідину. Через 4 години вимірюва-

ли включення <sup>3</sup>H-тімідину. У результаті було виявлено, що антитіло MR16-1 гальмувало включення <sup>3</sup>H-тімідину в клітини MH60.BSF2. Таким чином, було показано, що антитіло, яке продукується гібридомною MR 16-1 (FERM BP-5875), інгібує зв'язування IL-6 з рецептором IL-6.