

Передумови створення винаходу

Область техніки

Даний винахід стосується антитіл, включаючи певні ділянки чи варіанти, специфічні щодо щонайменше одного протеїну інтерлейкіну-6 (ІЛ-6, відомий також як інтерферон $\beta 2$) чи його фрагмента, а також нуклеїнових кислот, що кодують такі анти-ІЛ-6 антитіла, комплементарних нуклеїнових кислот, векторів, клітин-хазяїв та способів їхнього одержання та застосування, включаючи терапевтичні композиції, введення та пристрої.

Відомий рівень техніки

Інтерлейкін-6 (ІЛ-6) є прозапальним цитокином, який продукується багатьма різними типами клітин. In vivo, основними джерелами ІЛ-6 є стимульовані моноцити, фібробласти та ендотеліальні клітини. Інші клітини, такі як макрофаги, Т- та В-лімфоцити, гранулоцити, кератиноцити, мастоцити, остеобласти, хондроцити, гліоцити та клітини гладких м'язів також продукують ІЛ-6 після стимулювання (Kishimoto, T., Blood 74:1-10 (1989), та Kurihara, N. et al., J. Immunology 144:4226-4230 (1990)). Кілька пухлинних клітин також продукують ІЛ-6 (Smith, P.C. et al. Cytokine and Growth Factor Reviews 12:33-40 (2001)), і нещодавно було показано, що ІЛ-6 є прогностичним фактором розвитку раку простати (Nakashima, J. et al. Clinical Cancer Research 6:2702-2706 (2000)). Продукування ІЛ-6 може регулюватися самим ІЛ-6 і, у залежності від типу клітин, ІЛ-6 може стимулювати чи інгібувати свій власний синтез.

ІЛ-6 має зв'язуватися з рецептором ІЛ-6, що експресується на мітоген-активованих В-клітинах, Т-клітинах, периферичних моноцитах та певних пухлинах (Ishimi, Y. et al., J. Immunology 145:3297-3303 (1990)). Рецептор ІЛ-6 має щонайменше два різних компоненти і складається з альфа-ланцюга, названого gp80, який відповідає за зв'язування ІЛ-6, та бета-ланцюга, позначеного gp130, потрібного для трансдукції сигналу (Adebanjo, O. et al., J. Cell Biology 142:1347-1356 (1998), та Poli, V. et al., EMBO 13:1189-1196 (1994)). Усе цитокинове сімейство, що включає ІЛ-6, LIF, онкостатин М, ІЛ-11, CNTF та СТ-1, індукуює сигнали через gp130 після зв'язування зі спорідненими рецепторами. Крім того, всі члени сімейства цитокіну ІЛ-6 можуть індукувати печінкову експресію протеїнів гострої фази (Bellido, T. et al., J. Clin. Investigation 97:431-437 (1996)). 87908790.

ІЛ-6 має щонайменше дві важливі біологічні функції: медіювання гострої фази та роль фактора диференціації та активації (Awisti, G. et al., Baillieres Clinical Hematology 8:815-829 (1995), та Poli, V. et al., EMBO 13:1189-1196 (1994)). Відомо, що протеїни гострої фази регулюють імунні відповіді, медіюють запалення та відіграють певну роль у ремоделюванні тканин. Як фактор диференціації та активації, ІЛ-6 індукуює В-клітини до диференціації та секреції антитіла, індукуює Т-клітини до диференціації у цитотоксичні Т-клітини, активує сигнальні фактори клітин та промотує гематопоез (Ishimi, Y. et al., J. Immunology 145:3297-3303 (1990)). ІЛ-6 явно бере участь у багатьох критичних функціях та процесах організму. В результаті, фізіологічні процеси, включаючи кістковий метаболізм, неопластичні перетворення та імунні і запальні відповіді, можуть бути посилені, пригнічені чи попереджені шляхом маніпуляцій з біологічною активністю ІЛ-6 in vivo за допомогою антитіла (Adebanjo, O. et al., J. Cell Biology 142:1347-1356 (1998)).

Хоч ІЛ-6 бере участь у багатьох метаболічних шляхах, ІЛ-6-нокаут миші мають нормальний фенотип, є життєздатними та фертильними, і у цих тварин спостерігається трохи зменшене число Т-клітин та знижена відповідь протеїну гострої фази на тканинне ушкодження (Kopf M. et al., Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice, Nature:368(6469):339-42, 1994). Навпаки, у трансгенних мишей з надлишковою експресією ІЛ-6 розвиваються неврологічні захворювання, такі як нейродегенерація, астроцитоз, церебральний васкулогенез, і у таких мишей не утворюється гематоенцефалічний бар'єр (Campbell et al., Neurologic Disease Induced in Transgenic mice by Cerebral Overexpression of Interleukin 6 PNAS 90: 10061-10065. 1993).

Недавні дослідження показали, що моноклональні антитіла (Mab) до ІЛ-6 можуть інгібувати in vivo ріст пухлин простати (Smith, P.C. and Keller, E.T., The Prostate, in press, та Okamoto, M. et al., Cancer Research 57:141-146 (1997)) та карциноми нирок (Weissglas, M. et al., The Journal of Urology 153:554-557 (1995)). Крім прямого ефекту на ріст пухлин, блокування продукування ІЛ-6 може також хемосенсибілізувати та посилювати цитотоксичну ефективність (Smith, P.C. et al. Cytokine and Growth Factor Reviews 12:33-40 (2001)). Загалом, нам відомо з літератури, що блокування активності ІЛ-6 може інгібувати деградацію кісток, ріст пухлин та пухлинну кахексію.

Засоби для пасивної імунотерапії з використанням нелюдських поліклональних (наприклад, антисировоткових) чи моноклональних антитіл (Mabs) та їхніх фрагментів (наприклад, продуктів їхнього протеолітичного гідролізу) є потенційними терапевтичними агентами, що розробляються для лікування різних хвороб. Однак, відомо, що антитіла, які вкладаються з нелюдських ділянок, викликають імунну відповідь при введенні людині. Ця імунна відповідь часто робить повторне введення антитіла непридатним для терапії і може спричинити медіований імунним комплексом кліренс антитіла з кровообігу, тим самим зменшуючи лікувальний ефект для пацієнтів. Прикладами станів, які можуть бути приписані повторному введенню антитіла, що складаються з нелюдських ділянок, є сироваткова хвороба та анафілаксія.

У спробі уникнути цих та інших проблем було випробувано ряд підходів, включаючи хімеризацію та "гуманізацію", для зниження імуногенності антитіл/їхніх фрагментів. Ці підходи привели до одержання антитіл зі зниженою імуногенністю. Ці антитіла мають по суті людське походження, і лише гіперваріабельні ділянки (CDR's) та певні каркасні залишки, що впливають на конформацію CDR, є нелюдського походження. Нові людські чи гуманізовані моноклональні антитіла є, таким чином, особливо корисними самі чи у комбінації з відомими молекулами імунотерапевтичного призначення.

Отже, існує потреба у створенні високоафінних, нейтралізуючих химерних чи людських антитіл до ІЛ-6 чи їхніх фрагментів, які вирішують одну чи кілька з цих проблем, а також є кращими у порівнянні з відомими антитілами чи їхніми фрагментами, призначених для використання з метою профілактики, лікування, поліпшення стану чи діагностики станів, асоційованих з ІЛ-6.

Мишачі моноклональні антитіла до ІЛ-6, продуковані з клітинної лінії гібридами, є відомими, наприклад, з патенту США №5618700. Патент США №5856135 розкриває трансформовані людські антитіла до ІЛ-6 людини, одержані з мишачого моноклонального антитіла SK2, у яких гіперваріабельні ділянки (CDR's) з варіабельної

ділянки мишачого антитіла SK2 трансплантують до варіабельної ділянки антитіла людини та з'єднують з постійною ділянкою антитіла людини.

Інші мишачі моноклональні антитіла були описані та класифіковані як нейтралізуючі, тобто, такі, що запобігають зв'язуванню з рецептором, чи ненейтралізуючі (Brakenhoff et al., J. Immunol. (1990) (145:561). У цьому наборі антитіл, нейтралізуючі моноклональні антитіла до ІЛ-6 можуть бути розділені на дві групи; а гадані епітопи на молекулі ІЛ-6 позначені як Сайт I та Сайт II. Сайт I перешкоджає зв'язуванню з gp80 (ІЛ6R) і, таким чином, запобігає активації gp130. Епітоп Сайта I був охарактеризований як такий, що включає ділянки як амінотермінального, так і карбокситермінального фрагментів молекули ІЛ-6. Агенти, що зв'язують Сайт II, перешкоджають активації gp130 і тому можуть розпізнавати конформаційний епітоп, який бере участь у передаванні сигналів.

Відомо мишаче моноклональне антитіло ІЛ-6, назване тут CLB-6/8 чи CLB-8, що має високу афінність до ІЛ-6, зв'язується з епітопом Сайта I, (Brakenhoff et al., supra), але антигензв'язуючі домени (ділянки CDR) цього антитіла є невідомими. Однак, як вказано вище, мишаче антитіло має високу імуногенність у людей, внаслідок чого його терапевтична цінність обмежена. Таким чином, залишається існувати потреба в антитілах до ІЛ-6, які виявляють високу афінність та мають сприятливий фармацевтичний профіль.

Суть винаходу

Даний винахід пропонує ізольовані химерні, гуманізовані та/або CDR-трансплантовані анти-ІЛ-6 антитіла, які мають щонайменше одну антигензв'язуючу ділянку, похідну від високоафінного анти-ІЛ-6 антитіла CLB-8, а також композиції анти-ІЛ-6 антитіла, кодуючі чи комплементарні нуклеїнові кислоти, вектори, клітини-хазяї, композиції, фармацевтичні композиції, пристрої, трансгенні тварини, трансгенні рослини, зв'язані з ними, та методи їхнього виготовлення та використання, описані та уможливлені тут, у комбінації з усіма засобами, відомими фахівцям. Антитіло за даним винаходом специфічно нейтралізує людський ІЛ-6 з високою афінністю.

Даний винахід пропонує щонайменше одне ізольоване людсько-мишаче химерне, гуманізоване чи CDR-трансплантоване анти-ІЛ-6 CLB-8 антитіло ("сCLB-8 антитіло"), яке описано тут. сCLB-8 антитіло у відповідності до даного винаходу включає будь-яку протеїнову чи пептидну молекулу, яка містить щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого чи легкого ланцюга чи його лігандзв'язуючу ділянку, похідну від мишачого CLB-8 моноклонального антитіла, у комбінації з важким ланцюгом чи легким ланцюгом постійної ділянки, каркасну ділянку, чи будь-яку її частину, що може бути включена до складу антитіла за даним винаходом. В одному варіанті втілення винахід стосується анти-ІЛ-6 химерного антитіла, яке включає два легких ланцюга та два важких ланцюга, причому кожний з ланцюгів включає щонайменше частину постійної ділянки людини та щонайменше частину варіабельної ділянки (V), похідної від мишачого CLB8 моноклонального антитіла із специфічністю до людського ІЛ-6, зазначене антитіло зв'язується з високою афінністю з інгібуючим та/або нейтралізуючим епітопом людського ІЛ-6, такого як антитіло сCLB-8. Винахід також включає фрагменти чи похідне такого антитіла, такі як одна чи кілька ділянок ланцюга антитіла, така як постійна, з'єднувальна, додаткова чи варіабельна ділянки важкого ланцюга, або постійна, з'єднувальна чи варіабельна ділянки легкого ланцюга.

Антитіло може включати щонайменше одну визначену частину щонайменше однієї гіперваріабельної ділянки (CDR) (наприклад, CDR1, CDR2 чи CDR3 важкого чи легкого ланцюга варіабельної ділянки), похідної від мишачого CLB-8 моноклонального антитіла, та/або щонайменше одну постійну чи варіабельну каркасну ділянку чи будь-яку її частину. Амінокислотна послідовність антитіла може далі необов'язково включати щонайменше одне визначене заміщення, інсерцію чи делецію, як описано тут чи відомо фахівцям.

Кращі антитіла за даним винаходом включають такі химерні гуманізовані та/або CDR-трансплантовані антитіла, які будуть конкурентно інгібувати *in vivo* зв'язування з ІЛ-6 людини анти-ІЛ-6 мишачого CLB-8, химерного анти-ІЛ-6 CLB-8 або антитіла, що має по суті такі самі характеристики зв'язування, а також їхніх фрагментів та ділянок.

Кращими антитілами за даним винаходом є такі, що зв'язують епітопи, розпізнавані CLB-8 та сCLB-8, які входять до складу епітопа Сайта I, як описано Brackenhoff et al. (supra). Кращі способи визначення специфічності та афінності моноклонального антитіла шляхом конкурентного інгібування наведені у книзі Harlow, et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988, яку включено до даної заявки за посиланням. Щонайменше одне антитіло за даним винаходом зв'язує щонайменше один визначений епітоп, специфічний до протеїну ІЛ-6 людини, його суб'одиниці, фрагмента, ділянки чи будь-якої їхньої комбінації, з яким зв'язується CLB-8 моноклональне антитіло. Епітоп може включати щонайменше одну антитілозв'язуючу ділянку, з якою зв'язується CLB-8 антитіло, причому зазначений епітоп краще складається з щонайменше 1-5 амінокислот у щонайменше одній з його ділянок, таких як, без обмеження, щонайменше один функціональний, позаклітинний, розчинний, гідрофільний, зовнішній чи цитоплазматичний домен протеїну ІЛ-6 людини, чи будь-якої його частини.

В одному аспекті, даний винахід пропонує щонайменше одне ізольоване анти-ІЛ-6 сCLB-8 антитіло ссавця, що включає щонайменше одну варіабельну ділянку, яка включає SEQ ID NO: 7 чи 8, та послідовності нуклеїнових кислот, що їх кодують (SEQ ID NO: 15 чи 16).

За іншим аспектом, даний винахід пропонує щонайменше одне ізольоване анти-ІЛ-6 сCLB-8 антитіло ссавця, що включає або (i) всі амінокислотні послідовності гіперваріабельних ділянок (CDR) важкого ланцюга SEQ ID NOS: 1, 2 та 3, та послідовності нуклеїнових кислот, що їх кодують (SEQ ID NOS: 9-11); або (ii) всі амінокислотні послідовності SEQ ID NOS: 4, 5 та 6 легкого ланцюга CDR та послідовності нуклеїнових кислот, що їх кодують (SEQ ID NOS: 12-14).

За іншим аспектом, даний винахід пропонує щонайменше одне ізольоване анти-ІЛ-6 сCLB-8 антитіло ссавця, яке включає щонайменше одну, CDR важкого ланцюга чи легкого ланцюга, що має щонайменше одну амінокислотну послідовність з SEQ ID NOS: 1, 2, 3, 4, 5 чи 6, та послідовності нуклеїнових кислот, що їх кодують (SEQ ID NOS: 9-14).

За іншим аспектом, даний винахід пропонує щонайменше одне ізольоване химерне, гуманізоване чи CDR-

трансплантоване анти-ІЛ-6 сСІВ-8 антитіло ссавця, яке включає щонайменше одну СДР людини, причому антитіло специфічно зв'язує щонайменше один епітоп, який включає щонайменше 1-3 амінокислоти з епітопа людського ІЛ-6, з яким зв'язується СІВ-8 антитіло.

Щонайменше одне антитіло може, необов'язково, додатково зв'язувати ІЛ-6 з афінністю (K_d) щонайменше 10^{-9} М, краще, щонайменше 10^{-10} М, та/або по суті нейтралізувати щонайменше одну активність щонайменше одного протеїну ІЛ-6. За кращим варіантом втілення, антитіло зв'язує ІЛ-6 з афінністю (K_d) щонайменше 1×10^{-11} М, краще, 5×10^{-11} , нейтралізуючи людський ІЛ-6.

Даний винахід пропонує, в одному аспекті, молекули ізолюваної нуклеїнової кислоти, які включають, є комплементарними чи гібридизуються з полінуклеотидом, що кодує вищезгадані специфічні анти-ІЛ-6 антитіла, який включає щонайменше одну їхню визначену послідовність, домен, ділянку чи варіант. Даний винахід далі пропонує рекомбінантні вектори, які включають зазначені молекули нуклеїнової кислоти анти-ІЛ-6 антитіла, клітини-хазяї, що включають такі нуклеїнові кислоти та/або рекомбінантні вектори, а також способи одержання та/або використання таких нуклеїнових кислот антитіла, векторів та/або клітин-хазяїв. Таким чином, винахід включає ізолювану нуклеїнову кислоту, яка кодує щонайменше одне ізолюване анти-ІЛ-6 сСІВ-8 антитіло ссавця; вектор ізолюваної нуклеїнової кислоти, який включає ізолювану нуклеїнову кислоту, та/або прокаріотичну чи еукаріотичну клітину-хазяїна, яка включає ізолювану нуклеїнову кислоту. Клітина-хазяїн може, необов'язково, бути щонайменше однією клітиною, вибраною з клітин COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Her G2, 653, SP2/O, 293, HeLa, мієломи чи лімфоми, чи будь-якою їхньою похідною, іморталізованою чи трансформованою клітиною. Також пропонується спосіб продукування щонайменше одного анти-ІЛ-6 сСІВ-8 антитіла, який включає трансляцію кодуючої антитіло нуклеїнової кислоти в умовах *in vitro*, *in vivo* чи *in situ*, при яких антитіло ІЛ-6 експресується у виявлюваній чи достатній для виділення кількості.

Даний винахід далі пропонує щонайменше одне анти-ідіотипічне антитіло ІЛ-6 до щонайменше одного сСІВ-8 анти-ІЛ-6 антитіла за даним винаходом. Анти-ідіотипічне антитіло включає будь-який протеїн чи пептид, який містить молекулу, що включає щонайменше ділянку молекули імуноглобуліну, таку як, без обмеження, щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (СДР) важкого чи легкого ланцюга чи її лігандзв'язуючу ділянку, варіабельну ділянку важкого ланцюга чи легкого ланцюга, постійну ділянку важкого ланцюга чи легкого ланцюга, каркасну ділянку чи будь-яку її частину, що може бути включена до анти-ідіотипічного антитіла до антитіла за даним винаходом. Анти-ідіотипічне антитіло за даним винаходом може включати чи бути одержаним від будь-якого ссавця, такого як, без обмеження, людина, миша, крізь, гризун, примат і т.п.

Даний винахід пропонує, в одному аспекті, молекули ізолюваної нуклеїнової кислоти, які включають, є комплементарними до, чи гібридизуються з, полінуклеотидом, кодуєчим щонайменше одне ІЛ-6 анти-ідіотипічне антитіло, яке включає щонайменше одну їхню визначену послідовність, домен, ділянку чи варіант. Даний винахід далі пропонує рекомбінантні вектори, які включають зазначені молекули, кодуєчі нуклеїнову кислоту ІЛ-6 анти-ідіотипічного антитіла, клітини-хазяї, що містять такі нуклеїнові кислоти та/або рекомбінантні вектори, а також способи одержання та/або використання таких нуклеїнових кислот анти-ідіотипічного антитіла, векторів та/або клітин-хазяїв.

Даний винахід також пропонує щонайменше один метод експресії щонайменше одного вищезгаданого анти-ІЛ-6 антитіла чи анти-ідіотипічного антитіла ІЛ-6 у клітині-хазяїні, який включає культивування описаної тут клітини-хазяїна в умовах, при яких експресується щонайменше одне анти-ІЛ-6 антитіло у виявлюваній та/або достатній для виділення кількості.

Також пропонується спосіб продукування щонайменше одного ізолюваного анти-ІЛ-6 антитіла за даним винаходом, який включає створення трансгенної тварини чи трансгенної рослини чи рослинної клітини, здатної до експресії антитіла у достатній для виділення кількості. Далі у даному винаході пропонується щонайменше одне анти-ІЛ-6 антитіло, продукowane у зазначений вище спосіб.

Даний винахід також пропонує щонайменше одну композицію, яка включає (а) нуклеїнову кислоту, кодуєчу ізолюване анти-ІЛ-6 сСІВ-8 антитіло та/або антитіло, як воно описане тут; і (b) придатний носій чи розріджувач. Носій чи розріджувач може, необов'язково, бути фармацевтично прийнятним, як відомі носії чи розріджувачі. Композиція може, необов'язково, далі включати щонайменше одну додаткову сполуку, протеїн чи композицію.

Даний винахід далі пропонує щонайменше один метод чи композицію анти-ІЛ-6 сСІВ-8 антитіла, призначені для введення терапевтично ефективної кількості для модулювання чи лікування щонайменше одного ІЛ-6-асоційованого стану у клітині, тканині, органі, тварині чи пацієнті та/або перед, після чи під час виникнення асоційованого стану, як відомо фахівцям та/або як описано тут. Таким чином, винахід пропонує спосіб діагностики чи лікування ІЛ-6-асоційованого стану у клітині, тканині, органі чи тварині, який включає введення у контакт з клітиною, тканиною, органом чи твариною, чи введення до них композиції, що включає ефективну кількість щонайменше одного ізолюваного анти-ІЛ-6 сСІВ-8 антитіла за даним винаходом. Спосіб може, необов'язково, далі включати використання ефективної кількості 0,001-50мг/кілограм клітин, тканини, органа чи тварини. Спосіб може, необов'язково, далі включати використання введення у контакт чи введення щонайменше одним шляхом, вибраним з парентерального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенового, інтраартикулярного, внутрішньобронхіального, внутрішньоочеревного, внутрішньосуглобного, внутрішньохрящового, внутрішньопорожнинного, внутрішньоочеревинного, внутрішньомозочкового, інтрацеребровентрикулярного, внутрішньотовстокишкового, інтрацервікального, внутрішньошлункового, внутрішньопечінкового, інтраміокардіального, внутрішньокишкового, внутрішньотазового, інтраперикардіального, інтраперитонеального, інтраплеврального, внутрішньопростатичного, внутрішньолегеневого, інтра ректального, внутрішньониркового, інтраретинального, інтраспінального, інтрасиновіального, інтраторакального, внутрішньоматкового, інтравезикулярного, болізного, вагінального, ректального, букального, сублінгвального, інтраназального чи трансдермального. Спосіб може, необов'язково, далі включати перед, одночасно чи після введення у контакт чи введення антитіла, введення щонайменше однієї композиції, яка включає ефективну кількість щонайменше однієї

сполуки чи протеїну, вибраних з щонайменше одного з виявлюваної мітки чи репортера, антагоніста фактора некрозу пухлин (ФНП), протиревматичного засобу, міорелаксantu, наркотичного засобу, нестероїдного протизапального лікарського засобу (NSAID), анальгезивного засобу, анестетика, седативного засобу, місцевого анестетика, нейром'язового блокатора, протимікробного засобу, антипсоріатичного засобу, кортикостероїду, анаболічного стероїду, еритропоєтину, засобу для імунізації, імуноглобуліну, імунодепресанта, гормону росту, гормонзамісного лікарського засобу, радіофармацевтичного засобу, антидепресанта, антипсихотичного засобу, стимулятора, протиастматичного засобу, бета-агоніста, стероїдного засобу для інгаляції, епінефрину чи їхнього аналога, цитотоксичного чи іншого протиракового агенту, антиметаболіту, такого як метотрексат, антипроліферативного агенту, цитокіну чи цитокінового антагоніста.

Даний винахід далі пропонує щонайменше один спосіб діагностики з використанням анти-ІЛ-6 cCLB-8 антитіла щонайменше одного ІЛ-6-асоційованого стану у клітині, тканині, органі, тварині чи пацієнті та/або перед, після чи під час виникнення асоційованого стану, як відомо фахівцям та/або описано тут.

Даний винахід також пропонує щонайменше одну композицію, пристрій та/або метод доставки для діагностики щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла у відповідності до даного винаходу.

Також пропонується композиція, яка включає щонайменше одне ізольоване химерне, людське чи гуманізоване анти-ІЛ-6 cCLB-8 антитіло та щонайменше один фармацевтично прийнятний носій чи розріджувач. Композиція може, необов'язково, додатково включати ефективну кількість щонайменше однієї сполуки чи протеїну, вибраних з щонайменше одного з виявлюваної мітки чи репортера, цитотоксичного чи іншого протиракового агента, антиметаболіту, такого як метотрексат, антипроліферативного агента, цитокіну чи цитокінового антагоніста, антагоніста ФНП, протиревматичного засобу, міорелаксantu, наркотичного засобу, нестероїдного протизапального лікарського засобу (NHE), анальгетика, анестетика, седативного засобу, місцевого анестетика, нейром'язового блокатора, протимікробного засобу, антипсоріатичного засобу, кортикостероїду, анаболічного стероїду, еритропоєтину, засобу, для проведення імунізації, імуноглобуліну, імунодепресанта, гормону росту, гормонзамісного лікарського засобу, радіофармацевтичного засобу, антидепресанта, антипсихотичного засобу, стимулятора, протиастматичного засобу, бета-агоніста, стероїдного засобу для інгаляції, епінефрину чи аналога.

Також пропонується медичний пристрій, який включає щонайменше одне ізольоване анти-ІЛ-6 антитіло ссавця за даним винаходом, причому пристрій є придатним для введення у контакт чи введення щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла щонайменше одним шляхом, вибраним з парентерального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенного, інтраартикулярного, внутрішньобронхіального, внутрішньочеревинного, внутрішньосуглобного, внутрішньоохрящового, внутрішньопорожнинного, внутрішньомозочкового, інтрацеребровентрикулярного, внутрішньотовстокишкового, інтрацервікального, внутрішньошлункового, внутрішньопечінкового, інтраміокардіального, внутрішньокісткового, внутрішньотазового, інтраперикардіального, інтраперитонеального, інтраплеврального, внутрішньопростатичного, внутрішньолегенового, інтра ректального, внутрішньониркового, інтра ретинального, інтраспінального, інтрасиновіального, інтраторакального, внутрішньоматкового, інтра везикулярного, болюсного, вагінального, ректального, букального, сублінгвального, інтраназального чи трансдермального.

Також пропонується промисловий виріб для фармацевтичного чи діагностичного використання у людини, який включає пакувальний матеріал та контейнер, що містить розчин чи ліофілізовану форму щонайменше одного ізольованого анти-ІЛ-6 антитіла ссавця за даним винаходом. Промисловий виріб може, необов'язково, включати контейнер як компонент пристрою чи системи для парентеральної, підшкірної, внутрішньом'язової, внутрішньовенної, інтраартикулярної, внутрішньобронхіальної, внутрішньочеревинної, внутрішньосуглобної, внутрішньоохрящової, внутрішньопорожнинної, внутрішньоочеревинної, внутрішньомозочної, інтрацеребровентрикулярної, внутрішньотовстокишкової, інтрацервікальної, внутрішньошлункової, внутрішньопечінкової, інтраміокардіальної, внутрішньокісткової, внутрішньотазової, інтраперикардіальної, інтраперитонеальної, інтраплевральної, внутрішньопростатичної, внутрішньолегенової, інтра ректальної, внутрішньониркової, інтра ретинальної, інтраспінальної, інтрасиновіальної, інтраторакальної, внутрішньоматкової, інтра везикулярної, болюсної, вагінальної, ректальної, букальної, сублінгвальної, інтраназальної чи трансдермальної доставки.

Даний винахід далі пропонує будь-який з описаних тут винаходів.

Опис креслень

Фігура 1: Графік, який показує зв'язування cCLB8 з людським рекомбінантним ІЛ-6.

Фігура 2: Графік, який показує інгібування за допомогою cCLB8 ІЛ-6-медійованої секреції IgM мю клітинами SKW6.4.

Фігура 3: Графік, який показує інгібування за допомогою cCLB8 ІЛ-6-медійованого продукування MCP-1.

Фігура 4: Зображення вестерн-блоту, який показує інгібування за допомогою cCLB8 передачі сигналів ІЛ-6 у клітинах моноцитарного лейкозу людини THP-1.

Фігура 5: Графік, на якому зображено інгібування за допомогою cCLB8 ІЛ-6-індукованого продукування амілоїду А сироватки клітинами НерG2.

Фігура 6: Графік, який показує здатність cCLB8 нейтралізувати rh-ІЛ-6-індуковану проліферацію клітин.

Фігура 7: Графік, на якому зображено відносно зменшення втрати ваги тіла хазяїна у мишей з пухлинами людини, які одержують лікування анти-людськими та анти-мишачими ІЛ-6 антитілами.

Фігура 8A-G: Графік, який показує результати досліджень профілей сироваткового інгібування 7 анти-ідіотипичних антитіл.

Фігура 9: Графік, який показує інгібування за допомогою анти-id Mabs зв'язування cCLB8 з ІЛ-6 людини.

Фігура 10: Графік, який показує анти-id зв'язування з cCLB-8, попередньо зв'язаним з ІЛ-6 людини.

Детальний опис даного винаходу

Цитовані джерела

Всі цитовані тут публікації чи патенти цілком включені сюди за посиланням, оскільки вони показують

сучасний рівень техніки за даним винаходом та/або містять опис та уможливають здійснення даного винаходу. Публікаціями є будь-які наукові чи патентні публікації, чи будь-яка інша доступна інформація у будь-якому медійному форматі, включаючи всі формати запису, електронного кодування чи друку. Вказані далі посилання цілком включені сюди за посиланням: Ausubel, et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Амінокислотні коди

Амінокислоти, з яких складаються анти-ІЛ-6 антитіла за даним винаходом, часто позначаються скорочено. Позначення амінокислот можуть бути наведені шляхом позначення амінокислоти її однобуквеним кодом, її трибуквеним кодом, назвою, чи тринуклеотидними кодон(ами), добре зрозумілими для фахівців (див. Alberts, B., et al., *Molecular Biology of The Cell*, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994).

Визначення

У тому значенні, що використовується тут "анти-інтерлейкін-6 cCLB-8 антитіло", "анти-ІЛ-6 cCLB-8 антитіло", "ділянка анти-ІЛ-6 cCLB-8 антитіла" чи "фрагмент анти-ІЛ-6 cCLB-8 антитіла" та/або "варіант анти-ІЛ-6 cCLB-8 антитіла" і т.п. включають будь-який протеїн чи пептид, який містить молекулу, що включає щонайменше одну гіперваріабельну ділянку (CDR) важкого чи легкого ланцюга чи їхню лігандзв'язуючу ділянку, похідної від мишачого CLB-8 моноклонального антитіла, у комбінації з варіабельною ділянкою важкого ланцюга чи легкого ланцюга, постійною ділянкою важкого ланцюга чи легкого ланцюга, каркасною ділянкою чи будь-якою їхньою частиною, що має не-мишаче походження, краще, людське походження, яка може бути включена до антитіла за даним винаходом. Таке антитіло є здатним модулювати, знижувати, антагонізувати, пом'якшувати, полегшувати, блокувати, інгібувати, припиняти та/або перешкоджати щонайменше одну активність чи зв'язування ІЛ-6, або активність чи зв'язування з рецептором ІЛ-6, *in vitro*, *in situ* та/або *in vivo*. Як необмежуючий приклад, придатне анти-ІЛ-6 антитіло, визначена ділянка чи варіант за даним винаходом можуть зв'язуватися з високою афінністю з інгібуючим та/або нейтралізуючим епітопом ІЛ-6 людини, розпізнаваним моноклональним антитілом CLB-8. Придатне анти-ІЛ-6 антитіло, визначена ділянка чи варіант можуть також, необов'язково, впливати на щонайменше одну активність чи функцію ІЛ-6, таку як, без обмеження, синтез РНК, ДНК чи протеїну, Вивільнення ІЛ-6, передача сигналів рецептором ІЛ-6, мембранне розщеплення ІЛ-6, активність ІЛ-6, продукування та/або синтез ІЛ-6.

Термін "антитіло" має далі охоплювати антитіла, їхні гідролізовані фрагменти, визначені ділянки та варіанти, включаючи міметики антитіла, або включаючи ділянки антитіла, що імітують структуру та/або функцію антитіла чи його визначеного фрагмента чи ділянки, включаючи одноланцюгові антитіла та їхні фрагменти; кожне з яких включає щонайменше одну CDR, похідну від моноклонального антитіла CLB-8. Функціональні фрагменти включають антигензв'язуючі фрагменти, що зв'язуються з ІЛ-6 ссавців. Наприклад, фрагменти антитіла, здатні зв'язуватися з ІЛ-6 чи його ділянками, включаючи, без обмеження, фрагменти Fab (наприклад, шляхом гідролізу папаїном), Fab' (наприклад, шляхом гідролізу пепсином та часткового відновлення) і F(ab')₂ (наприклад, шляхом гідролізу пепсином), fabc (наприклад, шляхом гідролізу плазміном), rFc' (наприклад, шляхом гідролізу пепсином чи плазміном), Fd (наприклад, шляхом гідролізу пепсином, часткового відновлення та агрегації), Fv чи scFv (наприклад, з використанням методів молекулярної біології), входять до обсягу винаходу (див., наприклад, Colligan, *Immunology*, *supra*).

Такі фрагменти можуть бути продукovanі шляхом ферментативного розщеплення, синтетичними чи рекомбінантними методами, як відомо фахівцям та/або описано тут, антитіла можуть бути також продукovanі у різноманітних зрізаних формах з використанням генів антитіла, до яких було введено один чи кілька стоп-кодонів перед природним стоп-сайтом. Наприклад, комбінований ген, який кодує F(ab')₂ ділянку важкого ланцюга, може бути сконструйований з включенням ДНК послідовностей, кодуєчих C_H₁-домен та/або шарнірну ділянку важкого ланцюга. Різні ділянки антитіла можуть бути химерно з'єднані разом звичайними методами, або можуть бути одержані у виді зчепленого протеїну з використанням методів генної інженерії.

В тому значенні, що використовується тут, "химерні" антитіла чи "гуманізовані" антитіла чи "CDR-трансплантовані" включають будь-яку комбінацію описаних тут мишачих CDR з одним чи кількома протеїнами чи пептидами, похідними від не-мишачого, краще, людського антитіла. Згідно з винаходом, передбачаються химерні чи гуманізовані антитіла, у яких CDR є похідними від мишачого CLB-8 антитіла, здатного зв'язувати людський ІЛ-6 чи, щонайменше, його ділянку, або решта антитіла є похідною від одного чи кількох людських антитіл. Таким чином, людська частина антитіла може включати каркасну ділянку, домени C_L, C_H (наприклад, C_H₁, C_H₂, C_H₃), шарнірну ділянку, ділянки (V_L, V_H), які у людей є по суті не-імуногенними. Ділянки антитіла, похідні від людських антитіл, не повинні обов'язково мати 100% ідентичність з людськими антитілами. За кращим варіантом втілення, залишається якомога більше людських амінокислотних залишків з метою забезпечення незначної імуногенності, але людські залишки можуть бути модифіковані у разі потреби для підтримки антигензв'язуючого сайту, утвореного CDR при одночасному забезпечення максимальної гуманізації антитіла. Такі зміни чи варіації, необов'язково і краще, зберігають чи знижують імуногенність у людей чи інших видів по відношенню до не-модифікованих антитіл. Ми відзначаємо, що гуманізоване антитіло може бути продукovanе твариною, яка не є людиною, або прокаріотичною чи еукаріотичною клітиною, здатною до експресії генів функціонально перебудованого імуноглобуліну людини (наприклад, важкого ланцюга та/або легкого ланцюга).

Крім того, якщо антитіло є одноланцюговим антитілом, воно може включати лінкерний пептид, який не зустрічається у нативних людських антитілах. Наприклад, Fv може включати лінкерний пептид, такий як від двох до приблизно восьми гліцинових чи інших амінокислотних залишків, який з'єднує варіабельну ділянку важкого ланцюга та the варіабельну ділянку легкого ланцюга. Вважається, що такі лінкерні пептиди мають людське походження.

Антитіла за даним винаходом

Згідно з даним винаходом, анти-ІЛ-6 сCLB-8 антитіло включає антитіло, у якому варіабельна ділянка чи CDRs є похідними, від мишачого CLB-8 антитіла, здатного зв'язувати та інгібувати функцію людського ІЛ-6, а каркасна та постійна ділянки антитіла є похідними від одного чи кількох людських антитіл. Варіабельна ділянка чи CDRs, похідні від мишачого CLB-8 антитіла, краще, мають ідентичність від близько 90% до близько 100% з варіабельною ділянкою чи CDRs мишачого CLB-8 антитіла, хоч передбачаються також будь-які та усі модифікації, включаючи заміщення, інсерції та делеції, за умови, що химерне антитіло зберігає здатність зв'язувати та інгібувати ІЛ-6. Ділянки химерних, гуманізованих чи CDR-трансплантованих антитіл, похідних від людських антитіл, не повинні мати обов'язково 100% ідентичність з людськими антитілами. За кращим варіантом втілення, зберігається якомога більше амінокислотних залишків людини з метою забезпечення незначної імуногенності, але людські залишки, зокрема, залишки каркасної ділянки, є заміщеними у залежності від потреби та як описано далі згідно з даним винаходом. Такі модифікації, розкриті тут, необхідні для підтримки антигензв'язуючий сайт, утворюваний CDRs, при одночасному забезпеченні максимальної гуманізації антитіла.

Мишаче моноклональне антитіло CLB-8 проти ІЛ-6 людини є відомим у сучасному рівні техніки (Brakenhoff et al., supra), але CDR-ділянки цього антитіла досі не були розкриті. Даний винахід уперше розкриває химерні, гуманізовані чи CDR-трансплантовані антитіла, похідні від CDR-ділянок CLB-8 мишачого моноклонального антитіла, та способи одержання таких антитіл. Згідно з даним винаходом, кДНК (SEQ ID NO: 15) та амінокислотні послідовності важкого ланцюга (SEQ ID NO: 7) для важкого ланцюга мишачого CLB-8 наведені у Прикладі 2. кДНК та розшифрована амінокислотна послідовність легкого ланцюга мишачого CLB-8 (SEQ ID NO: 8) також наведені у Прикладі 2 (SEQ ID NO: 16). Кожна з варіабельних ділянок важкого та легкого ланцюга містить три CDRs, які разом утворюють антигензв'язуючий сайт. Ці три CDRs оточені чотирма ділянками FR, головною функцією яких є підтримка CDRs. Послідовності CDRs усередині послідовностей варіабельних ділянок важкого та легкого ланцюгів можуть бути ідентифіковані шляхом комп'ютерного порівняльного аналізу первинної структури згідно з Kabat et al. (1987), у книзі Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th ed., United States Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C., чи шляхом молекулярного моделювання, варіабельних ділянок, наприклад, з використанням програми ENCAD, як описано Levitt (1983) J. Mol. Biol. 168:595.

За кращим варіантом втілення, CDRs є похідними від мишачого моноклонального антитіла CLB-8. Краще, важкий ланцюг CDRs має такі послідовності:

CDR1	SFAMS	(SEQ ID NO: 1),
CDR2	EISSGGSYTYYPDTVTG	(SEQ ID NO: 2),
CDR3	GLWGYALDY	(SEQ ID NO: 3).

Краще, легкий ланцюг CDRs має такі послідовності:

CDR1	SASSSVSYMY	(SEQ ID NO: 4),
CDR2	DTSNLAS	(SEQ ID NO: 5),
CDR3	QQWSGYPYT	(SEQ ID NO: 6).

Послідовності CDRs мишачого CLB-8 антитіла можуть бути модифіковані шляхом інсерції, заміщення та делеції у такому ступені, щоб CDR-трансплантоване антитіло зберігало здатність до зв'язування та інгібування ІЛ-6 людини. Пересічний фахівець в цій області може впевнитися у збереженні цієї активності шляхом проведення функціональних аналізів, описаних далі. CDRs можуть мати, наприклад, від близько 50% до близько 100% гомології з CDRs, що мають SEQ ID NOS: 1-6. За кращим варіантом втілення, CDRs мають від близько 80% до близько 100% гомології з CDRs, що мають SEQ ID NOS: 1-6. За ще кращим варіантом втілення, CDRs мають від близько 90% до близько 100% гомології з CDRs, що мають SEQ ID NOS: 1-6. За найкращим варіантом втілення, CDRs мають приблизно 100% гомології з CDRs, які мають SEQ ID NOS: 1-6.

За альтернативним варіантом, варіабельна ділянка важкого ланцюга та варіабельна ділянка легкого ланцюга мишачого CLB-8 антитіла, визначені у Прикладі 2 (SEQ.ID NOS. 7 та 8), можуть бути цілком поєднані з людськими постійною та каркасною ділянками з утворенням химерного сCLB-8 антитіла за даним винаходом.

Людські гени, що кодують постійні (C) ділянки химерного антитіла, фрагменти та ділянки за даним винаходом, можуть бути одержані з бібліотеки печінки плоду людини відомими методами. Людські гени ділянки C можуть бути одержані з будь-якої людської клітини, включаючи такі, що експресують та продукують імуноглобуліни людини. Ділянка C_H людини може бути одержана з будь-якого з відомих класів чи ізотипів H-ланцюгів людини, включаючи гамма, μ , α , δ , ϵ та їхні субтипи, такі як G1, G2, G3 та G4. Оскільки ізотип H-ланцюга відповідає за різні ефекторні функції антитіла, вибір ділянки C_H буде визначатися бажаними ефекторними функціями, такими як фіксація комплекта чи активність у антитіло-залежній клітинній цитотоксичності (ADCC). Краще, джерелом ділянки C_H є гамма 1 (IgG1).

Джерелом ділянки C_L людини може бути будь-який з каппа чи лямбда ізотипів L-ланцюга людини, краще, каппа.

Гени, що кодують ділянки імуноглобуліну C людини, одержують з людських клітин з використанням стандарт методів клонування (Sambrook, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), та Ausubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology (1987-1993)). Гени ділянки C людини можуть бути легко одержані з відомих клонів, які містять гени, що представляють два класи L-ланцюгів, п'ять класів H-ланцюгів та їхні підкласи. Фрагменти химерного антитіла, такі як F(ab¹)₂ та Fab, можуть бути одержані шляхом конструювання відповідно зрізаного гена химерного H-ланцюга. Наприклад, химерний ген, кодуючий ділянку H-ланцюга фрагмента F(ab¹)₂, буде включати ДНК-послідовності, які кодують домен CH1 та шарнірну ділянку H-ланцюга, за якими йде трансляційний стоп-кодон

для одержання зрізаної молекули.

Загалом, в одному прикладі, химерні антитіла, фрагменти та ділянки за даним винаходом продукують шляхом клонування сегментів ДНК, кодуєчих антигензв'язуючі ділянки H- та L-ланцюгів CLB-8 анти-ІЛ-6-специфічного антитіла, та з'єднання цих сегментів ДНК з сегментами ДНК, кодуєчими C_H - та C_L-ділянки, відповідно, з утворенням химерних імуноглобулін-кодуєчих генів.

Таким чином, за кращим варіантом втілення, створюють злитий химерний ген, який включає перший сегмент ДНК, який кодує принаймні антигензв'язуючу ділянку нелюдського походження, таку як функціонально перебудовану V-ділянку із з'єднувальним (J) сегментом, зчеплений з другим сегментом ДНК, кодуєчим щонайменше частину ділянки C людини.

Послідовності варіабельних ділянок мишачого CLB-8 антитіла можуть бути модифіковані шляхом інсерції, заміщення та делеції у такому ступені, щоб химерне антитіло зберігало здатність до зв'язування та інгібування людського ІЛ-6. Пересічний фахівець в цій області може впевнитися у збереженні цієї активності шляхом проведення описаних далі функціональних аналізів. Варіабельні ділянки можуть мати, наприклад, від близько 50% до близько 100% гомології з варіабельними ділянками, що відповідають SEQ ID NOS: 7-8. За кращим варіантом втілення, варіабельні ділянки мають від близько 80% до близько 100% гомології з варіабельними ділянками, що відповідають SEQ ID NOS: 7-8. За ще кращим варіантом втілення, варіабельні ділянки мають від близько 90% до близько 100% гомології з варіабельними ділянками, які відповідають SEQ ID NOS: 7-8. За найкращим варіантом втілення, варіабельні ділянки іпють приблизно 100% гомології з CDRs, які відповідають SEQ ID NOS: 1-6.

Для зручності, в даному описі використовується схема нумерації, запропонована Kabat et al. Залишки позначаються підрядковими числами чи тире у разі потреби для забезпечення відповідності послідовностей за даним винаходом стандартній нумерації послідовностей за Kabat.

Згідно з даним винаходом, у випадку CDR-трансплантованого чи гуманізованого антитіла, у якому ділянка CDR CLB-8 антитіла з'єднана з ділянкою людини, у ділянці FR можуть залишитися залишки, ідіосинкратичні до батьківського антитіла, наприклад, CLB-8. Можуть бути збережені також залишки, що були визначені як критичні для гуманізації інших антитіл. Зазначених вище принципів дотримуються у ступені, необхідному для 'підтримання антигензв'язуючого сайту, утворюваного CDRs, при одночасному забезпеченні максимальної гуманізації антитіла.

Амінокислотна послідовність типової варіабельної ділянки важкого ланцюга, одержаного з мишачого моноклонального антитіла CLB-8 та людського антитіла, наведена у Прикладі 2 нижче.

Амінокислотна послідовність типової химерної варіабельної ділянки легкого ланцюга, одержаного з мишачого моноклонального антитіла CLB-8 та людського антитіла, також наведена у Прикладі 2.

Було продемонстровано, що химерне антитіло за даним винаходом, яке містить варіабельні ділянки з мишачого CLB-8 антитіла, не поступається за ефективністю мишачому моноклональному антитілу CLB-8 за показниками зв'язування з ІЛ-6.

Можуть бути використані методи рекомбінації чи гуманізації нелюдських чи людських антитіл, добре відомі фахівцям. Загалом, гуманізоване чи рекомбіноване антитіло має один чи кілька амінокислотних залишків з джерела, яке є нелюдським, наприклад, без обмеження, миші, щура, кроля, нелюдиноподібного примата чи іншого ссавця. Ці людські амінокислотні залишки часто називаються "імпортованими" залишками, типово узятими з "імпортного" варіабельного, постійного чи іншого домену відомої послідовності людини. Відомі послідовності

Ig людини розкриті, наприклад, у

www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi;

www.atcc.org/phage/hdb.html;

www.sciquest.com/;

www.abcam.com/;

www.antibodyresource.com/onlinecomp.html;

www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html;

www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html;

www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm;
www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html;
www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html;
www.antibodyresource.com/;
mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html;
www.immunologylink.com/;
pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html;
www.biotech.ufl.edu/~hcl/;
www.pebio.com/pa/340913/340913.html;
www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/;
www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html;
www.biodesign.com/table.asp;
www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html;
www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html;
www.isac-net.org/sites_geo.html;
aximt1.imt.uni-marburg.de/~rek/AEPStart.html;
baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html;
www.recab.uni-hd.de/imyno.bme.nwu.edu/;
www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/pubHc/INTRO.html;
www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html;
imgt.cnusc.fr:8104/;
www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html;
antibody.bath.ac.uk/;
abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html;
www.unizh.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html;
www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/;
www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm;
www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHNP.html;
www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html;
www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html;
www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spotttech.html;
www.jerini.de/fr_products.htm;
www.patents.ibm.com/ibm.html

Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983),

які всі цілком включені сюди за посиланням.

Такі імпортовані послідовності можуть бути використані для зменшення імуногенності чи для зниження, посилення чи модифікації зв'язування, афінності, показників on-rate, off-rate, авідності, специфічності, періоду півжиття, чи будь-якої іншої придатної характеристики, як відомо фахівцям. Загалом, зберігають частину чи всі нелюдські чи людські послідовності CDR, а нелюдські послідовності варіабельних та постійних ділянок заміщають на людські чи інші амінокислоти. Антитіла можуть також бути необов'язково гуманізовані при збереженні високої афінності по відношенню до антигена та інших сприятливих біологічних властивостей. Для досягнення цієї мети, гуманізовані антитіла можуть бути необов'язково одержані у спосіб, який включає аналіз батьківських послідовностей та різних концептуальних гуманізованих продуктів з використанням тривимірних моделей батьківських та гуманізованих послідовностей. Тривимірні моделі імуноглобуліну є загальнодоступними та відомими фахівцям в цій області. Існують комп'ютерні програми, які ілюструють та відображають можливі тривимірні конформаційні структури вибраних послідовностей-кандидатів імуноглобуліну. Розгляд цих зображень дозволяє здійснити аналіз ймовірної ролі залишків у функціонуванні імуноглобулінових послідовностей-кандидатів, тобто, аналіз залишків, що впливають на здатність імуноглобуліну-кандидата до зв'язування його антигена. У такий спосіб, можуть бути вибрані та поєднані залишки FR з консенсусної та імпортованої послідовностей для забезпечення бажаної характеристики антитіла, такої як підвищена афінність до цільового антигена (антигенів). Загалом, залишки CDR безпосередньо та дуже істотно впливають на зв'язування антигену. Гуманізація чи рекомбінація антитіла за даним винаходом може бути здійснена з використанням будь-якого відомого метода, такого як, без обмеження, методи, описані у: Winter (Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), патенти США №№ 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5766886, 5714352, 6204023, 6180370,

5693762, 5530101, 558,5089, 522.5539; 4816567, PCT: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246, які всі включені сюди за посиланням, включаючи цитовані у них посилання.

Людська постійна ділянка химерного антитіла за даним винаходом може належати до будь-якого класу (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD і т.д.) чи ізотипу і може включати каппа- чи лямбда-легкий ланцюг. В одному варіанті втілення, людська постійна ділянка включає важкий ланцюг IgG чи визначений фрагмент, наприклад, щонайменше один з ізотипів, IgG1, IgG2, IgG3 чи IgG4. В іншому варіанті втілення, анти-людське антитіло ІЛ-6 людини включає важкий ланцюг IgG1 та К-легкий ланцюг IgG1. Ізольовані анти-ІЛ-6 антитіла за даним винаходом включають розкриті тут амінокислотні послідовності антитіла, кодовані будь-яким придатним поліпептидом. Краще, антитіло чи антигензв'язуючий фрагмент зв'язує людський ІЛ-6 і тим самим частково чи суттєво нейтралізує щонайменше одну біологічну активність протеїну. Антитіло сCLB-8 або його визначена ділянка чи варіант, частково чи, краще, істотно нейтралізує щонайменше одну біологічну активність щонайменше одного ІЛ-6 протеїну чи фрагмента і, тим самим, інгібує активності, медіювані шляхом зв'язування ІЛ-6 з рецептором ІЛ-6 чи за допомогою інших ІЛ-6-залежних чи медіюваних механізмів. У тому значенні, що використовується тут, термін "нейтралізуюче антитіло" стосується антитіла, яке може інгібувати ІЛ-6-залежну активність приблизно на 20-120%, краще, щонайменше на приблизно 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100% чи більше, у залежності від аналітичного методу. Здатність анти-ІЛ-6 антитіла інгібувати ІЛ-6-залежну активність, краще, оцінюють щонайменше одним придатним методом з використанням протеїну чи рецептора ІЛ-6, як описано тут та/або як відомо фахівцям.

Щонайменше одне антитіло за даним винаходом зв'язує щонайменше один визначений епітоп, специфічний по відношенню до щонайменше одного протеїну ІЛ-6, його суб'єдиниці, фрагмента, частини чи будь-якої їхньої комбінації, з якими зв'язується антитіло CLB-8. Щонайменше один епітоп може включати щонайменше одну антитіло-зв'язуючу ділянку, яка включає щонайменше одну частину протеїну, причому епітоп, краще, включає щонайменше одну позаклітинну, розчинну, гідрофільну, зовнішню чи цитоплазматичну ділянку протеїну. Загалом, людське антитіло чи антигензв'язуючий фрагмент за даним винаходом буде включати антигензв'язуючу ділянку, яка включає включає щонайменше одну людську гіперваріабельну ділянку (CDR1, CDR2 та CDR3) з SEQ ID NOS. 1, 2 та 3 або варіант щонайменше однієї варіабельної ділянки важкого ланцюга та щонайменше однієї людської гіперваріабельної ділянки (CDR4, CDR5 та CDR6) (SEQ ID NO. 4, 5 та 6) чи варіант щонайменше однієї варіабельної ділянки легкого ланцюга. Як необмежуючий приклад, антитіло чи антигензв'язуюча частина чи варіант може включати щонайменше одну CDR3 важкого ланцюга, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:3, та/або легкий ланцюг CDR3, що має амінокислотну послідовність SEQ ID NO:6. У конкретному варіанті втілення, антитіло чи антигензв'язуючий фрагмент можуть мати антигензв'язуючу ділянку, яка включає щонайменше частину щонайменше одного важкого ланцюга CDR (тобто, CDR1, CDR2 та/або CDR3), що має амінокислотну послідовність відповідних CDRs 1, 2 та/або 3 (наприклад, SEQ ID NOS:1, 2 та/або 3). За іншим конкретним варіантом втілення, антитіло чи антигензв'язуюча частина чи варіант може мати антигензв'язуючу ділянку, яка включає щонайменше частину щонайменше одного легкого ланцюга CDR (тобто, CDR4, CDR5 та/або CDR6), що має амінокислотну послідовність відповідних CDRs 4, 5 та/або 6 (наприклад, SEQ ID NOS: 4, 5, та/або 6). За кращим варіантом втілення, ці три важкі ланцюга CDRs та ці три легкі ланцюга CDRs антитіла чи антигензв'язуючого фрагмента мають амінокислотну послідовність відповідної CDR щонайменше одного з mAb сCLB8, химерного анти-ІЛ-6 Mab, як описано тут. Такі антитіла можуть бути одержані шляхом хімічного з'єднання різних частин (наприклад, CDRs, каркаса) антитіла з використанням звичайних методів, шляхом одержання та експресії (наприклад, однієї чи кількох) молекули нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло, з використанням звичайних методів технології рекомбінантних ДНК чи шляхом використання будь-якого іншого придатного методу та використання будь-якого з можливих надлишкових кодонів, які приводять до експресії поліпептиду за даним винаходом, наприклад, SEQ ID NO: 15 чи 16.

Антитіла, що зв'язуються з людським ІЛ-6 та включають визначені варіабельну ділянку важкого чи легкого ланцюга чи CDR-ділянки, можуть бути одержані з використанням придатних методів, таких як виявлення фага (Katsube, Y, et al, Int. J. Mol. Med., 1(5):863-868 (1998)) чи методи з використанням трансгенних тварин, відомі фахівцям та/або описані тут. Наприклад, антитіло, визначена ділянка чи варіант можуть бути експресовані з використанням кодуючої нуклеїнової кислоти чи її частини у придатній клітині-хазяїні.

Як було вказано, винахід також стосується антитіл, антигензв'язуючих фрагментів, імуноглобулінових ланцюгів та CDRs, що включають амінокислоти у послідовності, яка по суті співпадає з амінокислотною послідовністю, описаною тут. Такі анти-ІЛ-6 антитіла можуть включати одне чи кілька амінокислотних заміщень, делецій чи вставок, внаслідок природних мутацій чи штучних маніпуляцій, як описано тут. Краще, такі антитіла чи антигензв'язуючі фрагменти та антитіла, що містять такі ланцюги чи CDRs, можуть зв'язувати людський ІЛ-6 з високою афінністю (наприклад, K_d не перевищує приблизно 10^{-9} M). Амінокислотні послідовності, які по суті співпадають з послідовностями, описаними тут, включають послідовності, які мають консервативні заміщення амінокислот, а також амінокислотні делеції та/або інсерції. Консервативні заміщення амінокислот стосуються заміщення першої амінокислоти на другу амінокислоту, що має хімічні та/або фізичні властивості (наприклад, заряд, структура, полярність, гідрофобність/гідрофільність), подібні до характеристик першої амінокислоти. Консервативні заміщення включають заміщення однієї амінокислоти на іншу у межах таких груп: лізин (K), аргінін (R) та гістидин (H); аспартат (D) та глутамат (E); аспарагін (N), глутамін (Q), серин (S), треонін (T), тирозин (Y), K, R, H, D та E; аланін (A), валін (V), лейцин (L), ізолейцин (I), пролін (P), фенілаланін (F), триптофан (W), метіонін (M), цистеїн (C) та гліцин (G); F, W та Y; C, S та T.

Звичайно, кількість амінокислотних заміщень кваліфікований фахівець -робитиме у залежності від багатьох факторів, включаючи описані вище. Загалом кажучи, кількість амінокислотних заміщень, інсерцій чи делецій для будь-якого даного анти-ІЛ-6 антитіла, фрагмента чи варіанта не буде перевищувати 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, наприклад, 1-30, чи будь-якого інтервала значень чи значення у цих межах, як визначено тут.

Амінокислоти у анти-ІЛ-6 антитілі за даним винаходом, необхідні для функціонування, можуть бути ідентифіковані методами, відомими фахівцям, такими як сайт-спрямований мутагенез чи аланін-сканувальний мутагенез (наприклад, Ausubel, *supra*, Глави 8, 15; Cunningham and Wells, Science 244:1081-1085 (1989)). Остання процедура полягає у проведенні одиничних аланінових мутацій у кожному залишку молекули. Одержані мутантні молекули потім аналізують на біологічну активність, таку як, без обмеження, щонайменше одну ІЛ-6-нейтралізуючу активність. Сайти, критичні для зв'язування антитіла, можуть бути також ідентифіковані шляхом структурного аналізу, такого як кристалізація, ядерний магнітний резонанс чи фотоафінне мічення (Smith, et al., J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992), та de Vos, et al., Science 255:306-312 (1992)).

Анти-ІЛ-6 антитіла за даним винаходом можуть включати, без обмежень, щонайменше одну ділянку, послідовність чи комбінації вибрану з від 5 до усіх замісних амінокислот у щонайменше одній з SEQ ID NOS:1, 2, 3, 4, 5, 6.

Анти-ІЛ-6 антитіло може далі необов'язково включати поліпептид щонайменше однієї з 70-100% замісних амінокислот у щонайменше одній з SEQ ID NOS:7, 8.

В одному варіанті втілення, амінокислотна послідовність імуноглобулінового ланцюга чи його частини (наприклад, варіабельна ділянка, CDR) має приблизно 70-100% ідентичність (наприклад, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 чи будь-який інтервал значень чи значення у цих межах) з амінокислотою послідовністю відповідного ланцюга щонайменше однієї з SEQ ID NOS:7, 8. Наприклад, амінокислотна послідовність варіабельної ділянки легкого ланцюга може бути порівняна з послідовністю SEQ. ID NO:8, або амінокислотна послідовність важкого ланцюга CDR3 може бути порівняна з SEQ ID NO:7. Краще, визначають 70-100% амінокислоту ідентичність (наприклад, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 чи будь-який інтервал значень чи значення у цих межах) за допомогою придатного комп'ютерного алгоритму, як відомо фахівцям.

Типові послідовності варіабельної ділянки важкого ланцюга та легкого ланцюга приведені у SEQ ID NOS: 7, 8. Антитіла за даним винаходом, чи їхні визначені варіанти, можуть включати будь-яку кількість замісних амінокислотних залишків з антитіла за даним винаходом, причому кількість вибирають з групи цілих чисел, яка складає 10-100% від кількості замісних залишків у анти-ІЛ-6 антитілі. Необов'язково, ця субпослідовність замісних амінокислот складає щонайменше приблизно 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 чи більше амінокислот у довжину, або будь-який інтервал значень чи значення у цих межах. Крім того, кількість таких субпослідовностей може бути будь-яким цілим числом, вибраним з групи від 1 до 20, таким як, щонайменше, 2, 3, 4 чи 5.

Як зрозуміло фахівцям, даний винахід включає щонайменше одне біологічно активне антитіло за даним винаходом. Біологічно активні антитіла мають специфічну активність щонайменше 20%, 30% чи 40%, краще, щонайменше 50%, 60% чи 70%, і найкраще, щонайменше 80%, 90% чи 95%-1000% від показника для нативного (несинтетичного), ендогенного або спорідненого та відомого антитіла. Методи аналізу та кількісного визначення ферментативної активності та субстратної специфічності добре відомі фахівцям в цій області.

За іншим аспектом, винахід стосується людських антитіл та антигензв'язуючих фрагментів, які описані тут, модифікованих шляхом ковалентного приєднання органічного фрагмента. Така модифікація може створити антитіло чи антигензв'язуючий фрагмент з поліпшеними фармакокінетичними властивостями (наприклад, збільшений період півжиття у сироватці *in vivo*). Органічний фрагмент може бути лінійною чи розгалуженою гідрофільною полімерною групою, групою жирної кислоти чи групою складного ефіру жирної кислоти. У конкретних варіантах втілення, гідрофільна полімерна група може мати молекулярну вагу від близько 800 до близько 120000 дальтон і може бути поліалкангліколем (наприклад, поліетиленгліколем (ПЕГ), поліпропіленгліколем (ППГ)), вуглеводним полімером, амінокислотним полімером чи полівінілпіролідом, а група жирної кислоти чи складного ефіру жирної кислоти може включати від приблизно восьми до приблизно сорока атомів карбону.

Модифіковані антитіла та антигензв'язуючі фрагменти за даним винаходом можуть включати один чи кілька органічних фрагментів, ковалентно зв'язаних, безпосередньо чи опосередковано, з антитілом. Кожний органічний фрагмент, зв'язаний з антитілом чи антигензв'язуючим фрагментом за винаходом, може незалежно бути гідрофільною полімерною групою, групою жирної кислоти чи групою складного ефіру жирної кислоти. У тому значенні, що використовується тут, термін "жирна кислота" охоплює монокарбонові кислоти та дикарбонові кислоти. "Гідрофільна полімерна група", в тому значенні терміна, що використовується тут, стосується органічного полімеру, який має більшу розчинність у воді, ніж у октані. Наприклад, полілізін є більш розчинним у воді, ніж у октані. Отже, антитіло, модифіковане шляхом ковалентного приєднання полілізіну, входить до складу винаходу. Гідрофільні полімери, придатні для модифікації антитіла за даним винаходом, можуть бути лінійними чи розгалуженими і включають, наприклад, поліалкангліколи (наприклад, ПЕГ, монометоксиполіетиленгліколь (мПЕГ), ППГ і т.п.), вуглеводи (наприклад, декстран, целюлоза, олігосахариди, полісахариди і т.п.), полімери гідрофільних амінокислот (наприклад, полілізін, поліаргінін, поліаспартат і т.п.), поліалканоксиди (наприклад, поліетиленоксид, поліпропіленоксид і т.п.) та полівінілпіролідон. Краще, гідрофільний полімер, що модифікує антитіло за даним винаходом, має молекулярну вагу від близько 800 до близько 150000 дальтон, як окремий молекулярний фрагмент. Наприклад, можуть бути використані ПЕГ₅₀₀₀ та ПЕГ₂₀₀₀₀, де підрядковий індекс позначає середню молекулярну вагу полімера у дальтонах. Гідрофільна полімерна група може бути заміщеною від однієї до приблизно шести алкілних груп, груп жирної кислоти чи складного ефіру жирної кислоти. Гідрофільні полімери, заміщені групою жирної кислоти чи складного ефіру жирної кислоти, можуть бути одержані з використанням придатних методів. Наприклад, полімер, який включає аміногрупу, може бути з'єднаний з карбоксилатом жирної кислоти чи складного ефіру жирної кислоти, і активований карбоксилат (наприклад, активований N,N-карбонілдіімідазолом) на жирній кислоті чи складному ефірі жирної кислоти може бути з'єднаний з гідроксильною групою полімеру.

Жирні кислоти та складні ефіри жирної кислоти, придатні для модифікації антитіла за даним винаходом, можуть бути насиченими або можуть містити одну чи кілька ненасичених ланок. Жирні кислоти, придатні для модифікації антитіла за даним винаходом, включають, наприклад, n-додеканоат (C₁₂, лаурат), n-

тетрадеканоат (C_{14} , міристат), н-октадеканоат (C_{18} , стеарат), н-ейкозаноат (C_{20} , арахідат), н-докозаноат (C_{22} , бегенат), н-триаконтаноат (C_{30}), н-тетрактаноат (C_{40}), цис- Δ^9 -октадеканоат (C_{18} , олеат), цілком цис- $\Delta^{5,8,11,14}$ -ейкозатетраеноат (C_{20} , арахідонат), октандикислота, тетрадекандикислота, октадекандикислота, докозандикислота і т.п. Придатні складні ефіри жирної кислоти включають монозаміщені складні ефіри дикарбонових кислот, які включають лінійну чи розгалужену нижчу алкільну групу. Нижча алкільна група може включати від одного до приблизно дванадцяти, краще, від одного до приблизно шести, атомів карбону.

Модифіковані людські антитіла та антигензв'язуючі фрагменти можуть бути одержані з використанням придатних методів, таких як шляхом проведення реакції з одним чи кількома модифікуючими агентами. "Модифікуючий агент", як термін, що використовується тут, стосується придатної органічної групи (наприклад, гідрофільного полімеру, жирної кислоти, складного ефіру жирної кислоти), яка включає активувальну групу. "Активувальна група" є хімічним фрагментом чи функціональною групою, яка може, за відповідних умов, реагувати з другою хімічною групою, з утворенням при цьому ковалентного зв'язку між модифікуючим агентом та другою хімічною групою. Наприклад, реакційноздатні по відношенню до аміну активувальні групи включають електрофільні групи, такі як тозилат, мезилат, галоїд (хлор, бром, флюор, йод), N-гідроксисукцинімідильні складні ефіри (NHS) і т.п. Активувальні групи, які можуть реагувати з тіолами, включають, наприклад, малеїмід, йодацетил, акрилоліль, піридилдисульфід, тіол 5-тіол-2-нітробензойної кислоти (TNB-тіол) і т.п. Альдегідна функціональна група може бути приєднана до амін- чи гідрозидвмісної молекули, а азидна група може реагувати з групою тривалентного фосфору з утворенням фосфарамідатних чи фосфорамідних зв'язків. Придатні методи введення активувальних груп до молекул є відомими фахівцям (див., наприклад, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)). Активувальна група може бути зв'язана з органічною групою (наприклад, гідрофільним полімером, жирною кислотою, складним ефіром жирної кислоти) безпосередньо, або через лінкерний фрагмент, наприклад, двовалентну C_1 - C_{12} -групу, у якій один чи кілька атомів карбону можуть бути заміщені на гетероатом, такий як кисень, нітроген чи сульфур. Придатні лінкерні фрагменти включають, наприклад, тетраетиленгліколь, $-(CH_2)_3-$, $-NH(CH_2)_6-NH-$, $-(CH_2)_2-NH-$ та $-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-NH-$. Модифікуючі агенти, що включають лінкерний фрагмент, можуть бути одержані, наприклад, шляхом проведення реакції моно-Вос-алкілдіаміну (наприклад, моно-Вос-етилендіаміну, моно-Вос-діаміногексану) з жирною кислотою у присутності 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду (EDC) з утворенням амідного зв'язку між вільним аміном та карбоксилатом жирної кислоти. Захисна Вос-група може бути видалена з продукту шляхом обробки трифлюороцтовою кислотою (TFA) для вивільнення первинного аміну, який може бути з'єднаний з іншим карбоксилатом, як описано, або може бути введений до реакції з малеїновим ангідридом, а одержаний продукт - циклізований з утворенням активованого малеїмідного похідного жирної кислоти (див., наприклад, Thompson, et al., WO 92/16221, яка цілком включена сюди за посиланням).

Модифіковані антитіла за даним винаходом можуть бути одержані шляхом проведення реакції людського антитіла чи антигензв'язуючого фрагмента з модифікуючим агентом. Наприклад, органічні фрагменти можуть бути приєднані до антитіла у не-сайтспецифічний спосіб шляхом використання Модифікуючого агента, реакційноздатного по відношенню до аміну, наприклад, складного ефіру NHS та ПЕГ. Модифіковані людські антитіла чи антигензв'язуючі фрагменти можуть бути також одержані шляхом відновлення дисульфідних зв'язків (наприклад, внутрішньоланцюгових дисульфідних зв'язків) антитіла чи антигензв'язуючого фрагмента. Відновлене антитіло чи антигензв'язуючий фрагмент можуть потім бути введені до реакції з реакційноздатним по відношенню до тіолу модифікуючим агентом з утворенням модифікованого антитіла за даним винаходом. Модифіковані людські антитіла та антигензв'язуючі фрагменти, які включають органічний фрагмент, зв'язаний із специфічними сайтами антитіла за даним винаходом, можуть бути одержані з використанням придатних методів, таких як зворотний протеоліз (Fisch et al., *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153 (1992); Werlen et al., *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994); Kumaran et al., *Protein Sci.*, 6(10):2233-2241 (1997); Itoh et al., *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996); Capellas et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463 (1997)), та методи, описані у Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996).

Антитіла за даним винаходом можуть зв'язувати ІЛ-6 людини у широкому діапазоні афінності (K_d). За кращим варіантом втілення, щонайменше одне людське mAb за даним винаходом може, необов'язково, зв'язувати ІЛ-6 людини з високою афінністю. Наприклад, mAb може зв'язувати ІЛ-6 людини з K_d , що дорівнює чи є меншим, ніж приблизно 10^{-7} М, таким як, без обмеження, 0,1-9,9 (або будь-який інтервал значень чи значення у цих межах) $\times 10^{-7}$, 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , або будь-який інтервал значень чи значення у цих межах.

Афінність чи avidність антитіла по відношенню до антигену може бути визначена експериментально з використанням будь-якого придатного методу (див., наприклад, Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions", у: *Fundamental Immunology*, Paul, W.E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kubly, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); та описані тут методи). Виміряна афінність конкретної взаємодії антитіло-антиген може змінюватися при проведенні вимірів у різних умовах (наприклад, концентрація солі, рН). Таким чином, виміри афінності та інших параметрів зв'язування антигену (наприклад, K_D , K_A , K_d краще, здійснюють зі стандартизованими розчинами антитіла та антигену, та стандартизованим буфером, таким як описані тут буфери.

Анти-ІЛ-6 cCLB-6 антитіла придатні для використання у методах та композиціях за даним винаходом, характеризуються високоафінним зв'язуванням з ІЛ-6 і, необов'язково та краще, низькою токсичністю. Зокрема, антитіло, визначений фрагмент чи варіант за даним винаходом, де окремі компоненти, такі як варіабельна ділянка, постійна ділянка та каркас, індивідуально та/або колективно, необов'язково та краще, мають низьку імуногенність, є корисними за даним винаходом. Антитіла, що можуть бути використані у винаході, необов'язково характеризуються їхньою придатністю для лікування пацієнтів протягом тривалого періоду часу із вимірюваним полегшенням симптомів і низькою та/або прийнятною токсичністю. Низька чи прийнятна імуногенність та/або висока афінність, а також інші придатні властивості, можуть сприяти одержанню досяжних терапевтичних результатів. "Низька імуногенність" визначається тут як виникнення

суттєвих НАНА, НАСА чи НАМА відповідей у менш ніж приблизно 75%, або, краще, менш ніж приблизно 50%, пацієнтів, що лікуються, та/або виявлення низьких титрів у пацієнтів, що лікуються (менш ніж приблизно 300, краще, менш ніж приблизно 100, при вимірюванні методом імуноферментного аналізу з двома антигенами) (Elliott et al., Lancet 344:1125-1127 (1994), цілком включена сюди за посиланням).

Якщо порівнювати cCLB8 з іншими ІЛ-6-специфічними антитілами CLB.IL-6/14 та CLB.IL-6/16, то можна побачити відмінності між антитілами за характеристиками афінності та специфічності по відношенню до епітопів. cCLB8, яке є антитілом, що зв'язує ІЛ-6 і нормально блокує взаємодію між ІЛ-6 та його рецептором, може інгібувати майже 100% функції ІЛ-6, як показують результати біопроби з ІЛ-6-залежною проліферацією клітин 7TD1 та аналізу на основі Luminesx зі зв'язування ІЛ-6 з рецептором ІЛ-6. На відміну від нього, CLB.IL-6/16, яке є антитілом, що зв'язує ІЛ-6, але нейтралізує за рахунок стеричного ускладнення взаємодії між комплексом ІЛ-6/ІЛ-6R та сигнальним компонентом gp130, може інгібувати лише 62% зв'язаного біотин-ІЛ-6. Зрештою, антитіло, що зв'язує ІЛ-6, але не впливає на його біологічну активність, таке як CLB.IL-6/14, не виявляє інгібування зв'язування біотин-ІЛ-6 твердою фазою sIL-6R/gp80.

Можуть бути використані також біспецифічні, гетероспецифічні, гетерокон'юговані чи подібні антитіла, які є моноклональними гуманізованими антитілами, що виявляють специфічне зв'язування щонайменше з двома різними антигенами. В даному випадку, одна зі зв'язувальних специфічностей стосується щонайменше одного протеїну ІЛ-6, а друга - будь-якого іншого антигену. Методи одержання біспецифічних антитіл відомі фахівцям. Традиційно, рекомбінантне продукування біспецифічних антитіл ґрунтується на співекспресії двох пар важких ланцюг-легкий ланцюг імуноглобуліну, де два важких ланцюги мають різні специфічності (Mistein and Cuello, Nature 305:537 (1983)). Внаслідок випадкового характеру набору важких та легких ланцюгів імуноглобуліну, ці гібридами (квадроми) дають потенційну суміш 10 різних молекул антитіла, з яких лише одна має правильну біспецифічну структуру. Очищення правильної молекули, яке звичайно здійснюють постадійно методом афінної хроматографії, є досить складним процесом, а вихід продукту - низьким. Аналогічні процедури розкриті, наприклад, у WO 93/08829, патентах США №№6210668, 6193967, 6132992, 6106833, 6060285, 6037453, 6010902, 5989530, 5959084, 5959083, 5932448, 5833985, 5821333, 5807706, 5643759, 5601819, 5582996, 5496549, 4676980, WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Traunecker et al., EMBO J. 10:3655 (1991), Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986), які всі включені сюди за посиланням.

Молекули нуклеїнової кислоти

З використанням наведеної тут інформації, такої як нуклеотидні послідовності, що кодують щонайменше 70-100% замісних амінокислот щонайменше однієї SEQ ID NOS:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, їхніх визначених фрагментів, варіантів чи консенсусних послідовностей, або депонований вектор, який включає щонайменше одну з цих послідовностей, можна одержати молекулу нуклеїнової кислоти за даним винаходом, яка кодує щонайменше одне cCLB-8 анти-ІЛ-6 антитіло з використанням описаних тут або відомих фахівцям методів.

Молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом можуть мати форму РНК, такої як мРНК, hnРНК (людська ядерна РНК), тРНК чи будь-яку іншу форму, або форму ДНК, включаючи, без обмеження, кДНК та геномну ДНК, одержану клонуванням чи продуковану синтетичними методами, чи будь-яких їхніх комбінацій. ДНК може бути тринитковою, двонитковою чи одонитковою, чи будь-якою їхньою комбінацією. Будь-яка частина щонайменше однієї нитки ДНК чи РНК може бути кодуючою ниткою, відомою такою як смислова нитка, або вона може бути не-кодуючою ниткою, яку називають також анти-смисловою ниткою.

Молекули ізольованої нуклеїнової кислоти за даним винаходом можуть включати молекули нуклеїнової кислоти, що містять відкриту рамку зчитування (ORF), необов'язково, з один чи кілька інтронів, наприклад, без обмеження, щонайменше одну визначену частину щонайменше однієї CDR, такої як CDR1, CDR2 та/або CDR3 щонайменше одного важкого ланцюга (наприклад, SEQ ID NOS:1-3) чи легкого ланцюга (наприклад, SEQ ID NOS:4-6); молекули нуклеїнової кислоти, що містять кодуючу послідовність анти-ІЛ-6 антитіла чи варіабельної ділянки (наприклад, SEQ ID NOS:15 чи 16); та молекули нуклеїнової кислоти, що містять нуклеотидну послідовність, яка, по суті, відрізняється від описаних вище, але яка внаслідок деградації генетичного коду ще кодує щонайменше одне анти-ІЛ-6 антитіло, як описано тут та/або як відомо фахівцям. Звичайно, генетичний код є добре відомим фахівцям. Таким чином, для фахівця в даній області буде рутинною задачею створення варіантів такої деградованої нуклеїнової кислоти, що кодують специфічні анти-ІЛ-6 антитіла за даним винаходом. Див., наприклад, Ausubel, et al., supra, і такі варіанти нуклеїнової кислоти включені до даного винаходу. Необмежуючі приклади молекули ізольованої нуклеїнової кислоти за даним винаходом включають SEQ ID NOS:9-16; які відповідають необмежуваним прикладам нуклеїнових кислот, що кодують, відповідно, HC (важкий ланцюг) CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC (легкий ланцюг) CDR1, LC CDR2, LC CDR3, варіабельну ділянку HC та варіабельну ділянку LC.

Як було вказано тут, молекули нуклеїнової кислоти за даним винаходом, які включають нуклеїнову кислоту, що кодує анти-ІЛ-6 антитіло, можуть включати, без обмеження, власне нуклеїнові кислоти, що кодують амінокислотну послідовність фрагмента антитіла; кодуючу послідовність антитіла у цілому чи його ділянки; кодуючу послідовність антитіла, фрагмента чи ділянки, а також додаткові послідовності, такі як кодуюча послідовність щонайменше одної сигнальної лікерної чи злитого пептиду, з вищезгаданими, додатковими кодуючими послідовностями, такими як щонайменше один інтрон, чи без них, разом з додатковими некодуючими послідовностями, включаючи, без обмеження, некодуючі 5'- і 3'-послідовності, такі як транскрибовані нетрансльовані послідовності, які беруть участь у транскрипції, процесингу мРНК, включаючи сигнали сплайсингу та поліаденілювання (наприклад, рибосомне зв'язування та стабільність мРНК); додаткову кодуючу послідовність, яка кодує додаткові амінокислоти, наприклад, такі, що створюють додаткові функціональності. Таким чином, послідовність, що кодує антитіло, може бути злитою з маркерною послідовністю, такою як послідовність, що кодує пептид, який сприяє очищенню злитого антитіла, яке містить фрагмент чи ділянку антитіла.

Полінуклеотиди, що селективно гібридизуються з полінуклеотидом, як описано тут

Даний винахід пропонує ізольовані нуклеїнові кислоти, які гібридизуються в умовах селективної гібридації з утворенням розкритого тут полінуклеотиду. Таким чином, полінуклеотиди за даним варіантом

втілення можуть бути використані для виділення, детектування та/або кількісного визначення нуклеїнових кислот, що включають такі полінуклеотиди. Наприклад, полінуклеотиди за даним винаходом можуть бути використані для ідентифікації, виділення, чи ампліфікації часткових чи повних клонів у депонованій бібліотеці. У деяких варіантах втілення, полінуклеотиди є геномними чи кДНК послідовностями, ізольованими чи в інший спосіб комплементарними до кДНК з бібліотеки нуклеїнових кислот людини чи ссавця.

Краще, бібліотека кДНК включає щонайменше 80% первинної непроцесованої послідовності, краще, щонайменше 85% чи 90% первинної непроцесованої послідовності, і ще краще, щонайменше 95% первинної непроцесованої послідовності. Бібліотеки кДНК можуть бути нормалізовані для збільшення репрезентативності рідких послідовностей. Для послідовностей, що мають знижену ідентичність послідовності по відношенню до комплементарної послідовності, типово, але не виключно, використовують умови гібридизації низької чи помірної суворості. Умови помірної та високої суворості можуть, необов'язково, бути використані для послідовностей з більшим ступенем ідентичності. Умови низької суворості дозволяють проводити селективну гібридизацію послідовностей, що мають ідентичність послідовності близько 70%, і можуть бути використані для ідентифікації ортологічних чи паралогічних послідовностей.

Необов'язково, полінуклеотиди за даним винаходом кодують щонайменше ділянку антибіота, кодованого описаними тут полінуклеотидами. Полінуклеотиди за даним винаходом охоплюють послідовності нуклеїнової кислоти, що можуть бути використані для селективної гібридизації з одержанням полінуклеотиду, що кодує антибіот за даним винаходом. Див., наприклад, Ausubel, *supra*; Colligan, *supra*, які всі включені сюди за посиланням.

Конструювання нуклеїнових кислот

Ізольовані нуклеїнові кислоти за даним винаходом можуть бути виготовлені з використанням (а) рекомбінантних методів, (b) синтетичних методик, (c) методів очищення, чи їхніх комбінацій, ас добре відомо фахівцям.

Нуклеїнові кислоти можуть зручно включати послідовності на додаток до полінуклеотиду за даним винаходом. Наприклад, мультиклонувальний сайт, який включає один чи кілька сайтів рестрикційної ендонуклеази, може бути вставлений до нуклеїнової кислоти для сприяння виділенню полінуклеотиду. можуть бути вставлені також послідовності, що транскрибуються, для сприяння виділенню транскрибованого полінуклеотиду за даним винаходом. Наприклад, гексагістидинова маркерна послідовність забезпечує зручний засіб для очищення протеїнів за даним винаходом. Нуклеїнова кислота за даним винаходом - за винятком кодуєчої послідовності - є, необов'язково, вектором, адаптором, чи лінкером для клонування та/або експресії полінуклеотиду за даним винаходом.

До таких клонувальних та/або експресувальних послідовностей можуть бути додані додаткові послідовності для оптимізації їхньої функції під час клонування та/або експресії, для полегшення виділенню полінуклеотиду, або для сприяння введенню полінуклеотиду до клітини. Використання клонуючих векторів, векторів експресії, адапторів та лінкерів є добре відомим фахівцям (див., наприклад, Ausubel, *supra*; чи Sambrook, *supra*).

Рекомбінантні методи конструювання нуклеїнових кислот

Композиції ізольованої нуклеїнової кислоти за даним винаходом, такої як РНК, кДНК, геномна ДНК, чи будь-якої їхньої комбінації, можуть бути одержані з біологічних джерел з використанням будь-якої кількості методологій клонування, відомих фахівцям в цій області техніки. У деяких варіантах втілення, олігонуклеотидні проби, які селективно гібридизуються у суворих умовах з полінуклеотидами за даним винаходом, використовуються для ідентифікації бажаної послідовності у кДНК чи бібліотеці геномної ДНК. Виділення РНК і конструювання бібліотек кДНК та геномних бібліотек є добре відомими пересічним фахівцям в цій області техніки (див., наприклад, Ausubel, *supra*; чи Sambrook, *supra*).

Скринінг та методи виділення нуклеїнових кислот

Бібліотека кДНК чи геномна бібліотека може бути піддана скринінгу з використанням проби на основі послідовності полінуклеотиду за даним винаходом, такої як розкриті тут послідовності. Можуть бути використані проби для гібридизації з геномною ДНК чи послідовностями кДНК для ізоляції гомологічних генів в одному й тому самому чи різних організмах. Фахівцям в цій області техніки зрозуміло, що при проведенні аналізу можуть бути використані різні ступені суворості гібридизації; і що суворими можуть бути гібридизація чи середовище для промивання. При зростанні суворості умов гібридизації повинен існувати більший ступінь комплементарності між пробою та мішенню для утворення дуплекса. Ступінь суворості можна контролювати за допомогою одного чи кількох параметрів, таких як температура, йонна сила, рН та присутність частково денатуруючого розчинника, такого як формамід. Наприклад, суворість гібридизації зручно контролювати шляхом зміни полярності розчину реагентів, наприклад, шляхом маніпуляцій концентрації формаміду в інтервалі від 0% до 50%. Ступінь комплементарності (ідентичність послідовності), потрібна для виявлюваного зв'язування, буде змінюватися у відповідності до суворості середовища гібридизації та/або середовища для промивання. Ступінь комплементарності буде оптимально складати 100%, чи 70-100%, або будь-який інтервал значень чи значення у цих межах. Однак, слід розуміти, що незначні варіації послідовності у пробах та праймерах можуть бути компенсовані шляхом зниження суворості середовища гібридизації та/або промивання.

Методи ампліфікації РНК чи ДНК є добре відомими фахівцям і можуть бути використані у відповідності до даного винаходу без непотрібного експериментування, на основі наведеного тут опису та вказівок.

Відомі методи ампліфікації ДНК чи РНК включають, без обмеження, полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) та споріднені процеси ампліфікації (див., наприклад, патенти США №4683195, 4683202, 4800159, 4965188, видані на ім'я Mullis, et al.; 4795699 та 4921794, на ім'я Tabor, et al.; 5142033. на ім'я Innis; 5122464, на ім'я Wilson, et al.; 5091310, на ім'я Innis; 5066584, на ім'я Gyllenstein, et al.; 4889818, на ім'я Gelfand, et al.; 4994370, на ім'я Silver, et al.; 4766067, на ім'я Biswas; 4656134, на ім'я Ringold) і РНК-медійованої ампліфікації з використанням анти-смыслові РНК до цільової послідовності як матрицю для синтезу двониткової ДНК (патент США №5130238, на ім'я Malek, et al., з торговою назвою NASBA), які цілком включені сюди за посиланням.

(див., наприклад, Ausubel, supra; чи Sambrook, supra).

Наприклад, технологія полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) може бути використана для ампліфікації послідовності полінуклеотидів за даним винаходом та споріднених генів безпосередньо з бібліотек геномної ДНК чи кДНК. ПЛР та інші методи ампліфікації *in vitro* можуть бути також корисними, наприклад, для клонування послідовностей нуклеїнових кислот, що кодують протеїни, які треба експресувати, для одержання нуклеїнових кислот, що можуть бути використані як проби для детектування присутності бажаної мРНК у зразках, для секвенування нуклеїнових кислот, чи в інших цілях. Приклади методик, достатні для того, щоб допомогти фахівцям використати методи ампліфікації *in vitro*, наведені у Berger, supra, Sambrook, supra, та Ausubel, supra, а також Mullis, et al., патент США №4683202 (1987); та Innis, et al., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990). Комерційно доступні набори реагентів для геномної ПЛР ампліфікації відомі фахівцям. Див., наприклад, Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech). Додатково, для поліпшення виходу довгих продуктів ПЛР може бути використаний, наприклад, протеїн T4 гена 32 (Boehringer Mannheim).

Синтетичні методи конструювання нуклеїнових кислот

Ізольовані нуклеїнові кислоти за даним винаходом можуть бути також одержані шляхом прямого хімічного синтезу відомими методами (див., наприклад, Ausubel, et al., supra). Хімічний синтез загалом продукує одонитковий олігонуслеотид, який може бути перетворений на двониткову ДНК шляхом гібридизації з комплементарною послідовністю, або шляхом полімеризації з ДНК-полімеразою з використанням одичинної нитки як матриці. Фахівцю в цій області техніки зрозуміло, що, хоч хімічний синтез ДНК може бути обмежений послідовностями довжиною приблизно 100 чи більше основ, довші послідовності можуть бути одержані лігуванням коротших послідовностей.

Рекомбінантні експресійні касети

Даний винахід далі пропонує рекомбінантні експресійні касети, які включають нуклеїнову кислоту за даним винаходом. Послідовність нуклеїнової кислоти за даним винаходом, наприклад, кДНК чи геномна послідовність, яка кодує антитіло за даним винаходом, може бути використана для конструювання рекомбінантної експресійної касети, яка може бути введена до щонайменше однієї бажаної клітини-хазяїна. Рекомбінантна експресійна касета буде типово включати полінуклеотид за даним винаходом, функціонально зв'язаний з регуляторними послідовностями ініціації транскрипції, які керуватимуть транскрипцією полінуклеотиду у бажаній клітині-хазяїні. Для керування експресією нуклеїнової кислоти за даним винаходом можуть бути використані як гетерологічні, так і негетерологічні (тобто, ендегенні) промотори.

У деяких варіантах втілення, ізольовані нуклеїнові кислоти, що виконують функції промотора, енхансера чи інших елементів, можуть бути введені у відповідне положення (вище чи нижче по ланцюгу чи в інтроні) негетерологічної форми полінуклеотиду за даним винаходом для підвищувального чи знижувального регулювання експресії полінуклеотиду за даним винаходом. Наприклад, ендегенні промотори можуть бути змінені *in vivo* чи *in vitro* шляхом мутації, делеції та/або заміщення.

Вектори та клітини-хазяєва

Даний винахід стосується також векторів, які включають молекули ізольованої нуклеїнової кислоти за даним винаходом, клітин-хазяїв, генетично рекомбінованих за допомогою рекомбінантних векторів, та продукування щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла рекомбінантними методами, як добре відомо фахівцям. Див., наприклад, Sambrook, et al., supra; Ausubel, et al., supra, які всі включені сюди за посиланням.

Полінуклеотиди можуть, необов'язково, бути з'єднані з вектором, який містить селективуваний маркер для розмноження у хазяїні. Загалом, плазмідний вектор вводять у виді преципітату, такого як преципітат фосфату кальцію, чи комплексу із зарядженим ліпідом. Якщо вектор є вірусом, він може бути упакований *in vitro* з використанням придатної пакувальної клітинної лінії, а потім введений шляхом трансдукції до клітини-хазяїна.

Вставка ДНК має бути функціонально з'єднана з відповідним промотором. Експресійні конструкти повинні далі містити сайти ініціації та термінації транскрипції і, у ділянці транскрипції, рибосома-зв'язуючий сайт для трансляції. Кодуюча частина зрілих транскриптів, що експресуються конструктами, буде, краще, включати ділянку ініціації трансляції на початку та термінуючий кодон - у кінці (наприклад, UAA, UGA чи UAG), розташований належним чином на кінці мРНК, що має бути трансльована, причому кращими для експресії клітин ссавців чи еукаріотів є UAA та UAG.

Експресійні вектори будуть краще, але необов'язково, включати щонайменше один селективуваний маркер. Такі маркери включають, наприклад, без обмеження, резистентність до метотрексату (MTX), дигідрофолатредуктази (DHFR, Пат. США №4399216; 4634665; 4656134; 4956288; 5149636; 5179017, ампіциліну, неоміцину (G418), мікофенольної кислоти чи глутамінсинтази (GS, Пат. США №5122464; 5770359; 5827739) для еукаріотичних клітинних культур, і гени резистентності до тетрацикліну чи ампіциліну ген для культивування у *E. coli* та інших бактеріях чи прокаріотах (зазначені вище патенти цілком включені сюди за посиланням). Відповідні культуральні середовища та умови для вищевказаних клітин-хазяїв відомі фахівцям. Придатні вектори можуть бути легко визначені кваліфікованим фахівцем. Введення сконструйованого вектора до клітини-хазяїна може бути здійснене шляхом трансфекції з фосфатом кальцію, DEAE-декстран-медіованої трансфекції, катіонний ліпід-медіованої трансфекції, електропорації, трансдукції, інфікування чи іншими відомими методами. Такі методи описані у відомому рівні техніки, наприклад, Sambrook, supra, Глави 1-4 та 16-18; Ausubel, supra, Глави 1, 9, 13, 15, 16.

Щонайменше одне антитіло за даним винаходом може бути експресованим у модифікованій формі, такій як злитий протеїн, і може включати не лише сигнали секретування, але й додаткові гетерологічні функціональні ділянки. Наприклад, до N-кінця антитіла може бути додана ділянка додаткових амінокислот, зокрема, заряджених амінокислот, для поліпшення стабільності та персистенції у клітині-хазяїні під час очищення, чи під час подальшого маніпулювання та зберігання. До антитіла за даним винаходом можуть бути додані також пептидні фрагменти для сприяння очищенню. Такі ділянки можуть бути видалені до остаточної обробки антитіла чи щонайменше одного його фрагмента. Такі методи описані у багатьох стандартних лабораторних посібниках, таких як Sambrook, supra, Глави 17.29-17.42 та 18.1-18.74; Ausubel, supra, Глави 16,

Рядовим фахівцем в цій області техніки відомі численні системи експресії, доступні для експресії нуклеїнової кислоти, що кодує протеїн за даним винаходом.

За альтернативним варіантом, нуклеїнові кислоти за даним винаходом можуть бути експресовані у клітині-хазяїні увімкненням (за допомогою маніпуляцій) у клітині-хазяїні, що містить ендогенну ДНК, кодує антитіло за даним винаходом. Такі методи є добре відомими фахівцям, наприклад, описані у патентах США №№5580734, 5641670, 5733746 та 5733761, цілком включених сюди за посиланням.

Прикладами клітинних культур, придатних для продукування антитіл, їхніх визначених ділянок чи варіантів, є клітини ссавців. Системи клітин ссавців часто матимуть форму моношарів клітин, хоч можуть бути використані також суспензії клітин ссавців чи біореактори. Фахівцями було розроблено ряд придатних ліній клітин-хазяїв, здатних до експресії інтактних глікозилованих протеїнів, які включають клітинні лінії COS-1 (наприклад, ATCC CRL 1650), COS-7 (наприклад, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (наприклад, ATCC CRL-10), CHO (наприклад, ATCC CRL 1610) та BSC-1 (наприклад, ATCC CRL-26), клітини Cos-7, клітини CHO, клітини her G2, P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, клітини 293, клітини HeLa і т.п., що можуть бути легко одержані з, наприклад, American Type Culture Collection, Manassas, Va (www.atcc.org). Кращі клітини-хазяї включають клітини лімфоїдного походження, такі як клітини мієломи and лімфоми. Особливо кращими клітинами-хазяями є клітини P3X63Ag8.653 (номер доступу ATCC CRL-1580) та клітини SP2/0-Ag14 (номер доступу ATCC CRL-1851). В особливо кращому варіанті втілення, рекомбінантна клітина є клітиною P3X63Ag8.653 чи SP2/0-Ag14.

Експресійні вектори для цих клітин можуть включати одну чи кілька з контрольних послідовностей експресії, таких як, без обмеження джерелом реплікації; промотор (наприклад, пізній чи ранній SV40 промотори, промотор цитомегаловірусу (CMV) (пат. США №№5168062; 5385839), промотор HSV tk, промотор pgk (фосфогліцераткіназа), промотор EF-1 альфа (пат. США №5266491), щонайменше один промотор імуноглобуліну людини; енхансер, та/або сайти процесингу інформації, такі як рибосомазв'язуючі сайти, сайти розщеплення РНК, сайти поліаденілювання (наприклад, сайт приєднання SV40 large T Ag полі-А) та транскрипційні термінаційні послідовності. Див., наприклад, Ausubel et al., supra; Sambrook, et al., supra. Інші клітини, придатні для продукування нуклеїнових кислот чи протеїнів за даним винаходом, є відомі та/або доступні, наприклад, з Каталогу клітинних ліній та гібридом American Type Culture Collection (www.atcc.org) чи інших відомих чи комерційних джерел.

При використанні еукаріотичних клітин-хазяїв до вектора типово включають термінуючі послідовності поліаденілювання чи транскрипції. Прикладом термінуючої послідовності є послідовність поліаденілювання з гена бичачого гормону росту. Можуть бути включені також послідовності для точного сплайсингу транскрипта. Прикладом сплайсінгової послідовності є інтрон VP1, одержаний з SV40 (Sprague, et al., J. Virol. 45:773-781 (1983)). Додатково, до вектора можуть бути включені генні послідовності для контролю реплікації у клітині-хазяїні, як відомо фахівцям.

Продукування антитіла

Щонайменше одне анти-ІЛ-6 антитіло за даним винаходом can be необов'язково продуковане клітинною лінією, змішаною клітинною лінією, іморталізованою клітиною чи клоною популяцією іморталізованих клітин, як добре відомо фахівцям. Див., наприклад, Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), які всі включені сюди за посиланням.

В одному підході, гібридному продукують шляхом зливання придатної безсмертної клітинної лінії (наприклад, клітинної лінії мієломи, такої як, без обмеження, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMIWA, NEURO 2A, чи подібної, або гетеромієломи, їхніх продуктів злиття, чи будь-якої клітини чи гібридизованої клітини, одержаної з них, чи будь-якої іншої придатної клітинної лінії, як відомо фахівцям (див., наприклад, www.atcc.org, www.lifetech.com. і т.п.), з антитіло-продукуючими клітинами, такими як, без обмеження, ізольовані чи клоновані клітини селезінки, периферичної крові, лімфи, мигдалика чи інші імунні чи В-клітини, або будь-які інші клітини, що експресують постійні чи варіабельні чи каркасні чи CDR-послідовності важкого чи легкого ланцюга, у виді ендогенної чи гетерологічної нуклеїнової кислоти, рекомбінантної чи ендогенної, вірусної, бактеріальної, водоростевої, прокаріотичної ДНК, ДНК амфібій, комах, рептилій, риб, ссавців, гризунів, коней, овець, кіз, вівців, приматів, еукаріотичної, геномної ДНК, кДНК, рДНК, мітохондріальної ДНК чи РНК, хлоропластової ДНК чи РНК, hnРНК, мРНК, tРНК, одно-, дво- чи триланцюгової, гібридизованої і т.п., чи будь-якої їхньої комбінації. Див., наприклад, Ausubel, supra, та Colligan, Immunology, supra, Глава 2, цілком включені сюди за посиланням.

Для експресії гетерологічної чи ендогенної нуклеїнової кислоти, що кодує антитіло, його визначений фрагмент чи варіант, за даним винаходом, може бути використана також будь-яка інша придатна клітина-хазяїні. Злиті клітини (гібридами) чи рекомбінантні клітини можуть бути ізольовані з використанням умов селективної культивування чи інших придатних відомих методів, і клоновані методами обмеженого розведення чи сортування клітин, чи іншими відомими методами. Клітини, що продукують антитіла з бажаною специфічністю, можуть бути відібрані за допомогою придатного аналізу (наприклад, ELISA).

Антитіла за даним винаходом можуть також бути одержані з використанням щонайменше однієї нуклеїнової кислоти, що кодує анти-ІЛ-6 антитіло, для одержання трансгенних тварин чи ссавців, таких як кози, корови, коні, вівці і т.п., що продукують такі антитіла у своєму молоці. Такі тварини можуть бути створені з використанням відомих методів. Див., наприклад, без обмеження, патенти США №№5827690; 5849992; 4873316; 5849992; 5994616, 5565362; 5304489 і т.п., кожний з яких цілком включений сюди за посиланням.

Антитіла за даним винаходом можуть бути додатково одержані з використанням щонайменше однієї нуклеїнової кислоти, що кодує анти-ІЛ-6 антитіло, для одержання трансгенних рослин та клітин культурних

рослин (наприклад, без обмеження, тютюну та кукурудзи), які продукують такі антитіла, визначен ділянки чи варіанти, у частинах рослин чи у культивованих з них клітинах. Як необмежувачий приклад, листя трансгенного тютюну, що експресує рекомбінантні протеїни, успішно використовувалося для одержання великої кількості рекомбінантних протеїнів, наприклад, з використанням індукованого промотора. Див., наприклад, Cramer et al., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 240:95-118 (1999) та наведені там посилання. Трансгенна кукурудза також використовувалася для експресії протеїнів ссавців у масштабах комерційного продукування, з біологічними активностями, еквівалентними до протеїнів, продукованих в інших рекомбінантних системах чи одержаних методами очищення з природних джерел. Див., наприклад, Hood et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 464:127-147 (1999) та наведені там посилання. Антитіла також продукували у великій кількості з насіння трансгенних рослин, включаючи фрагменти антитіл, такі як одноланцюгові антитіла (scFv's), включаючи насіння тютюну та бульби картоплі. Див., наприклад, Conrad et al., *Plant Mol. Biol.* 38:101-109 (1998) та наведені там посилання. Так, антитіла за даним винаходом можуть бути також продуковані з використанням трансгенних рослин, згідно з відомими методами. Див. також, наприклад, Fischer et al., *Biotechnol. Appl. Biochem.* 30:99-108 (Oct., 1999), Ma et al., *Trends Biotechnol.* 13:522-7 (1995); Ma et al., *Plant Physiol.* 109:341-6 (1995); Whitlam et al., *Biochem. Soc. Trans.* 22:940-944 (1994); та наведені там посилання. Див. також загалом, без обмеження, експресію антитіл у рослинах. Кожне з вищевказаних посилань цілком включене сюди за посиланням.

Очищення антитіла

Анти-ІЛ-6 антитіло може бути виділене та очищене з культур рекомбінантних клітин добре відомими методами, включаючи, без обмеження, очищення протеїну А, осадження сульфатом амонію чи етанолом, кислотну екстракцію, аніон- чи катіонобмінна хроматографія, хроматографія на фосфоцелюлозі, хроматографія гідрофобної взаємодії, афінна хроматографія, хроматографія на гідроксиапатиті та хроматографія на лектині. Високоєфективна рідинна хроматографія ("ВЕРХ") також може бути використана для очищення. Див., наприклад, Colligan, *Current Protocols in Immunology*, чи *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), наприклад, Глави 1, 4, 6, 8, 9, 10, які всі включені сюди за посиланням.

Антитіла за даним винаходом включають природні очищені продукти, продукти хімічного синтезу та продукти, одержані рекомбінантними методами з еукаріотичного хазяїна, включаючи, наприклад, клітини дріжджів, вищої рослини, комахи та ссавця. У залежності від хазяїна, використаного у процедурі рекомбінантного продукування, антитіло за даним винаходом може бути глікозилованим чи може бути неглікозилованим, причому глікозиловане є кращим. Такі методи описані у багатьох стандартних лабораторних посібниках, таких як Sambrook, *supra*, Розділи 17.37-17.42; Ausubel, *supra*, Глави 10, 12, 13, 16, 18 та 20, Colligan, *Protein Science*, *supra*, Глави 12-14, які усі цілком включені сюди за посиланням.

Клонування та експресія ІЛ-6 антитіла у клітинах ссавців

Типовий вектор експресії ссавців містить щонайменше один промоторний елемент, який медіює ініціацію транскрипції мРНК, антитіло-кодуючу послідовність, та сигнали, потрібні для термінації транскрипції та поліаденілювання транскрипта. Додаткові елементи включають енхансери, послідовності Козака (Kozak) та проміжні послідовності, фланковані донорними та акцепторними сайтами для сплайсингу РНК. Високоєфективна транскрипція може бути досягнута при використанні ранніх та пізніх промоторів SV40, довгих термінальних повторів (LTRS) ретровірусів, наприклад, RSV, HTLV1, HIV1, та раннього промотора цитомегаловірусу (CMV). Однак, можуть бути використані також клітинні елементи (наприклад, людський актиновий промотор). Придатні експресійні вектори для використання у практиці даного винаходу включають, наприклад, вектори, такі як pRESIneo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN чи pLNCX (Clonetech Labs, Palo Alto, CA), pcDNA3.1 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-) чи pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVL та PMSG (Pharmacia, Uppsala, Sweden), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) та pBC12MI (ATCC 67109). Клітини-хазяї ссавців, що можуть бути використані, включають людські клітини Hela 293, H9 та Jurkat, мишачі клітини NIH3T3 та C127, Cos 1, Cos 7 та CV 1, клітини перепела QC1-3, мишачі L-клітини та клітини яєчників китайського хом'ячка (CHO).

За альтернативним варіантом, ген може бути експресований у стабільній клітинній лінії, яка включає цей ген, інтегрований до хромосоми. Котрансфекція з селектируваним маркером, таким як dhfr, gpt, неоміцин чи гігromіцин, дозволяють здійснити ідентифікацію та виділення трансфєкованих клітин.

Трансфєкований ген може також бути ампліфікований для експресії великої кількості кодованого антитіла. Маркер DHFR (дигідрофолатредуктаза) є корисним для створення клітинних ліній, які несуть кілька сотень чи навіть тисяч копій цікавого гена. Іншим корисним селектируваним маркером є фермент глутамінсинтаза (GS) (Murphy, et al., *Biochem. J.* 227:277-279 (1991); Bebbington, et al., *Bio/Technology* 10:169-175 (1992)). З використанням цих маркерів, клітини ссавця вирощують у селективному середовищі і відбирають клітини з найвищою резистентністю. Такі клітинні лінії містять ампліфікований ген(и), інтегрований до хромосоми. Клітини яєчників китайського хом'ячка (CHO) та NSO часто використовують для продукування антитіл.

Експресійні вектори pC1 та pC4 містять сильний промотор (LTR) вірусу саркоми Рауса (Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5:438-447 (1985)) плюс фрагмент CMV-енхансера (Boshart, et al., *Cell* 41:521-530 (1985)). Множинні сайти клонування, наприклад, з сайтами розщеплення рестрикційним ферментом BamHI, XbaI та Asp718, сприяють клонуванню потрібного гена. Вектори містять, крім того, 3'-інтрон, сигнал поліаденілювання та термінуючий сигнал гена препроінсуліну щура.

Клонування та експресія у клітинах CHO

Вектор pC4 використовується для експресії антитіла ІЛ-6. Плазмідна pC4 є похідним плазміді pSV2-dhfr (№ доступу ATCC 37146). Плазмідна містить мишачий ген DHFR під керуванням раннього промотора SV40. Клітини яєчників китайського хом'ячка чи інші, що не виявляють дигідрофолатної активності, трансфєковані цими плазмідними, можуть бути селектовані шляхом вирощування клітин у селективному середовищі (наприклад, alpha minus MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD) з добавкою хіміотерапевтичного агента метотрексату. Ампліфікація генів DHFR у клітинах, резистентних до метотрексату (MTX) є добре документованою (див., наприклад, F. W. Alt, et al., *J. Biol. Chem.* 253:1357-1370 (1978); J. L. Hamlin and C Ma, *Biochem. et Biophys. Acta*

1097:107-143 (1990); i M. J. Page and M. A. Sydenham, *Biotechnology* 9:64-68 (1991)). Клітини, вирощувані у зростаючих концентраціях MTX, виробляють резистентність до лікарського засобу за рахунок надпродуктування цільового ферменту, DHFR, в результаті ампліфікації гена DHFR. Якщо з геном DHFR зчеплений другий ген, то він звичайно коампліфікується та надпродукується. Фахівцям відомо, що цей підхід може бути використаний для створення клітинних ліній, які несуть більш ніж 1000 копій ампліфікованого гена (генів). Згодом, після видалення метотрексату, одержують клітинні лінії, що містять ампліфікований ген, інтегрований до однієї чи кількох хромосом клітини-хазяїна.

Плазмід рС4 містить для експресії потрібного гена сильний промотор довгого термінального повтора (LTR) вірусу саркоми Рауса (Cullen, et al., *Molec. Cell. Biol.* 5:438-447 (1985)) плюс фрагмент, ізольований з енхансера безпосереднього раннього гена цитомегаловірусу людини (CMV) (Boshart, et al., *Cell* 41:521-530 (1985)). Нижче промотора розташовані сайти розщеплення BamHI, XbaI та Asp718 рестрикційним ферментом, які дозволяють здійснювати інтегрування генів. За цими сайтами клонування плазмід містить 3'-інтрон та сайт поліаденілювання гена препроінсуліну щура. Для експресії можуть бути використані також інші вискоєфективні промотори, наприклад, людський b-актиновий промотор, ранні чи пізні промотори SV40 або довгі термінальні повтори з інших ретровірусів, наприклад, HTV та HTLV1. Системи генної експресії Clontech's Tet-Off та Tet-On і подібні системи можуть бути використані для регульованої експресії ІЛ-6 у клітинах ссавців (M. Gossen, and H. Bujard, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 5547-5551 (1992)). Для поліаденілювання мРНК можуть бути використані також інші сигнали, наприклад, з людського гормону росту чи гени глобіну. Відбір стабільних клітинних ліній, що несуть потрібний ген, інтегрований до хромосом, може також бути здійснений після котрансфекції селектируваним маркером, таким як gpt, G418 чи гігromіцин. Спочатку краще використовувати більш ніж один селектируваний маркер, наприклад, G418 плюс метотрексат.

Плазмід рС4 гідролізують рестрикційними ферментами, а потім дефосфорилують за допомогою кишкової фосфатази теляти відомими фахівцям методами. Вектор потім виділяють з 1% агарозного гелю.

Використовують ДНК послідовність, що кодує антибілі ІЛ-6 цілком, наприклад, як представлене у SEQ ID NOS: 7 та 8, які відповідають варіабельним ділянкам HC та LC антибілі ІЛ-6 за даним винаходом, у відповідності до відомих стадій методу. В цьому продукті використовують також ізольовану нуклеїнову кислоту, що кодує придатну людську постійну ділянку (тобто, ділянки HC та LC).

Ізольовані варіабельну та постійну ділянки, що кодують ДНК та дефосфорильований вектор, потім лігують за допомогою Т4 ДНК-лігази. Після цього проводять трансформацію клітин *E. coli* HB101 чи XL-1 Blue та ідентифікують бактерії, що містять вставлений до плазмід рС4 фрагмент, з використанням, наприклад, рестрикційного ферментного аналізу.

Для трансфекції використовують клітини яєчників китайського хом'ячка (CHO), які не мають активного гена DHFR. Здійснюють котрансфекцію 5мкг експресійної плазмід рС4 з 0,5мкг плазмід рSV2-нео за допомогою ліпоексуду. Плазмід рSV2neo містить домінуючий селектируваний маркер, ген нео Tn5, який кодує фермент, що надає резистентність до групи антибіотиків, включаючи G418. Клітини висівають в альфа-мінус MEM з добавкою 1мкг/мл G418. Через 2 дні, клітини трипсинізують та висівають на чашки для клонування гібридом (Greiner, Germany) в альфа-мінус MEM з добавкою 10, 25 чи 50нг/мл метотрексату плюс 1мкг/мл G418. Через приблизно 10-14 днів окремі клони трипсинізують, а потім висівають у 6-лункові чашки петрі чи колби на 10мл з використанням різних концентрацій метотрексату (50нг, 100нг, 200нг, 400нг, 800нг). Клон, що росте при найбільшій концентрації метотрексату, потім переносять на нові 6-лункові чашки, що містять ще більші концентрації метотрексату (1мМ, 2мМ, 5мМ, 10мМ, 20мМ). Повторюють таку саму процедуру, поки не одержать клони, які ростуть при концентрації 100-200мМ. Аналізують експресію бажаного генного продукту, наприклад, методом SDS-PAGE та вестерн-блотингу чи методом оберненофазової ВЕРХ.

Композиція анти-ідіотипічних антибілів до анти-ІЛ-6 антибіла

Крім моноклональних чи химерних анти-ІЛ-6 антибілів, даний винахід також стосується анти-ідіотипічного (анти-Id) антибіла, специфічного по відношенню до таких антибілів за даним винаходом. Анти-Id антибіло є антибілом, яке розпізнає унікальні детермінанти, звичайно асоційовані з антигензв'язуючою ділянкою іншого антибіла. Анти-Id можуть бути одержані шляхом імунізації тварини такого саме виду та генетичного типу (наприклад, мишача лінія), як і джерело Id-антибіла, антибілом чи його CDR-вмісною ділянкою. Імунізована тварина буде розпізнавати та реагувати на ідіотипічні детермінанти імунізуючого антибіла та продукувати анти-Id антибіло. Анти-Id антибіло може бути використано також як "імуноген" для індукції імунної відповіді у іншій тварини, з утворенням так званого анти-Id антибіла.

Композиції анти-ІЛ-6 антибіла

Даний винахід також пропонує щонайменше одну композицію анти-ІЛ-6 антибіла, що включає щонайменше одне, щонайменше два, щонайменше три, щонайменше чотири, щонайменше п'ять, щонайменше шість чи більше анти-ІЛ-6 антибілів, що описані тут та/або відомі фахівцям, які входять до складу неприродної композиції, суміші чи форми. Такі композиції включають неприродні композиції, які включають щонайменше один чи два непроцесовані, з видаленням C-та/або N-кінцем варіанти, домени, фрагменти чи визначені варіанти амінокислотної послідовності анти-ІЛ-6 антибіла, вибрані з групи, що складається з 70-100% заміни амінокислот SEQ ID NOS:1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 чи їхніх визначених фрагментів, доменів чи варіантів. Кращі композиції анти-ІЛ-6 антибіла включають щонайменше один чи два непроцесовані фрагменти, домени чи варіанти щонайменше однієї CDR- чи LBR-вмісної частини послідовності 70-100% SEQ ID NOS:1, 2, 3, 4, 5, 6 чи визначених фрагментів, доменів чи варіантів анти-ІЛ-6 антибіла. Інші кращі композиції включають 40-99% щонайменше однієї з 70-100% SEQ ID NOS:1, 2, 3, 4, 5, 6 чи їхніх визначених фрагментів, доменів чи варіантів. Склад таких композицій визначається у масових відсотках, об'ємних відсотках, концентраціях, молярних концентраціях чи молярних концентраціях для рідких чи твердих розчинів, сумішей, суспензій, емульсій чи колоїдів, як відомо фахівцям чи описано тут.

Композиції анти-ІЛ-6 антибіла за даним винаходом можуть далі включати щонайменше одну з будь-якої придатної та ефективної кількості композиції чи фармацевтичної композиції, що включає щонайменше одне анти-ІЛ-6 антибіло, для введення до клітини, тканини, органу, тварини чи пацієнта, що потребують такої

модуляції, лікування чи терапії, які необов'язково додатково включають щонайменше один агент, вибраний з щонайменше одного антагоніста ФНП (наприклад, без обмеження, антитіло чи фрагмент ФНП, розчинний рецептор чи фрагмент ФНП, його злиті протеїни чи мала молекула-антагоніст ФНП), протиревматичного засобу (наприклад, метотрексат, ауранофін, ауротіоглюкоза, азатіоприн, етанерцепт, тіомалат золота-натрію, гідроксихлорохінусульфат, лефлуномід, сульфасалзін), міорелаксанту, наркотичного засобу, нестероїдного протизапального лікарського засобу (NSAID), анальгетика, анестетика, седативного засобу, місцевого анестетика, нейромыш'язового блокатора, протимікробного засобу (наприклад, аміноглікозид, антигрибковий засіб, антипаразитарний засіб, антивірусний засіб, карбапенем, цефалоспирин, флуорхінолон, макролід, пеніцилін, сульфонамід, тетрациклін, інший протимікробний засіб), антипсоріатичного засобу, кортикостероїду, анаболічного стероїду, діабет-зв'язаного агента, мінералу, аліментарного засобу, тиреоїдного агента, вітаміну, кальцій-зв'язаного гормону, антидіарейного засобу, протикашльового засобу, протиблювотного засобу, проти виразкового засобу, проносного засобу, антикоагулянту, еритропоетину (наприклад, епоетин-альфа), філграстиму (наприклад, G-CSF, Neupogen), сарграмостиму (GM-CSF, Leukine), засобу для проведення імунізації, імуноглобуліну, імунодепресанта (наприклад, базиликсимаб, циклоспорин, даклізумаб), гормону росту, гормонзамісного лікарського засобу, модулятора естрогенового рецептора, мідіаційного засобу, циклоплегічного засобу, алкілуючого агента, антиметаболіту, мітотичного інгібітора, радіофармацевтичного засобу, антидепресанта, протиманіакального агента, антипсихотичного засобу, анксиолітичного засобу, гіпнотичного засобу, симпатоміметика, стимулятора, донепезил, такрину, протиастматичного засобу, бета-агоніста, стероїдного засобу для інгаляції, інгібітора лейкотриєну, метилксантину, кромоліну, епінефрину чи аналога, дорназе-альфа (Pulmozyme), -цитокіну чи цитокінового антагоніста. Необмежуючі приклади таких цитокінів включають, без обмеження, будь-який від ІЛ-1 до ІЛ-23. Придатні режими дозування є добре відомими фахівцям. Див., наприклад, Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), причому кожне з цих посилань цілком включене сюди за посиланням.

Такі протиракові чи протиінфекційні засоби можуть також включати молекули токсину, асоційовані, зв'язані, введені до складу композиції чи такі, що вводяться спільно з щонайменше одним антитілом за даним винаходом. Токсин може, необов'язково, селективно вбивати патологічні клітини чи тканини. Патологічні клітини можуть бути рковими чи іншими клітинами. Такі токсини можуть бути, без обмеження, очищеними чи рекомбінантними токсинами або фрагментами токсину, що включають, щонайменше, один функціональний цитотоксичний домен токсину, наприклад, вибраний з щонайменше одного з рицину, токсину дифтерії, токсину зміїного яду чи бактеріального токсину. Термін токсин включає також як ендотоксини, так і екзотоксини, продукуючі будь-якими поширеними у природі, мутантними чи рекомбінантними бактеріями чи вірусами, які можуть викликати будь-який патологічний стан у людей та інших ссавців, включаючи токсичний шок, який може призвести до загибелі. Такі токсини можуть включати, без обмеження, ентеротоксигенний термолабільний ентеротоксин *E. coli* (LT), термостабільний ентеротоксин (ST), цитотоксин *Shigella*, ентеротоксини *Aeromonas*, токсин синдрому токсичного шоку-1 (TSST-1), стафілококовий ентеротоксин A (SEA), B (SEB) чи C (SEC), стрептококові ентеротоксини і т.п. Такі бактерії включають, без обмеження, штами ентеротоксигенних ліній *E. coli* (ETEC), ентерогеморагічних ліній *E. coli* (наприклад, штами серотипу 0157:H7), під *Staphylococcus* (наприклад, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*), під *Shigella* (наприклад, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii* та *Shigella sonnei*), під *Salmonella* (наприклад, *Salmonella typhi*, *Salmonella cholerae-suis*, *Salmonella enteritidis*), під *Clostridium* (наприклад, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), під *Campylobacter* (наприклад, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*), під *Helicobacter*, (наприклад, *Helicobacter pylori*), під *Aeromonas* (наприклад, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*), *Plesiomonas shigelloides*, *Yersinia enterocolitica*, під *Vibrios* (наприклад, *Vibrios cholerae*, *Vibrios parahaemolyticus*), під *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa* та *Streptococci*. Див., наприклад, Stein, ed., *INTERNAL MEDICINE*, 3rd ed., pp.1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans et al., eds., *Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control*, 2d. Ed., pp.239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell et al., *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 3d. Ed., Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow et al., eds., *The Merck Manual*, 16th edition, Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Wood et al., *FEMS Microbiology Immunology*, 76:121-134 (1991); Marrack et al., *Science*, 248:705-711 (1990), зміст яких цілком включений сюди за посиланням.

Сполуки, композиції чи комбінації анти-ІЛ-6 антитіла за даним винаходом можуть далі включати щонайменше одну з будь-яких придатних допоміжних речовин, таких як, без обмеження, розріджувач, зв'язуюче, стабілізатор, буфери, солі, ліпофільні розчинники, консервант, ад'ювант і т.п. Кращими є фармацевтично прийнятні допоміжні речовини. Необмежуючі приклади та методи виготовлення таких стерильних розчинів є добре відомими фахівцям, такі як, без обмеження, Gennaro, Ed., *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Можуть бути вибрані у звичайний спосіб фармацевтично прийнятні носії, придатні для шляху введення, забезпечення розчинності та/або стабільності композиції анти-ІЛ-6 антитіла, фрагмента чи варіанта, як добре відомо фахівцям чи описано тут.

Фармацевтичні ексципієнти та добавки, придатні для даної композиції, включають, без обмеження, протеїни, пептиди, амінокислоти, ліпіди та вуглеводи (наприклад, цукри, включаючи моносахариди, ди-, три-, тетра- та олігосахариди; дериватизовані цукри, такі як альдитоли, альдонові кислоти, естерифіковані цукри і т.п.; та полісахариди чи цукрові полімери), які можуть бути присутніми роздільно чи у комбінації, включаючи, роздільно чи у комбінації, 1-99,99% мас. чи об. Типові протеїнові ексципієнти включають сироватковий альбумін, такий як сироватковий альбумін людини (HSA), рекомбінантний людський альбумін (rHA), желатин, казеїн і т.п. Типові компоненти амінокислота/антитіла, які можуть також виконувати роль буфера, включають аланін, гліцин, аргінін, бетаїн, гістидин, глутамінову кислоту, аспарагінову кислоту, цистеїн, лізін, лейцин, ізолейцин, валін, метіонін, фенілаланін, аспартам і т.п. Однією кращою амінокислотою є гліцин.

Вуглеводні ексципієнти, придатні для використання у винаході, включають, наприклад, моносахариди, такі як фруктоза, мальтоза, галактоза, глюкоза, D-маноза, сорбоза і т.п.; дисахариди, такі як лактоза, сахароза,

трегалоза, целобіоза і т.п.; полісахариди, такі як рафіноза, мелезитоза, мальтодекстрини, декстрини, крохмалі і т.п.; та альдити, такі як маніт, ксиліт, мальтит, лактит, ксиліт, сорбіт (глюцит), міоїнозит і т.п. Кращі вуглеводні ексципієнти для використання в даному винаході є маніт, трегалоза та рафіноза.

Композиції анти-ІЛ-6 антитіла можуть також включати буфер чи агент регулювання рН; типово, буфер є сіллю, одержаною з органічної кислоти чи основи. Типові буфери включають солі органічних кислот, такі як солі лимонної кислоти, аскорбінової кислоти, глюкуронової кислоти, вугільної кислоти, винної кислоти, бурштинової кислоти, оцтової кислоти чи фталевої кислоти; трис, трометаміну гідрохлорид чи фосфатні буфери. Кращими буферами для використання у композиціях за даним винаходом є солі органічної кислоти, такі як цитрат.

Додатково, композиції анти-ІЛ-6 антитіла за даним винаходом можуть включати полімерні ексципієнти/добавки, такі як полівінілпіролідони, фіколи (полімерний цукор), декстрати (наприклад, циклодекстрини, такі як 2-гідроксипропіл-β-циклодекстрин), поліетиленгліколи, смакові агенти, протимікробні агенти, аїдсолоджувачі, антиоксиданти, антистатики, поверхнево-активні речовини (наприклад, полісорбати, такі як "TWEEN 20" та "TWEEN 80"), ліпіди (наприклад, фосфоліпіди, жирні кислоти), стероїди (наприклад, холестерин) та хелатуючі агенти (наприклад, ЕДТА).

Ці та додаткові відомі фармацевтичні ексципієнти та/або добавки, придатні для використання у композиції анти-ІЛ-6 антитіла, його частини чи варіанта за винаходом є відомими фахівцям, наприклад, як описано у "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995), та у "Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), зміст яких є цілком включений сюди за посиланням. Кращими матеріалами носія чи ексципієнта є вуглеводні (наприклад, сахариди та альдити) і буфери (наприклад, цитрат) чи полімерні агенти.

Композиції лікарських засобів

Як було відзначено вище, винахід пропонує стабільні композиції лікарських засобів, які краще є фосфатним буфером з сольовим розчином чи вибраною сіллю, а також консервовані розчини та композиції, що містять консервант, а також багатоцільові консервовані композиції, придатні для фармацевтичного чи ветеринарного застосування, що включають щонайменше одне анти-ІЛ-6 антитіло у фармацевтично прийнятній композиції лікарського засобу. Консервовані композиції містять щонайменше один відомий консервант або, необов'язково, вибраний з групи, що складається з щонайменше одного фенолу, м-крезолу, п-крезолу, о-крезолу, хлоркрезолу, бензилового спирту, фенілмеркурнітри, феноксіетанол, формальдегід, хлорбутанол, хлорид магнію (наприклад, гексагідрат), алкілпарабен (метил, етил, пропіл, бутіл і т.п.), бензалконій хлорид, бензетоній хлорид, дегідратетат натрію та тимеросал чи їхні суміші у водному розріджувачі. Можуть бути використані будь-які придатні концентрації чи суміші, як відомо фахівцям, такі як 0,001-5%, чи будь-який інтервал значень чи значення в цих межах, таке як, без обмеження 0,001, 0,003, 0,005, 0,009, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, чи будь-який інтервал значень чи значення у цих межах. Необмежуючі приклади включають: без консерванта, 0,1-2% м-крезолу (наприклад, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,1-3% бензилового спирту (наприклад, 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5%), 0,001-0,5% тимеросалу (наприклад, 0,005, 0,01), 0,001-2,0% фенолу (наприклад, 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9, 1,0%), 0,0005-1,0% алкілпарабену(ів) (наприклад, 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9, 1,0%) і т.п.

Як відзначалося вище, винахід пропонує промисловий виріб, який включає пакувальний матеріал та щонайменше один флакон, що містить розчин щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла з призначеними буферами та/або консервантами, необов'язково, у водному розріджувачі, причому зазначений пакувальний матеріал включає ярлик, на чому вказано, що такий розчин може зберігатися протягом періоду 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 годин чи більше. Винахід далі включає промисловий виріб, який включає пакувальний матеріал, перший флакон, що містить ліофілізоване щонайменше одне анти-ІЛ-6 антитіло, та другий флакон, що містить водний розріджувач з призначеним буфером чи консервантом, у якому пакувальний матеріал включає ярлин, на якому вказано, що пацієнт повинен відновити щонайменше одне анти-ІЛ-6 антитіло у водному розріджувачі для одержання розчину, який може зберігатися протягом періоду двадцяти чотирьох годин чи більше.

Щонайменше одне анти-ІЛ-6 антитіло, що використовується згідно з даним винаходом, може бути продукowane з використанням рекомбінантних засобів, включаючи продукування з клітин ссавців чи трансгенних препаратів, або може бути виділене з інших біологічних джерел, як описано тут чи як відомо фахівцям.

Інтервал концентрацій щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла у продукті за даним винаходом включає значення після відновлення, для вологої/сухої системи, від близько 1,0мкг/мл до близько 1000мкг/мл, хоч нижчі та вищі концентрації також є придатними і залежать від передбачуваного носія, наприклад, композиції розчинів будуть відрізнятися від трансдермального пластиру, легеневого, трансмукозального чи осмотичного чи мікропомпового методів.

Краще, водний розріджувач необов'язково додатково включає фармацевтично прийнятний консервант. Кращі консерванти включають консерванти, вибрані з групи, що складається з фенолу, м-крезолу, п-крезолу, о-крезолу, хлоркрезолу, бензилового спирту, алкілпарабену (метил, етил, пропіл, бутіл і т.п.), бензалконій хлориду, бензетоній хлориду, дегідратетат натрію та тимеросал чи їхні суміші. Концентрація консерванта, що використовується у композиції, є концентрацією, достатньою для створення антимікробного ефекту. Такі концентрації залежать від вибраного консерванта і можуть бути легко визначені кваліфікованим фахівцем.

До розріджувача, необов'язково та краще, можуть бути додані інші ексципієнти, наприклад, агенти регулювання ізотонічності, буфери, антиоксиданти, посилювачі дії консерванта. Агент регулювання ізотонічності, такий як гліцерин, широко використовується у відомих концентраціях. Краще, додають фізіологічно стерпний буфер для забезпечення поліпшеного контролю рН. Композиції можуть мати рН в широкому інтервалі значень, такому як від приблизно рН 4 до приблизно рН 10, краще, в інтервалі від

приблизно рН 5 до приблизно рН 9, і найкраще, в інтервалі від приблизно 6,0 до приблизно 8,0. Краще, композиції за даним винаходом мають рН від приблизно 6,8 до приблизно 7,8. Кращі буфери включають фосфатні буфери, найкраще, фосфат натрію, зокрема, фосфатно-сольовий буфер (PBS).

Інші добавки, такі як фармацевтично прийнятні солюбілізатори, наприклад, Tween 20 (поліоксіетилен(20)-сорбітан монолаурат), Tween 40 (поліоксіетилен(20)-сорбітан монопальмітат), Tween 80 (поліоксіетилен(20)-сорбітан моноолеат), Pluronic F68 (блок-співполімери поліоксіетилену та поліохупропілен) та ПЕГ (поліетилеогліколь) чи неіонні поверхнево-активні речовини, такі як полісорбат 20 чи 80 або полксамер 184 чи 188, полііоли Pluronic®, інші блок-співполімери та хелатори, такі як ЕДТА та EGTA, можуть, необов'язково, бути додані до композицій чи фармацевтичних композицій для зменшення агрегації. Ці добавки є особливо корисними, якщо для введення композиції використовується помпа чи пластиковий контейнер. Присутність фармацевтично прийнятної поверхнево-активної речовини зменшує схильність протеїну до агрегації.

Композиції за даним винаходом можуть бути одержані у спосіб, який включає змішування щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла та консерванта, вибраного з групи, що складається з фенолу, м-крезолу, п-крезолу, о-крезолу, хлоркрезолу, бензилового спирту, алкілпарабену (метил, етил, пропіл, бутил і т.п.), бензалконій хлориду, бензетоній хлориду, дегідрацетату натрію та тимеросалу чи їхньої суміші у водному розріджувачі. Змішування щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла та консерванта у водному розріджувачі здійснюють з використанням звичайних процедур розчинення та змішування. Для виготовлення придатної композиції, наприклад, виміряну кількість щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла у буферному розчині об'єднують з бажаним консервантом у буферному розчині у кількостях, достатніх для забезпечення бажаних концентрацій протеїну та консерванта. Варіанти цього процесу зрозумілі пересічному фахівцю в цій області техніки. Наприклад, порядок введення компонентів, можливість використання додаткових добавок, температура та рН, при яких виготовляють композицію, є усі факторами, що можуть бути оптимізованими у залежності від концентрації та використовуваних засобів введення.

Композиції, що заявляються, можуть бути надані пацієнтам у вигляді прозорих розчинів чи як набори з двох флаконів, що включають флакон ліофілізованого щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла, яке відновлюють другим флаконом, що містить воду, консервант та/або ексципієнти, краще, фосфатний буфер та/або сольовий розчин і вибрану сіль, у водному розріджувачі. Як єдиний флакон з розчином, так і набір з двох флаконів, що потребує відновлення, можуть повторно використовуватися багато разів і можуть бути достатніми для проведення одного чи численних циклів лікування пацієнта і, таким чином, можуть забезпечити більш зручну схему лікування, ніж доступні зараз.

Промислові вироби, що заявляються в даному винаході, є придатними для введення від разового до такого, що триває двадцять чотири години чи більше. Згідно з цим, промислові вироби, що заявляються в даному винаході, пропонують значні переваги для пацієнта. Композиції за даним винаходом можуть, необов'язково, безпечно зберігатися при температурі від близько 2 до близько 40°C та зберігати біологічну активність протеїну протягом тривалого періоду часу, що дає змогу вказати на ярлику, що розчин може зберігатися та/або використовуватися протягом періоду 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 чи 96 годин або більше. Якщо використовується розріджувач із консервантом, то такий ярлик може вказувати термін придатності для використання до 1-12 місяців, половини, півтора та/або двох років.

Розчини щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла за винаходом можуть бути одержані у спосіб, який включає змішування щонайменше одного антитіла у водному розріджувачі. Змішування здійснюють з використанням звичайних -процедур розчинення та змішування. Для виготовлення придатного розріджувача, наприклад, виміряну кількість щонайменше одного антитіла у воді чи буфері об'єднують у кількості, достатній для забезпечення бажаної концентрації протеїну і, необов'язково, консерванта чи буфера. Варіанти цього процесу зрозумілі пересічному фахівцю в цій області техніки. Наприклад, порядок введення компонентів, можливість використання додаткових добавок, температура та рН, при яких виготовляють композицію, є усі факторами, що можуть бути оптимізованими у залежності від концентрації та використовуваних засобів введення.

Продукти, що заявляються в даному винаході, можуть бути надані пацієнтам у вигляді прозорих розчинів чи як набори з двох флаконів, що включають флакон ліофілізованого щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла, яке відновлюють другим флаконом, що містить водний розріджувач. Як єдиний флакон з розчином, так і набір з двох флаконів, що потребує відновлення, можуть бути повторно використані багато разів і можуть бути достатніми для проведення одного чи багатьох циклів лікування пацієнта і, таким чином, забезпечують більш зручну схему лікування, ніж доступні зараз.

Продукти, що заявляються, можуть бути надані пацієнтам опосередковано шляхом постачання аптекам, клінікам чи іншим подібним установам та організаціям, прозорих розчинів чи наборів з двох флаконів, що включають флакон ліофілізованого щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла, яке відновлюють другим флаконом, що містить водний розріджувач. Прозорий розчин у цьому випадку може мати об'єм до одного літра чи навіть більше і знаходитися у великому резервуарі, з якого менші порції розчину щонайменше одного антитіла можуть бути узяті один чи багато разів для перенесення до менших флаконів та надання аптекою чи клінікою їхнім клієнтам та/або пацієнтам.

Визнані пристрої, що включають ці системи з одним флаконом, включають такі пристрої типу шприц-ручка для доставки розчину, як BD Pens, BD Autojector®, Humaject®, NovoPen®, B-D®Pen, AutoPen® та OptiPen®, GenotropinPen®, Genotronorm Pen®, Humatro Pen®, Reco-Pen®, Roferon Pen®, Biojector®, iject®, J-tip Needle-Free Injector®, Intraject®, Medi-Ject®, наприклад, що виготовляються чи розроблені фірмою Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com), дивеіютс (Burgdorf, Switzerland, www.disetronic.com; Bioject, Portland, Oregon (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, www.mediject.com). Відомі пристрої, що включають систему з двома флаконами, включають такі системи шприц-ручка для відновлення ліофілізованого лікарського засобу у картриджі для доставки відновленого розчину, як HumatroPen®.

Продукти, що заявляються тут, включають пакувальний матеріал. Пакувальний матеріал, на додаток до

інформації, що вимагається регуляторними органами, визначає умови, при яких продукт може бути використаний. Пакувальний матеріал за даним винаходом включає інструкції для пацієнта стосовно відновлення щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла у водному розріджувачі для одержання розчину та використання цього розчину протягом періоду часу 2-24 години чи більше для продукту у двох флаконах, рідина/суха речовина. Для продукту у вигляді розчину в одному флаконі, ярлик вказує, що такий розчин може бути використаний протягом періоду часу 2-24 години чи більше. Продукти, що заявляються тут, є придатними для застосування як фармацевтичні продукти для людей.

Композиції за даним винаходом можуть бути одержані у спосіб, який включає змішування щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла та вибраного буфера, краще, фосфатного буфера, що містить сольовий розчин чи вибрану сіль. Змішування щонайменше одного антитіла та буфера у водному розріджувачі здійснюють з використанням звичайних процедур розчинення та змішування. Для виготовлення придатної композиції, наприклад, виміряну кількість щонайменше одного антитіла у воді чи буфер об'єднують з бажаним буферним агентом у воді у кількостях, достатніх для одержання бажаних концентрацій протеїну та буфера. Варіанти цього процесу зрозумілі для пересічного фахівця в цій області техніки. Наприклад, порядок введення компонентів, можливість використання додаткових добавок, температура та рН, при яких виготовляють композицію, є усі факторами, що можуть бути оптимізованими у залежності від концентрації та використовуваних засобів введення.

Стабільні композиції чи композиції з доданням консервантів, що заявляються, можуть бути надані пацієнтам у вигляді прозорих розчинів чи у наборі з двох флаконів, які включають флакон ліофілізованого щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла, яке відновлюють другим флаконом, що містить консервант чи буфер та ексципієнти у водному розріджувачі. Як єдиний флакон з розчином, так і набір з двох флаконів, що потребує відновлення, можуть бути придатними для багатократного повторного використання і можуть бути достатніми для здійснення одного чи численних циклів лікування пацієнта і, таким чином, забезпечують більш зручну схему лікування, ніж доступні зараз.

Щонайменше одне анти-ІЛ-6 антитіло у стабільних композиціях чи композиціях з доданням консервантів або розчинах, описаних тут, можуть бути введені пацієнту, згідно з даним винаходом, багатьма методами доставки, включаючи підшкірну (SC) чи внутрішньом'язову (IM) ін'єкцію; трансдермально, легенево, трансмукозально, за допомогою імплантату, осмотичної помпи, картриджа, мікропомпи чи інших засобів, відомих кваліфікованому фахівцю, як добре відомо фахівцям.

Терапевтичне застосування

ІЛ-6, завдяки своїй плейотропній активності, бере участь у патології різноманітних хвороб. Тому високоафінні нейтралізуючі химерні чи людські антитіла до ІЛ-6 були б бажаними для застосування при ІЛ-6-асоційованих захворюваннях, таких як рак, кахексія, системний червоний вовчак (SLE), ревматоїдний артрит, остеопороз, мозкова травма, набряк мозку, депресія та застійна серцева недостатність (CHF). cCLB8 чи будь-які похідні цього mAb, включаючи химерні чи гуманізовані, або фрагменти, можуть бути використані для полегшення болю у кістках, інгібування росту пухлин, таких як меланома, рак нирок, простати, молочної залози, легень, товстої кишки та множинна мієлома, лімфопроліферативні розлади та інші хвороби, у яких ІЛ-6 відіграє певну роль. Це антитіло може бути використане як єдиний агент або у комбінації з іншими терапевтичними агентами. Крім того, це mAb може бути використане як хемосенсибілізатор, причому воно може збільшувати терапевтичну ефективність цитотоксичних агентів. Це антитіло може бути використане як радіосенсибілізатор, причому воно може поліпшувати ефективність опромінювання. Воно може бути використане також у комбінації з іншими пухлина-імунomodуючими агентами, такими як ІЛ-2, ІЛ-12 та/або інтерферон (IFN) альфа.

Таким чином, даний винахід також пропонує спосіб модулювання чи лікування щонайменше однієї ІЛ-6-асоційованої хвороби клітини, тканини, органу, тварини чи пацієнта, як відомо фахівцям чи як описано тут, з використанням щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла за даним винаходом.

Відомо, що ІЛ-6 посилює проліферацію, диференціацію та виживаність злоякісних клітин плазми при множинній мієломі (ММ) за аутокринним чи паракринним механізмом, який включає інгібування апоптозу злоякісних клітин. ММ є невиліковним злоякісним розладом клітин плазми, при якому блокування ІЛ-6 вважається ефективною терапією (Anderson et al., Multiple Myeloma: New Insights and Therapeutic Approaches. Hematology: 147-165, 2000). ІЛ-6 також має канцерогенний ефект при карциномі базальних клітин, де клітини, трансфected ІЛ-6, виявляють збільшену швидкість росту пухлини внаслідок пригнічення апоптозу та активного промотування (Jee et al., Overexpression of interleukin-6 in human basal cell carcinoma cell lines increases anti-apoptotic activity and tumorigenic potency. Oncogene, Vol.20, No.2, pp.198-208, 2001). ІЛ-6 може також промотувати резистентність клітин раку молочної залози до хіміотерапії шляхом індукування експресії гена *mdr1* (шляхи *mdr1* та металотіонеїну) (Conze et al., Autocrine Production of Interleukin 6 Causes Multidrug Resistance in Breast Cancer Cells. Cancer Res. 61:8851-8858, 2001).

Здатність ІЛ-6 медіювати виживання пухлинних клітин та розвиток хвороби було підтверджено інгібуючою дією анти-ІЛ-6 mAb на ріст пухлин як *in vitro*, так і *in vivo*. Повідомлялося, що блокада ІЛ-6 може інгібувати ріст пухлини мозку людини (глоблостома) *in vitro* (Goswami et al., Interleukin-6-mediated autocrine growth promotion in human glioblastoma multiforme cell line U87MG. J. Neurochem. 71: 1837-1845, 1998). З використанням такого саме підходу було показано, що ін'єкція мишачого CLB8 анти-ІЛ-6 антитіла збільшувала тривалість виживання мишей з пухлиною людини (Mauray et al., Epstein-Barr virus-dependent lymphoproliferative disease: critical role of IL-6. Eur. J. Immunol; 30(7):2065-73, 2000). Повідомлялося також, що mCLB8 анти-ІЛ-6 антитіло приводило до регресії росту пухлини карциноми нирки людини та знижувало концентрації кальцію сироватки у голих мишей (Weisglass et al., The role of interleukin-6 in the induction of hypercalcemia in renal cell carcinoma transplanted into nude mice. Endocrinology 138(5):1879-8., 1995). Було також встановлено, що CLB-8 антитіло також спричинювало регресію ксенотрансплантатів гормонорезистентної пухлини простати людини у мишей (Smith et al. 2001). Анти-інтерлейкін-6 моноклональне антитіло індукує регресію ксенотрансплантатів раку простати людини у голих мишей (Smith and Keller, Prostate; 48(1):47-53).

ІЛ-6 може також бути прогностичним фактором та маркером злоякісних новоутворень. Повідомлялося, що при гіпернефродному раку нирок (RCC) високі рівні ІЛ-6 корелюють з метастазом пухлини і згодом призводять до поганого прогнозу та малого часу виживання (Jean-Yves Blay et al. 1992). Крім того, при RCC, підвищений ІЛ-6 сироватки асоційований з поганою реакцією на терапію ІЛ-2 (Fumagalli et al. 1999, Pretreatment serum markers and lymphocyte response to interleukin-2 therapy. Br. J. Cancer 80(3-4):407-11) та корелює зі ступенем ІЛ-2-асоційованої токсичності (Capuron et al. 2001, Association between immune activation and early depressive symptoms in cancer patients treated with interleukin-2-based therapy. Psychoneuroendocrinology; 26(8):797-808).

Підвищені рівні ІЛ-6 також корелюють з поганим прогнозом та наявністю метастазуючої пухлини при раку молочної залози (Kurebayashi, 2000, та Benoy, 2002, Regulation of interleukin-6 secretion from breast cancer cells and its clinical implications. Breast Cancer; 7(2): 124-9. Serum interleukin 6, plasma VEGF, serum VEGF, and VEGF platelet load in breast cancer patients. Clin. Breast Cancer; 2(4):311-5).

Було висунуто гіпотезу про те, що ІЛ-6 є причинним фактором у рак-асоційованій захворюваності, такий як астения/кахексія та резорбція кісток. Було знайдено, що пухлина-індукована кахексія (Cahlin. et. al. 2000) та резорбція кісток (наступна гіперкальціємія) (Sandhu et al. 1999) зменшуються у ІЛ-6-нокаут мишей. Рак-асоційована депресія та набряк мозку внаслідок пухлини мозку також були асоційовані з високими рівнями ІЛ-6 (Musselman et al. 2001). cCLB8 анти-ІЛ-6 антитіло за даним винаходом також інгібує у голих мишей кахексію, індуковану меланою людини та карциною простати людини.

Клінічний досвід використання анти-ІЛ-6 агентів

Було проведено кілька клінічних випробувань з використанням моноклональних антитіл проти ІЛ-6 при численних хворобах, включаючи плазмоклітинний лейкоз, множинну мієлому, В-лімфопроліферативний розлад, ревматоїдний артрит, рак нирок та СНІД-асоційовану лімфому.

Випробування фази I з ескалацією дози анти-ІЛ-6 cCLB-8 антитіла за даним винаходом при лікуванні резистентних пацієнтів з пізньою стадією множинної мієломи (N=12) продемонстрували, що у деяких пацієнтів спостерігалася стабілізація хвороби. Після припинення курсу лікування відбувалося прискорення зростання рівню М-протеїну, що дозволяє припустити реактивацію хвороби після припинення терапії. Анти-ІЛ-6 cCLB-8 антитіло інгібує вільно циркулюючий ІЛ-6. Дуже важливо, що не спостерігалася ніякої токсичності (за винятком транзиторної тромбоцитопенії у двох пацієнтів, які перед цим одержували великі дози ліків) чи алергічних реакцій. С-реактивний протеїн (CRP) знижувався нижче межі виявлення у всіх пацієнтів. Анти-ІЛ-6 cCLB-8 антитіло продемонструвало великий період напівжиття у кровотоці, який становив 17,8 днів, причому не спостерігалася ніякої імунної відповіді на людське анти-химерне антитіло (НАСА) (van Zaanen et al. 1998). Введення CNTO 328 не викликало змін кров'яного тиску, частоти серцевих скорочень, температури, гемоглобіну, функції печінки та функції нирок. За винятком транзиторної тромбоцитопенії у двох пацієнтів, які раніше одержували великі дози ліків, не спостерігалася ніякої токсичності чи алергічних реакцій і ніякої імунної відповіді на людське анти-химерне антитіло (БАСА). У трьох пацієнтів розвилися інфекція-асоційовані ускладнення під час терапії, однак ймовірність зв'язку з анти-ІЛ-6 cCLB-8 антитілом була низькою, тому що інфекційні ускладнення є звичайними на кінцевій стадії множинної мієломи і є важливою причиною смерті. Крім того, усі три пацієнти були здатними реагувати на свою інфекцію навіть у присутності анти-ІЛ-6 cCLB-8 антитіла, що дозволяє припустити, що анти-ІЛ-6 терапія не може блокувати ІЛ-6 під час інфекції. Не було повідомлень про асоційовані з лікуванням смертні випадки. Нарешті, результати цих досліджень дозволяють припустити, що анти-ІЛ-6 cCLB-8 антитіло було безпечним у пацієнтів з множинною мієломою.

Таким чином, даний винахід пропонує спосіб модулювання чи лікування щонайменше однієї злоякісної хвороби клітини, тканини, органу, тварини чи пацієнта, включаючи, без обмеження, щонайменше одну хворобу з: множинної мієломи, лейкомії, гострої лейкомії, гострої лімфобластичної лейкомії (ALL), В-клітинної, Т-клітинної чи FAB-ALL, гострої мієлоїдної лейкомії (A^{EL}), хронічної мієлоцитарної лейкомії (CML), хронічної лімфоцитарної лейкомії (CLL), лейкомічного ретикульозу, мієлодиспластичного синдрому (MDS), лімфоми, хвороби Ходжкіна, злоякісної лімфоми, не-ходжкінської лімфоми, лімфоми Беркітта, множинної мієломи, саркоми Капоші, колоректальної карциноми, гіпернефродного раку нирок, карциноми підшлункової залози, карциноми простати, носоглоткової карциноми, злоякісного гістіоцитозу, паранеопластичного синдрому/злоякісної гіперкальціємії, солідних пухлин, аденокарциноми, саркоми, злоякісної меланоми, гемангіоми, метастазуючої пухлини, рак-асоційованої резорбції кісток, рак-асоційованого болю у кістках; пригнічення метастазування раку; полегшення пухлинної кахексії; та лікування запальних хвороб, таких як мезангіопроліферативний гломерулонефрит і т.п. Такий спосіб може, необов'язково, бути використаний у комбінації з, шляхом введення раніше, одночасно чи після введення такого ІЛ-6 антитіла, проведення рентгенотерапії, введення антиангіогенного агента, хіміотерапевтичного агента, інгібітора фарнезилтрансферази і т.п.

Даний винахід також пропонує спосіб модулювання чи лікування щонайменше однієї ІЛ-6-медійованої імунно-асоційованої хвороби клітини, тканини, органу, тварини чи пацієнта, включаючи, без обмеження, щонайменше одну хворобу з ревматоїдного артриту, ювенільного ревматоїдного артриту, системного початку ювенільного ревматоїдного артриту, псоріатичного артриту, анкілозивного спондиліту, виразки шлунку, серонегативних артропатій, остеоартриту, запальної хвороби кишечника, виразкового коліту, системного червоного вовчака, антифосфоліпідного синдрому, іридоцикліту/uveїту/неврит зорового нерва, ідіопатичного легеневого фіброзу, системного васкуліту/гранулематозу вегенера, саркоїдозу, орхіту/процедур ревазектомії, алергічних/атопічних хвороб, астми, алергічного риніту, екземи, алергічного контактного дерматиту, алергічного кон'юнктивіту, гіперчутливого пневмоніту, трансплантатів, відторгнення трансплантованих органів, реакції «трансплантат проти хазяїна», синдрому системної запальної реакції, септичного синдрому, грампозитивного сепсису, грамнегативного сепсису, культура-негативного сепсису, грибкового сепсису, нейтропенічної лихоманки, уросепсису, менінгококемії, травми/кровотечі, опіків, опромінення іонізуючою радіацією, гострого панкреатиту, респіраторного дистрес-синдрому дорослих, ревматоїдного артриту, алкоголь-індукованого гепатиту, хронічних запальних патологій, саркоїдозу, хвороби Крона, серпоподібно-клітинної анемії, діабету, нефрозу, атопічних хвороб, алергічних реакцій, алергічного риніту, сінної лихоманки,

хронічного риніту, кон'юнктивіту, ендометріозу, астми, кропив'янки, системної анафілаксії, дерматиту, злоякісної анемії, гемолітичної хвороби, тромбоцитопенії, відторгнення трансплантату будь-якого органу чи тканини, відторгнення трансплантату нирок, відторгнення трансплантату серця, відторгнення трансплантату печінки, відторгнення трансплантату підшлункової залози, відторгнення трансплантату легень, відторгнення трансплантату кісткового мозку (ВМТ), відторгнення алотрансплантату шкіри, відторгнення трансплантату хряща, відторгнення кісткового трансплантату, відторгнення трансплантату малої кишки, відторгнення імплантату тимусу плоду, відторгнення трансплантату паразитовидної залози, відторгнення ксенотрансплантату будь-якого органу чи тканини, відторгнення алотрансплантату, анти-рецепторних алергічних реакцій, хвороби Грейвса, хвороби Рейно, інсулінрезистентного діабету типу В, астми, тяжкої псевдопаралітичної міастенії, антитіло-медіованої цитотоксичності, алергічних реакцій типу III, системного червоного вовчка, синдрому POEMS (синдром полінейропатії, спланхіомегалії, ендокринопатії, моноклональної гаммопатії та патології шкіри), полінейропатії, спланхіомегалії, ендокринопатії, моноклональної гаммопатії, синдрому зміни шкіри, антифосфоліпідного синдрому, пемфігусу, склеродерми, змішаної з'єднувально-тканинної хвороби, ідіопатичної Аддісонової хвороби, цукрового діабету, активного хронічного гепатиту, первинного біліарного цирозу, вітіліго, васкуліту, постінфарктного кардіотомічного синдрому, ріперчутливості типу IV, контактного дерматиту, гіперчутливого пневмоніту, відторгнення алотрансплантату, гранульом, спричинених внутрішньоклітинними організмами, чутливості до лікарських засобів, метаболічної/ідіопатичної хвороби Вілсона, гемахроматозу, альфа-1-антитрипсिनкової недостатності, діабетичної ретинопатії, тиреоїдиту Хашимото, остеопорозу, оцінки системи гіпоталамус-гіпофіз-надниркова залоза, первинного біліарного цирозу, тиреоїдиту, енцефаломієліту, кахексії, кістозного фіброзу, хронічної легеневої хвороби новонароджених, хронічної обструктивної легеневої хвороби (COPD), сімейного гематофагоцитарного лімфогістіоцитозу, дерматологічних станів, псоріазу, алопеції, нефротичного синдрому, нефриту, гломерулярного нефриту, гострої ниркової недостатності, гемодіалізу, уремії, токсичності, передекламсії, окт3- терапії, анти-cd3 терапії, цитокинової терапії, хіміотерапії, рентгенотерапії (наприклад, включаючи, без обмеження, астенію, анемію, кахексію і т.п.), хронічної саліцилатної інтоксикації, апное уві сні, ожиріння, серцевої недостатності, синуситу, запальної хвороби кишечника і т.п. Див., наприклад, the Merck Manual, 12th-17th Editions, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., eds., Second Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000), які усі цілком включені сюди за посиланням.

Даний винахід також пропонує спосіб модулювання чи лікування щонайменше однієї інфекційної хвороби клітини, тканини, органу, тварини чи пацієнта, включаючи, без обмеження, щонайменше одну хворобу з: гострої чи хронічної бактеріальної інфекції, гострого та хронічного паразитарного чи інфекційного процесу, включаючи бактеріальні, вірусні та грибові інфекції, ВІЛ-інфекції/ВІЛ-нейропатії, менінгіту, гепатиту (А, В чи С, і т.п.), септичного артрити, перитоніту, пневмонії, епіглотиту, E.coli 0157:h7, гемолітичного уремічного синдрому/тромболітичної тромбоцитопенічної пурпури, малярії, геморагічної лихоманки денге, лейшманіозу, прокази, синдрому токсичного шоку, стрептококкового міозиту, газової гангрені, мікобактеріального туберкульозу, внутрішньоклітинної інфекції мікобактеріями птахів, пневмоцистозної пневмонії кільогрудих птахів, запальної хвороби таза, орхіту/епідідиміту, легіонели, хвороби Дайма, грипу А, вірусу Епштейна-Барр, вітально-асоційованого гемафагоцитарного синдрому, вітального енцефаліту/асептичного менінгіту і т.п.

Будь-який з таких методів може, необов'язково, включати введення ефективної кількості щонайменше однієї композиції чи фармацевтичної композиції, яка включає щонайменше одне анти-ІЛ-6 антитіло, до клітини, тканини, органу, тварини чи пацієнта, що потребує такої модуляції, лікування чи терапії. Показання для лікування методом анти-ІЛ-6 терапії розкриті у таких посиланнях, що включені за посиланням до даної заявки: Van Snick, "Interleukin-6: An Overview", Ann. Rev. Immunol., 8:253-278 (1990); Campbell et al., "Essential Role for Interferon-gamma And Interleukin-6 in Autoimmune Insulin-Dependent Diabetes in NOD/Wehi Миші," J. Clin. Invest., 87:739-742 (1991); Heinrich et al., "Interleukin-6 Monoclonal Antibody Therapy for a Patient with Plasma Cell Leukemia," Blood, 78(5): 1198-1204 (1991); Starnes et al., "Anti-IL-6 Monoclonal Antibodies Protect Against Lethal Escherichia coli infection and Lethal Tumor Necrosis Factor-alpha. Challenge in Mice", J. Immunol., 145(12):4185-4191 (1990); Strassman et al., "Evidence for the Involvement of Interleukin 6 in Experimental Cancer Cachexia," J. Clin. Invest., 89:1681-1684(1992).

Будь-який спосіб за даним винаходом може включати введення ефективної кількості композиції чи фармацевтичної композиції, що включає щонайменше одне анти-ІЛ-6 антитіло, до клітини, тканини, органу, тварини чи пацієнта, що потребує такої модуляції, лікування чи терапії. Такий спосіб може, необов'язково, додатково включати спільне введення чи комбінаційну терапію для лікування таких імунних хвороб чи злоякісних хвороб, у яких введення зазначеного щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла, його визначеної ділянки чи варіанта, додатково включає введення, перед, одночасно та/або після, щонайменше одного засобу, вибраного з щонайменше одного антагоніста ФНП (наприклад, без обмеження, антитіло чи фрагмент ФНП, розчинний рецептор чи фрагмент ФНП, його злиті протеїни чи низькомолекулярний антагоніст ФНП), антитіла чи фрагмента ІЛ-18, низькомолекулярного антагоніста ІЛ-18 чи рецепторзв'язуючого протеїну ІЛ-18, антитіла чи фрагмента ІЛ-1 (включаючи як ІЛ-1 -альфа, так і ІЛ-1-бета), розчинного антагоніста рецептора ІЛ-1, протиревматичного засобу (наприклад, метотрексату, ауранофіну, ауротіоглюкози, азатіоприну, етанерцепту, тіомалату золота-натрію, гідроксихлорохінусульфату, лефлуноміду, сульфасалазину, рентгенотерапевтичного агента, антиангіогенного агента, хемотерапевтичного агента, талідоміду, міорелаксанту, наркотичного засобу, нестероїдного протизапального лікарського засобу (NSAID), анальгетика, анестетика, седативного засобу, місцевого анестетика, нейром'язового блокатора, протимікробного засобу (наприклад, аміноглікозиду, протигрибкового засобу, антипаразитарного засобу, антивірусного засобу, карбапенему, цефалоспорину, флуорохінолону, макроліді, пеніциліну, сульфонаміду, тетрацикліну, іншого протимікробного засобу), антипсоріатичного засобу, кортикостероїду, анаболічного стероїду, діабет-асоційованого агента, мінеральної речовини, аліментарного агента, тиреоїдного агента, вітаміну, кальцій-асоційованого гормону, еритропоетину (наприклад, епоетину-альфа), філграстиму (наприклад, G-CSF, Neupogen), сарграмостиму (GM-CSF, Leukine),

засобу для проведення імунізації, імуноглобуліну, імунодепресанта (наприклад, басиліксимабу, циклоспорину, даклізумабу), гормону росту, гормон замісного лікарського засобу, модулятора естрогенового рецептора, мідріатичного засобу, циклоплегічного засобу, алкілувального агента, антиметаболіту, інгібітора мітозу, радіофармацевтичного засобу, антидепресанта, протиманіакального агента, антипсихотичного засобу, анксиолітичного засобу, гіпнотичного засобу, симпатоміметіку, стимулятора, донепезилу, такрину, протиастматичного засобу, бета-агоніста, стероїдного засобу для інгаляції, інгібітора лейкотриєну, метилксантину, кромоліну, епінефрину чи аналога, дорназе-альфа (Pulmozyme), цитокіну чи цитокинового антагоніста. Придатні схеми дозування є добре відомими фахівцям. Див., наприклад, Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000), кожне з яких посилає цілком включене сюди за посиланням.

Антагоністи ФНП, придатні для композицій, комбінаційної терапії, спільного введення, пристроїв та/або способів за даним винаходом (які додатково включають щонайменше одне антитіло, його визначену ділянку та варіант, за даним винаходом), включають, без обмеження, анти-ФНП антитіла, їхні антигензв'язуючі фрагменти та рецепторні молекули, які специфічно зв'язуються з ФНП; сполуки, що попереджають та/або інгібують синтез ФНП, вивільнення ФНП чи його дію на цільові клітини, такі як талідомід, тенідап, інгібітори фосфодієстерази (наприклад, пентоксифілін та роліпрам), агоністи A2b-аденозинового рецептора та енхансери A2b-аденозинового рецептора; сполуки, що попереджають та/або інгібують передачу сигналів рецепторами ФНП, такі як інгібітори кінази мітоген-активованого протеїну (MAP); сполуки, що блокують та/або інгібують розщеплення мембрани ФНП, такі як інгібітори металопротеїнази; сполуки, що блокують та/або інгібують активність ФНП, такі як інгібітори ангіотензинперетворюючого ферменту (ACE) (наприклад, каптоприл); та сполуки, що блокують та/або інгібують продукування та/або синтез ФНП, такі як інгібітори кінази MAP.

Терапевтичне лікування

Будь-який спосіб за даним винаходом може включати спосіб лікування ІЛ-6-медійованого розладу, який включає введення ефективної кількості композиції чи фармацевтичної композиції, що включає щонайменше одне анти-ІЛ-6 антитіло, до клітини, тканини, органу, тварини чи пацієнта, що потребує такої модуляції, лікування чи терапії. Такий спосіб може, необов'язково, додатково включати спільне введення чи комбінаційну терапію для лікування таких імунних хвороб, у яких введення зазначеного щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла, його визначеної ділянки чи варіанта, додатково включає введення, перед, одночасно та/або після, щонайменше одного описаного вище агента.

Типово, лікування патологічних станів, яке проводять шляхом введення ефективної кількості чи дози щонайменше однієї композиції анти-ІЛ-6 антитіла, яка містить, у середньому, від щонайменше приблизно 0,01 до 500 міліграмів щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла на кілограм ваги пацієнта на дозу, краще, від щонайменше приблизно 0,1 до 100 міліграмів антитіла/кілограм ваги пацієнта на дозу для однократного чи багаторазового введення, у залежності від специфічної активності композиції. За альтернативним варіантом, ефективна концентрація у сироватці може включати концентрації у сироватці в інтервалі 0,1-5000мкг /мл на дозу для однократного чи багаторазового введення. Придатні схеми дозування відомі лікарям-практикам і будуть, звичайно, залежати від конкретного хворобливого стану, специфічної активності композиції, що вводиться, та конкретного пацієнта, що одержує лікування. У деяких випадках, для досягнення бажаної терапевтичної кількості, може бути необхідним здійснити повторне введення, тобто, повторні індивідуальні введення конкретної контрольованої чи відмірюваної дози, причому індивідуальні введення повторюють до досягнення бажаної денної дози чи ефекту.

Кращі дози можуть, необов'язково, включати 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 та/або 100-500мг/кг/введення, чи будь-який інтервал значень, значення чи частку, або до досягнення значення концентрації у сироватці 0,1, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5, 2,9, 3,0, 3,5, 3,9, 4,0, 4,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14,0, 14,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14, 14,5, 15, 15,5, 15,9, 16, 16,5, 16,9, 17, 17,5, 17,9, 18, 18,5, 18,9, 19, 19,5, 19,9, 20, 20,5, 20,9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, 4500 та/або 5000мкг/мл на однократне чи багаторазове введення, або будь-якого інтервала значень, значення чи частки.

За альтернативним варіантом, доза, що вводиться, може змінюватися у залежності від відомих факторів, таких як фармакодинамічні характеристики конкретного агента, способу та шляху його введення; віку, стану здоров'я та ваги пацієнта; природи та тяжкості симптомів, виду супутного лікування, частоти лікування та бажаного ефекту. Звичайно, доза активного інгредієнта може складати приблизно від 0,1 до 100 міліграмів на кілограм ваги тіла. Нормально, 0,1-50, краще, 0,1-10 міліграмів на кілограм на разове приймання чи у вигляді форми для уповільненого вивільнення будуть ефективною дозою для одержання бажаних результатів.

Як необмежуючий приклад, лікування людей чи тварин може проводитися шляхом однократного чи періодичного введення доз щонайменше одного антитіла за даним винаходом в інтервалі від 0,1 до 100мг/кг, таких як 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 чи 100мг/кг на добу, щонайменше в один з днів 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 чи 40, або, за альтернативним варіантом чи додатково, щонайменше однієї неділі з 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 чи 52, або, за альтернативним варіантом чи додатково, щонайменше одного з років 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 чи 20, чи будь-якої їхньої комбінації, з використанням

однократних чи кратних доз або інфузії.

Дозовані лікарські форми (композиції), придатні для внутрішнього введення, загалом містять від близько 0,1 міліграма до близько 500 міліграмів активного інгредієнта на разову дозу чи контейнер. В цих фармацевтичних композиціях активний інгредієнт звичайно присутній у кількості приблизно 0,5-99,999% мас. у розрахунку на загальну вагу композиції.

Парентеральні композиції та введення

Для парентерального введення можуть бути виготовлені композиції антитіла у формі розчину, суспензії, емульсії чи ліофілізованого порошку у поєднанні з фармацевтично прийнятним парентеральним носієм, чи з наданням такого носія окремо. Прикладами таких носіїв є вода, сольовий розчин, розчин Рінгера, розчин декстрози та 1-10% сироватковий альбумін людини. Можуть бути використані також ліпосоми та неводні носії, такі як жирні масла. Носій чи ліофілізований порошок може містити добавки, що підтримують ізотонічність (наприклад, хлорид натрію, маніт) та хімічну стабільність (наприклад, буфери та консерванти). Композицію стерилізують відомими чи придатними методами.

Придатні фармацевтичні носії описані у останньому виданні Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, що є стандартним довідковим джерелом у цій області техніки.

Композиції для парентерального введення можуть містити, як звичайні ексципієнти, стерильну воду чи сольовий розчин, поліалкіленгліколі, такі як поліетиленгліколь, масла рослинного походження, гідровані нафталіни і т.п. Водні чи масляні суспензії для ін'єкцій можуть бути одержані шляхом використання придатного емульгатора чи зволожувача та суспендувального агента, у відповідності до відомих методів. Агенти для ін'єкцій можуть бути нетоксичними розріджувачами, призначеними для не-орального введення, такими як водний розчин чи стерильний розчин для ін'єкцій чи суспензія у розчиннику, дозволено використання як застосовного носія чи розчинника води, розчину Рінгера, ізотонічного сольового розчину і т.д.; як звичайний розчинник чи суспендувальний розчинник може бути використане стерильне нелетке масло. Для цього можуть бути використані будь-яке нелетке масло та жирна кислота, включаючи природні чи синтетичні чи напівсинтетичні жирні масла чи жирні кислоти; природні чи синтетичні чи напівсинтетичні моно- чи ди- чи тригліцериди. Парентеральне введення є відомим фахівцям і включає, без обмеження, звичайні засоби для ін'єкцій, пристрій для ін'єкції тиском газу без голки, як описано у пат. США №5851198, та лазерний перфоруючий пристрій, як описано у пат. США №5839446, які цілком включені сюди за посиланням.

Альтернативні способи введення

Винахід далі стосується введення щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла засобами для парентерального, підшкірного, внутрішньом'язового, внутрішньовенового, інтраартикулярного, внутрішньобронхіального, внутрішньоочеревинного, внутрішньосуглобного, внутрішньохрящового, внутрішньопорожнинного, внутрішньомозочкового, інтрацеребровентрикулярного, внутрішньотовстокишкового, інтрацервікального, внутрішньошлункового, внутрішньопечінкового, інтраміокардіального, внутрішньокісткового, внутрішньотазового, інтраперикардіального, інтраперитонеального, інтраплеврального, внутрішньопростатичного, внутрішньолегенового, інтра ректального, внутрішньониркового, інтраретинального, інтраспінального, інтрасиновіального, інтраторакального, внутрішньоматкового, інтравезикулярного, болюсного, вагінального, ректального, букального, сублінгвального, інтраназального чи трансдермального введення. Може бути виготовлена композиція щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла для застосування шляхом парентерального (підшкірного, внутрішньом'язового чи внутрішньовенового) чи будь-якого іншого введення, зокрема, у формі рідких розчинів чи суспензій; для застосування шляхом вагінального чи ректального введення, зокрема, у напівтвердих формах, таких як, без обмеження, креми та супозиторії; для букального чи сублінгвального введення, така як, без обмеження, у формі таблеток чи капсул; або інтраназального введення, така як, без обмеження, у формі порошків, крапель в ніс чи аерозолі чи певні агенти; або трансдермального введення, така як, без обмеження, гель, рідка мазь, лосьйон, суспензія чи пластинна система доставки з хімічними енансерами, такими як диметилсульфоксид, для модифікації структури шкіри чи для підвищення концентрації лікарського засобу у трансдермальному пластирі (Junginger, et al. In "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., pp.59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994), яку цілком включено сюди за посиланням), чи з оксидувальними агентами, які дають змогу наносити на шкіру композиції; що містять протеїни та пептиди (WO 98/53847), чи із застосуванням електричних полів для створення тимчасових транспортних шляхів, таких як шляхом електропорації, чи для збільшення рухомості заряджених лікарських засобів крізь шкіру, таких як шляхом іонтофорезу, чи із застосуванням ультразвуку, тих як шляхом сонофорезу (пат. США №4309989 та 4767402) (вказані вище публікації та патенти цілком включені сюди за посиланням).

Легенево/назальне введення

Для легеневого введення, краще, композиція щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла вводиться із розміром частинок, ефективним для досягнення нижчих дихальних шляхів легень чи синусів. За винаходом, щонайменше одне анти-ІЛ-6 антитіло може бути введене за допомогою будь-якого з різноманітних засобів для інгаляції чи назального введення, відомих фахівцям, призначених для введення терапевтичного агента шляхом інгаляції. Такі пристрої є придатними для внесення композицій у формі аерозолі до порожнини синуса чи альвеол пацієнта, включають інгалятори для мірчих доз, розпилювачі, генератори сухого порошку, розбризкувачі і т.п. Інші пристрої, придатні для здійснення легеневого чи назального введення антитіла, також є відомими фахівцям. Усі такі пристрої можуть використовувати композиції, придатні для введення дозованої кількості антитіла у формі аерозолі. Такі аерозолі можуть складатися як з розчинів (як водних, так і неводних), так і з твердих частинок. Дозуючі інгалятори, такі як дозуючий інгалятор Ventolin®, типово використовують газ-пропелант і потребують приведення в дію при вдиханні (див., наприклад, WO 94/16970, WO 98/35888). Інгалятори для сухих порошків, такі як Turbuhaler™ (Astra), Rotahaler (Glaxo), Diskus® (Glaxo), інгалятор Spiros™ (Dura), Пристрої, що виробляються фірмою Inhale Therapeutics, та порошковий інгалятор Spinhaler® (Fisons), використовують приведення в дію змішаного порошку диханням (US 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons, цілком включені

сюди за посиланням). Розпилювачі, такі як AERx™ Aradigm, розпилювач Ultravent® (Mallinckrodt) та розпилювач Acorn II® (Marquest Medical Products) (US 5404871 Aradigm, WO 97/22376), де вказані джерела цілком включені сюди за посиланням, утворюють аерозолі з розчинів, у той час як інгалятори для мірчих доз, інгалятори для сухих порошоків і т.д. генерують аерозолі високодисперсних частинок. Ці конкретні приклади комерційно доступних пристроїв для інгаляції є типовими конкретними пристроями, придатними для використання у практиці даного винаходу, і не повинні обмежувати обсяг даного винаходу. Краще композиція, що включає щонайменше одне анти-ІЛ-6 антитіло, вводиться за допомогою інгалятора чи розпилювача для сухого порошку. Інгаляційний пристрій для введення щонайменше одного антитіла за даним винаходом має декілька бажаних ознак. Наприклад, введення за допомогою інгаляційного пристрою є переважно надійним, відтворюваним та точним. Інгаляційний пристрій може, необов'язково, вводити високодисперсні сухі частинки, розміром менше приблизно 10мкм, краще, приблизно 1-5мкм, для забезпечення придатності для вдихання.

Введення композицій ІЛ-6 антитіла у формі спрея

Спрей, що включає композицію протеїну ІЛ-6 антитіла, може бути одержаний шляхом примусового нагнітання суспензії чи розчину щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла крізь сопло під тиском. Розміри та конфігурація сопла, застосовний тиск та витрата рідини можуть бути вибрані для забезпечення бажаної швидкості подачі та розміру частинок. Може бути одержаний електроспрей, наприклад, шляхом використання електричного поля у поєднанні з, подачею, крізь капіляр чи сопло. Краще, частинки композиції щонайменше одного протеїну анти-ІЛ-6 антитіла подаються розбризкувачем, що має розмір частинок менш ніж приблизно 10мкм, краще, в інтервалі від приблизно 1мкм до приблизно 5мкм, і найкраще, від приблизно 2мкм до приблизно 3мкм.

Композиції щонайменше одного протеїну анти-ІЛ-6 антитіла, придатні для використання з розбризкувачем, типово включають композицію протеїну антитіла у водному розчині з концентрацією від близько 0,1мг до близько 100мг композиція щонайменше одного протеїну анти-ІЛ-6 антитіла на мл розчину чимг/г, чи в будь-якому інтервалі значень чи значенням у цих межах, наприклад, без обмежень, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 чи 100мг/мл чи мг/г. Композиція може включати агенти, такі як ексципієнт, буфер, агент регулювання ізотонічності, консервант, поверхнево-активна речовина, і, краще, цинк. Композиція може також включати ексципієнт чи агент для стабілізації композиції протеїну антитіла, такий як буфер, відновлювальний агент, протеїн чи вуглевод. Протеїни, придатні для використання при виготовленні композицій протеїнів антитіла, включають альбумін, протамін і т.п. Типові вуглеводи, придатні для використання при виготовленні композицій протеїнів антитіла, включають сахарозу, маніт, лактозу, трегалозу, глюкозу і т.п. Композиція протеїну антитіла може також включати поверхнево-активну речовину, яка може відновлювати чи запобігати поверхня-індукованої агрегації композиції протеїну антитіла, спричиненій атомізацією розчину при утворенні аерозолі. Можуть бути використані різні звичайні поверхнево-активні речовини, такі як складні ефіри поліоксіетілованих жирних кислот та спиртів, і складні ефіри поліоксіетиленсорбіту та жирних кислот. Їхні кількості будуть загалом знаходитися у межах від 0,001 до 14% мас. композиції. Особливо кращими поверхнево-активними речовинами у цілях даного винаходу є поліоксіетиленсорбітанмоноолеат, полісорбат 80, прлісорбат 20 і т.п. До композиції можуть також бути включені додаткові агенти, відомі фахівцям, для виготовлення композицій протеїну, такого як антитіла ІЛ-6 чи визначені ділянки чи варіанти.

Введення композиції антитіла ІЛ-6 за допомогою розпилювача

Композиція протеїну антитіла може бути введена за допомогою розпилювача, такого як струминний розпилювач чи ультразвуковий розпилювач. Типово, у струминному розпилювачі, джерело стисненого повітря використовується для створення високошвидкісного потоку повітря крізь отвір. При розширенні газу за межами сопла утворюється область низького тиску, яка всмоктує розчин композиції протеїну антитіла крізь капіляр, з'єднаний з резервуаром рідини, рідкий потік з капіляра розділяється на нестабільні волокна та краплини на виході з капіляра, утворюючи аерозоль. Може бути використаний ряд конфігурацій, значень витрати та типів перегородок для досягнення бажаних експлуатаційних характеристик для даного струминного розпилювача. В ультразвуковому розпилювачі, високочастотна електрична енергія використовується для перетворення на коливальну механічну енергію, типово за допомогою п'єзоелектричного перетворювача. Ця енергія передається композиції протеїну антитіла безпосередньо чи через передавальну рідину, з утворенням аерозолі, який включає композицію протеїну антитіла. Краще, частинки композиції протеїну антитіла, що вводяться за допомогою розпилювача, мають розмір частинок менш ніж приблизно 10мкм, краще, в інтервалі від приблизно 1мкм до приблизно 5мкм, і найкраще, від приблизно 2мкм до приблизно 3мкм.

Композиції щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла, придатні для використання у розпилювачі, будь то струминному чи ультразвуковому, типово мають концентрацію від приблизно 0,1мг до приблизно 100мг щонайменше одного протеїну анти-ІЛ-6 антитіла на мл розчину. Композиція може включати агенти, такі як ексципієнт, буфер, агент регулювання ізотонічності, консервант, поверхнево-активна речовина і, краще, цинк. Композиція може також включати ексципієнт чи агент стабілізації композиції щонайменше одного протеїну анти-ІЛ-6 антитіла, такий як буфер, відновлювальний агент, протеїн неспеціального призначення чи вуглевод. Протеїни, придатні для використання при виготовленні композицій щонайменше одного протеїну анти-ІЛ-6 антитіла включають альбумін, протамін і т.п. Типові вуглеводи, придатні для використання при виготовленні композицій щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла, включають сахарозу, маніт, лактозу, трегалозу, глюкозу і т.п. Композиція щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла може також включати поверхнево-активну речовину, яка може зменшувати чи попереджати поверхня-індуковану агрегацію щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла, спричинену атомізацією розчину при утворенні аерозолі. Можуть бути використані різні звичайні поверхнево-активні речовини, такі як поліоксіетілованих жирних кислот та спиртів і складні ефіри поліоксіетиленсорбіту та жирних кислот. Їхні кількості будуть загалом знаходитися в інтервалі від 0,001 до 4% мас. від композиції. Особливо кращими поверхнево-активними речовинами у цілях даного винаходу є поліоксіетиленсорбітанмоноолеат, полісорбат 80, полісорбат 20 і т.п. До композицій можуть бути включені

також додаткові агенти, відомі фахівцям, придатні для виготовлення композицій протеїну, такі як протеїн антитіла.

Введення композицій ІЛ-6 антитіла за допомогою інгалятора з мірчими дозами

В інгаляторі з мірчими дозами (MDI), пропелант, щонайменше одне анти-ІЛ-6 антитіло, та будь-які ексципієнти чи інші добавки знаходяться у контейнері у вигляді суміші, включаючи зріджений стиснений газ. Приведення в дію дозувального клапана вивільняє суміш у вигляді аерозолу, який, краще, містить з розмірами менш ніж приблизно 10мкм, краще, від приблизно 1мкм до приблизно 5мкм, і найкраще, від приблизно 2мкм до приблизно 3мкм. Бажаний розмір частинок аерозолу може бути одержаний шляхом використання композиції протеїну антитіла, виготовленої різними способами, відомими фахівцям в цій області техніки, включаючи помел у струминному млині, розпилювальне сушіння, конденсація у критичній точці і т.п. Кращі інгалятори з мірчими дозами включають пристрої, що виробляються фірмами 3М чи Glaxo і використовують флюорвуглеводневий пропелант.

Композиції щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла, призначені для використання в інгаляторі з мірчими дозами загалом включають тонкоподрібнений порошок, який містить щонайменше одне анти-ІЛ-6 антитіло у формі суспензії у неводному середовищі, наприклад, суспендоване у пропеланті за допомогою поверхнево-активної речовини. Пропелант може бути будь-яким звичайним матеріалом, що використовується з цією метою, таким як хлорфлюоркарбон, хлорфлюорвуглеводень, флюорвуглеводень чи вуглеводень, включаючи трихлорфлюорметан, дихлордифлюорметан, дихлортетрафлюоретанол та 1,1,1,2-тетрафлюоретан, HFA-134a (гідрофлюоралкан-134a), HFA-227 (гідрофлюоралкан-227) і т.п. Краще, пропелант є флюорвуглеводнем. Поверхнево-активна речовина може бути вибрана з метою стабілізації щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла як суспензії у пропеланті, для захисту активного агента від хімічної деградації і т.п. Придатні поверхнево-активні речовини включають сорбітантриолеат, соєвий лецитин, олеїнову кислоту і т.п. У деяких випадках кращими є аерозольні розчини з використанням розчинників, таких як етанол. До композицій, можуть бути включені також додаткові агенти, відомі фахівцям, придатні для виготовлення композицій протеїну, такі як протеїн.

Пересічному фахівцю в цій області техніки зрозуміло, що способи за даним винаходом можуть бути здійснені шляхом легеневого введення щонайменше однієї композиції анти-ІЛ-6 антитіла за допомогою не описаних тут пристроїв.

Оральні композиції та їхнє введення

Композиції для орального введення передбачають спільне введення ад'ювантів (наприклад, резорциноли та неіонні поверхнево-активні речовини, такі як простий поліоксетиленолельний ефір та простий н-гексадецилполіетиленовий ефір) для штучного збільшення проникності стінок кишечника, а також спільного введення інгібіторів ферментів (наприклад, інгібітори трипсину підшлункової залози, диізопропілфлюорфосфат (DFF) та тразилон) для інгібування ферментативного розкладання. Активна сполука у твердих дозованих лікарських формах для орального введення може бути змішана з щонайменше однією добавкою, включаючи сахарозу, лактозу, целюлозу, маніт, трегалозу, рафінозу, мальтит, декстран, крохмалі, агар, альгінати, хітини, хітозани, пектини, трагакантову камедь, гуміарабік, желатин, колаген, казеїн, альбумін, синтетичний чи напівсинтетичний полімер та гліцерид. Ці дозовані лікарські форми можуть також містити інший тип (типи) добавки, наприклад, неактивний розріджувальний агент, змачувальну речовину, таку як стеарат магнію, парабен, консервант, такий як сорбінова кислота, аскорбінова кислота, альфа-токоферол, антиоксидант, такий як цистеїн, розпушувальну речовину, зв'язуюче, загусник, буферний агент, підсолоджувач, смаковий агент, запашний агент і т.д.

Таблетки та пілюлі можуть бути далі оброблені для одержання ентросолюбільних препаратів. Рідкі препарати для орального введення включають прапарати емульсії, сиропу, еліксиру, суспензії та розчину, дозволені для медичного застосування. Ці препарати можуть містити неактивні розріджувальні агенти, що звичайно використовуються в цій галузі, наприклад, воду. Ліпосоми також були описані як системи доставки лікарських засобів для інсуліну та гепарину (пат. США №4239754). Останнім часом, для доставки фармацевтичних засобів використовуються мікросфери зі штучних полімерів змішаних амінокислот (протеїноїди) (пат. США №4925673). Крім того, для пероральної доставки, біологічно активних агентів використовуються сполуки-носії, описані у пат. США №5879681 та пат. США №5871753, як відомо фахівцям.

Мукозальні композиції та їхнє введення

Для всмоктування крізь поверхні слизової, композиції та способи введення щонайменше одного анти-ІЛ-6 антитіла включають емульсію, що складається з множини субмікронних частинок, мукоадгезивної макромолекули, біоактивного пептиду та безперервної водної фази, яка промотує всмоктування крізь поверхні слизової за рахунок забезпечення мукоадгезії частинок емульсії (пат. США №5514670). Поверхні слизової, придатні для нанесення емульсії за даним винаходом, можуть включати корнеальний, кон'юнктивальний, букальний, сублінгвальний, назальний, вагінальний, легeneвий, шлунковий, інтестинальний та ректальний шляхи введення. Композиції для вагінального чи ректального введення, наприклад супозиторії, можуть містити як ексципієнти, наприклад, полідікліленгліколі, вазелін, какаову олію і т.п. Композиції для інтраназального введення можуть бути твердими та містити, як ексципієнти, наприклад, лактозу, або можуть бути водними чи масляними розчинами крапель в ніс. Для букального введення ексципієнти включають цукри, стеарат кальцію, стеарат магнію, прежелатинований крохмаль і т.п. (пат. США № 5849695).

Трансдермальні композиції та їхнє введення

Для трансдермального введення, щонайменше одне анти-ІЛ-6 антитіло капсулюють у пристрої для доставки, такому як ліпосома чи полімерні наночастинки, мікрочастинки, мікрокапсули чи мікросфери (які колективно називаються мікрочастинки, якщо не вказано інше). Відомий ряд придатних пристроїв, включаючи мікрочастинки, виготовлені з синтетичних полімерів, таких як поліоксикислоти, такі як полімолочна кислота, полігліколева кислота та їхні співполімери, поліортоєфіри, поліангідриди та поліфосфазени, і природні полімери, такі як колаген, поліамінокислоти, альбумін та інші протеїни, альгінат та інші полісахариди і їхні комбінації (пат. США № 5814599).

Пролонговане введення та композиції

Інколи може бути бажаним вводити сполуки за даним винаходом суб'єкту протягом тривалих періодів часу, наприклад, протягом періодів від одного тижня до одного року з моменту однократного введення. Можуть бути використані різні дозовані лікарські форми для уповільненого введення, з використанням депо чи імплантатів. Наприклад, дозована лікарська форма може містити фармацевтично прийнятну нетоксичну сіль сполуки, що має низьку розчинність у рідинах організму, наприклад, (а) кислотно-адитивну сіль поліосновної кислоти, такої як фосфорна кислота, сірчана кислота, лимонна кислота, винна кислота, дубильна кислота, памоева кислота, альгінова кислота, поліглутамінова кислота, нафталінмоно- чи дисульфонова кислоти, полігалактуронова кислота і т.п.; (б) сіль з катіоном багатовалентного металу, такого як цинк, кальцій, вісмут, барій, магній, алюміній, купрум, кобальт, нікель, кадмій і т.п., чи з органічним катіоном, утвореним, наприклад, з N,N'-добензилетилендіаміну чи етилендіаміну; чи (с) комбінації (а) та (б), наприклад, цинкову сіль дубильної кислоти. Додатково, сполуки за даним винаходом або, краще, відносно нерозчинна сіль, така як щойно описані, можуть бути виготовлені як композиція гелю, наприклад, гелю моностеарату алюмінію з, наприклад, кунжутною олією, придатного для ін'єкції. Особливо кращими солями є солі цинку, тантани цинку, памоати і т.п. Інший тип композиції депо з уповільненим вивільненням для ін'єкції буде містити сполуку чи сіль, дисперговану для капсулювання у нетоксичному неантигенному полімері, що повільно деградує, такому як полімер полімолочної кислоти/полігліколевої кислоти, наприклад, як описано у пат. США №3773919. Сполуки чи, краще, відносно нерозчинні солі, такі як щойно описані вище, можуть також бути виготовлені як композиція у силікатових гранулах з холестериновою матрицею, особливо для застосування у тварин. Додаткові композиції з уповільненим вивільненням, депо чи імплантати, наприклад, газові чи рідкі ліпосоми, відомі з літератури (пат США №5770222 та "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978).

Скорочення

BSA - бичачий сироватковий альбумін

EIA – імуноферментний аналіз

FBS - сироватка плоду корови

H₂O₂ - перекис водню

HRP - пероксидаза хрому

Ig - імуноглобулін

IL-6 - інтерлейкін-6

IP - інтраперитонеально

IV - внутрішньовенно

Mab - моноклональне антитіло

OD - оптична густина

OPD - о-фенілєндіаміну дигідрохлорид

ПЕГ - поліетиленгліколь

PSA - пеніцилін, стрептоміцин, амфотерицин

RT - кімнатна температура

SC - підшкірно

v/v - об./об.

w/v - мас/об.

Приклад I: Генерування мишачого CLB8 Mab

Імунізація

Гібридома для одержання мишачого CLB-EL6-8 антитіла була отримана шляхом злиття, здійсненого у лабораторії Dr. Luden Aarden, Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Transfusion Service (CLB), як описано у (Brackenhoff et al., J. Immunol. (1990) 145: 561-568).

Самок мишей Balb/c у віці восьми тижнів, одержаних з лінії, визнаної CLB такою, що не містить патогенів, імунізували внутрішньом'язово (IM) 10мкг очищеного рекомбінантного інтерлейкіну-6 (rIL-6) (CLB), емульгованого у повному ад'юванті Фрейнда. Три наступні IM ін'єкції, кожна по 10мкг rIL-6 у неповному ад'юванті Фрейнда, здійснювали з інтервалами 4-8 тижнів.

Злиття клітин

Через чотири дні після останньої бустерної IM ін'єкції мишу умертвляли; селезінку видаляли та дрібно кришили. Готували суспензію окремих клітин у балансованому сольовому розчині Ігла при температурі навколишнього середовища. Клітини промивали та підраховували. Злиття здійснювали при співвідношенні 1:3 життєздатних клітин селезінки до клітин мишачої мієломи (SP2/0-Ag14) у присутності 42% (w/v) поліетиленгліколю у середовищі Дульбекко, модифікованому за Ісковим (IMDM). Використані для злиття клітини SP2/0, що не секретують Ig, були одержані з клітинного банку, створеного у CLB. Після злиття, клітини ресуспендують у IMDM з добавкою 5% сироватки плоду корови, 50мкМ пеніциліну/стрептоміцину, 5×10⁻⁵М 2-меркаптоетанолу (2-ME) та НАТ (6×10⁻⁴М гіпоксантину, 6,5×10⁻⁷М аміноптерину, 6,4×10⁻⁵М тимідину). Проліферація цим гібридом негайно після злиття є залежною від IL-6, тому до елективного середовища додають 100од./мл очищеного мишачого IL-6 (Van Smick, Brasseis). Злиті клітини потім розподіляють у 96-лункові планшети по 1×10⁵ клітин/лунку об'ємом 100 мікролітрів.

Первинна характеристика мишачих анти-IL-6 гібридом

Анти-IL-6-секретуючі гібриди вибирають за допомогою твердофазового імуноферментного аналізу (ELISA) та радіоімуноаналізу (RIA) (Brackenhoff et al. (1990) 145: 561-568).

Твердофазовий аналіз ELISA використовують для скринінгу моноклональних антитіл специфічних до людського IL-6. Очищений rIL-6 (0,5мкг/мл) наносять на поверхню протягом ночі при кімнатній температурі у фосфатно-сольовому буфері (PBS) у плоскодонних планшетах (Dynatech), 100мкл/лунку. Планшети промивають PBS, 0,02% (v/v) Tween 20 (PBS/Tween) та інкубують з розведеннями 1:2 супернатантів культури у PBS/Tween з добавкою 0,2% желатину (PTG) протягом 2 годин при температурі навколишнього середовища.

Після промивання, планшети інкубують з пероксидазою хрому, кон'югованою з моноклональним анти-мишачим каппа-легким ланцюгом 226 щура (Einstein University, NY) у PTG (2мкг/мл) протягом 1 години. Планшети промивають і зв'язану пероксидазу детектують за допомогою 100мкл/лунку 3,5,3,5-тетраметилбензидину/0,003% перекису водню у 0,1М ацетаті натрію, рН 5,5. Кольорову реакцію зупиняють за допомогою 2М H₂SO₄ і планшети зчитують на 450нм на пристрої для зчитування планшетів Titertek (Multiscan). Відбирають лунки, які мають позитивні значення OD.

Твердофазовий RIA також використовують для скринінгу анти-ІЛ-6 гібридом. Козячі анти-мишачі Іg антитіла зчеплюють з сефарозою, активованою ціаногенбромідом (X-4В (Pharmacia). Сефарозу промивають та ресуспендують при 10мг/мл у PBS, 0,1% Tween 20, 0,1% азиду натрію. Супернатанти гібридами додають до бусин сефарози у присутності приблизно 20000 імпульсів/хвилину ¹²⁵йод-ІЛ-6 (CLB) на 6 годин при постійному перемішуванні. Бусини промивають у великій кількості PBS/Tween та підраховують у гамма-лічильнику. Відбирають лунки, що мають найбільші значення специфічної активності.

Визначають гібридами, які дали позитивні результати в обох аналітичних системах, і двічі субклонують при обмеженому розведенні у IMDM з добавкою 2×10⁻⁵М 2-ME та 5% FBS (повний IMDM). Вибирають ІЛ-6-незалежний субклон CLB-ІЛ6-8 та утримують його у повному IMDM. Маточні культури мають негативні результати тестів на мікоплазму методом непрямого забарвлювання за Хехстом через 4 дні у культурі на цільових клітинах Vero76. Визначення ізо типу супернатанту за допомогою набору для визначення ізо типу мишачих моноклональних антитіл Innogenetics Line ImmunoAssay (INNO-LIA) виявило даний мишачий ізо тип ІgG₁-каппа. Це визначення ізо типу було підтверджено методом кількісного імуноферментного аналізу із захопленням антитіла.

Одержану у такий спосіб мишачу гібридому та клітинну лінію CLBIL-6/8 було названо CLB 8. Її було піддано хімеризації та подальшій характеристикації, як описано нижче.

Приклад 2: Хімеризація та секвенування

Клонування та експресія генів варіабельної ділянки cCLB8

Геномну ДНК виділяли з мишачої гібридомі C143A, що секретує мишаче моноклональне антитіло, специфічне по відношенню до ІЛ-6 людини.

Для легкого ланцюга ДНК гідролізують рестрикційною ендонуклеазою Hind III та піддають електрофорезу та 0,8% агарозному гелі. Вирізають частину гелю, що містить фрагменти ДНК довжиною приблизно 3,4 т.п.н., і ДНК елюють. Фрагменти лігують у vector8charon27 і упаковують у частинки бактеріофага.

Для важкого ланцюга ДНК гідролізують рестрикційною ендонуклеазою Eco RI та піддають електрофорезу на 0,8% агарозному гелі. Вирізають частину гелю, що містить фрагменти ДНК довжиною приблизно 3,6 т.п.н., і ДНК елюють. Фрагменти лігують у vector8gt10 і упаковують у частинки бактеріофага.

Бібліотеки бактеріофага важкого та легкого ланцюгів висівають на E.coli і вирощують протягом ночі. Бляшки переносять на нітроцелюлозні фільтри і зондують ³²P-міченими фрагментами ДНК, які відповідають мишачому J_κ (легкий ланцюг) чи мишачій послідовності J_H. Позитивні бляшки ідентифікують та очищають. Ізолюють фагову ДНК, виділяють вставки Hind III (легкий ланцюг) чи Eco RI (важкий ланцюг) і клонують до експресійних векторів імуноглобуліну.

Для котрансфекції клітин SP2/0 використовують експресійні плазміни важкого та легкого ланцюгів, і здійснюють селектування з використанням мікофенольної кислоти. Ідентифікують індивідуальні клони, що продукують химерне антитіло та субклонують їх для забезпечення моноклональності та одержання кращих продуцентів.

Антитіло, виділене очищенням з індивідуальних клітинних ліній, випробовують на здатність до нейтралізації методом проліферації ІЛ-6-залежних В9 клітин. Це антитіло у даній заявці називається химерним CLB8 чи cCLB8.

Варіабельна ділянка важкого ланцюга cCLB8

E V Q L V E S G G K L L K P G G S L K L
GAG GTG CAA CTG GTG GAA TCT GGA GGA AAA TTA CTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CT

S C A A S G F T F S S F A M S W F R Q S
TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TTT GCC ATG TCT TGG TTT CGC CAG TC

CDR 1

P E K R L E W V A E I S S G G S Y T Y Y
CCA GAG AAG AAG CTG GAG TGG GTC GCA GAA ATT AGT AGT GGT GGG AGT TAC ACC TAC TAT

CDR 2

P D T V T G R F T I S R D N A K N T L Y
CCT GAC ACT GTG ACG GGC CCA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC

L E M S S L R S E D T A M Y Y C A R Q L
CTG GAA ATG AGC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACG GCC ATG TAT TAT TGT GCA AGG GGT TTA

W G Y Y A L D Y W G Q G T S V T V S S
TGG GGG TAC TAT GCT CTT GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA

CDR 3

Варіабельна ділянка легкого ланцюга cCLB8

Q I V L I Q S P A I M S A S P G E K V T
CAA ATT GTT CTC ATA CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC

M T C S A S S S V S Y M Y W Y Q Q K P G
ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA

CDR 1

S S P R L L I Y D T S N L A E G V P V R

CEN 4/0

TCC TCC CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT
CGC

CDR 2

F S G S G S G T S Y S L T I S R M E A E
TTC AGT GCC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAG

D A A T Y Y C Q Q W S G Y P Y T F G G G
GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT GGT TAC CCA TAC ACG TTC GGA GGG GGG

CDR 3

T K L E I K

ACC AAG CTG GAA ATA AAA

Приклад 3. Вимірювання зв'язування cCLB8 з людським ІЛ-6 методом твердофазового імуноферментного аналізу

Твердофазовий імуноферментний аналіз був використаний для оцінки характеристик зв'язування cCLB8 Mab з людським ІЛ-6. Стилос на планшети наносили покриття рекомбінантного людського ІЛ-6 (RDI) при 1мкг/мл у PBS протягом ночі при 4°C. Після промивання у 0,15М сольовому розчині, що містить 0,02% (об./об.) Tween 20, лунки блокували 1% (мас/об.) BSA у PBS, 200мкл/лунку протягом 1 години при кімнатній температурі. Очищене антитіло інкубують з двократними серійними розведеннями від вихідної концентрації 5мкг/мл протягом 1 години при 37°C. Планшет промивають, а потім зондують 50мкл/лунку HRP-міченим козячим анти-людським IgG (Таго) при розведенні 1:20000 у 1% BSA-PBS протягом 1 години при кімнатній температурі. Планшет знов промивають і додають на 15 хвилин при кімнатній температурі 100мкл/лунку цитратно-фосфатного розчину субстрату (0,1М лимонна кислота та 0,2М фосфат натрію, 0,01% H₂O₂ і 1мг/мл OPD). Потім додають стоп-розчин (4Н сірчана кислота) у кількості 25мкл/лунку і вимірюють поглинання на 490нм за допомогою автоматичного фотометра для планшетів. Фігура 1 зображує результати вимірів зв'язування cCLB8 з ІЛ-6 як оптичну густину на 490нм, які показують, що cCLB8 зв'язується з рекомбінантним людським ІЛ-6 у концентрація-залежний спосіб.

Приклад 4. Аналізи нейтралізації in vitro

Блокада ІЛ-6 за допомогою cCLB8 інгібує секрецію IgM та MCP-1

Химерне моноклональне антитіло cCLB8 тестують за допомогою двох простих біоаналізів для визначення його нейтралізуючої біоактивності по відношенню до ІЛ6-індукованої секреції IgM людини та хемокину MCP-1. У цих дослідженнях використовують дві людські клітинні лінії. Клітинна лінія SKW6.4 була початково одержана з EBV-трансформованої В-клітинної лімфоми Беркитта і секретує розчинний IgM у відповідь на ІЛ6. Клітинна лінія U937 є монобластичною, комітованою до диференціації моноцитів і була початково одержана від пацієнта з дифузною гістіоцитарною лімфомою. Клітини U937 секретують MCP-1 у відповідь на ІЛ6. Оцінюють інгібування цих видів біоактивності за допомогою cCLB8, оскільки їх легко контролювати методами імуноферментного аналізу. Перед проведенням аналізу, клітини витримують протягом ночі на середовищі без сироватки, а потім культивують один наступний день з використанням ІЛ6 чи ІЛ6, преінкубованим з різними концентраціями антитіла чи негативним контролем антитіла. Наприкінці 72-годинного інкубування супернатанти збирають і використовують для проведення IgM-специфічного та MCP-1-специфічного імуноферментного аналізу. Результати, приведені на Фіг.2 та 3, демонструють, що cCLB8 суттєво інгібує DL6-медіовану секрецію IgM та MCP-1 in vitro.

В експерименті, представленому на Фіг.2, планшети для імуноферментного аналізу покривають фрагментом специфічного козячого анти-людського IgM Fc5μ у 10мМ карбонатному буфері, рН 9,6, протягом ночі при 4°C. Планшети промивають 0,15М сольовим розчином з добавкою 0,02% об./об. Tween 20 і блокують PBS / 1% мас/об. BSA протягом 1 години. Додають супернатант клітинної культури з серійними двократними розведеннями. Після інкубації та наступного промивання 0,02% Tween, 0,05М сольовим розчином, планшет зондують HRP-міченим козячим ланцюг-специфічним анти-людським IgMμ. Потім додають субстрат OPD і

після проявлення кольору вимірюють оптичну густину на 490nm. Дані показують, що cCLB8 інгібує секрецію IgM-мю, а ізотипично-схоже химерне mAb негативного контролю - ні.

В експерименті, представленому на Фіг.3, планшети для імуноферментного аналізу покривають козячим анти-людським MCP-1 у 10mM карбонатному буфері, pH 9,6, протягом ночі при 4°C. Планшети промивають 0,15M сольовим розчином з добавкою 0,02% об./об. Tween 20 та блокують PBS / 1% мас/об. BSA протягом 1 години. Додають супернатант клітинної культури з серійними двократними розведеннями. Після двогодинної інкубації та наступного промивання 0,02% Tween, 0,15M сольовим розчином, планшет зондують за допомогою біотинільованого анти-людського MCP-1 згідно з інструкціями виробника. Планшети знов промивають і додають HRP-мічений стрептавідін на 1 годину. Проявлення кольору здійснюють за допомогою субстрата TMB. Вимірюють оптичну густину на 450nm. Дані вказують, що cCLB8 інгібує IL-6-медійоване продукування MCP-1, а cK931 - ні.

Нейтралізація IL6-медійованого фосфорилування STAT3

Рецептор IL6 складається зі зв'язувальної субодиниці 80kD, IL6R α та субодиниці трансдукції сигналу gp130. IL6 зв'язується з субодиницею IL6R α і ініціює асоціацію IL6R α та gp130, що забезпечує високу афінність рецептора та трансдукцію сигналу. IL6R α існує також у розчинній формі. IL6 може зв'язуватися з розчинним IL6R (sIL6R), і цей комплекс може взаємодіяти з клітинами, що експресують gp130. Було показано, що IL6 активує STAT3. Клітинна лінія людського гострого моноцитарного лейкозу THP-1 була використана для того, щоб продемонструвати інгібування фосфорилування STAT3 за допомогою cCLB8. Клітини стимулюють (IL6 + sIL6R) +/- cCLB8 чи іррелевантним антитілом (K931), що використовується як негативний контроль. Клітинні лізати імунопреципітують анти-STAT3, зразки розділяють на 7,5% SDS-PAGE та переносять на мембрану Hybond-P, а потім піддають вестерн-блотингу з використанням анти-фосфотирозин-HRP. Для детектування використовують ECLplus.

Дані, представлені на Фігурі 4, показують, що cCLB8 може інгібувати фосфорилування STAT3, якщо йому а) дозволяють зв'язатися з rhIL6 перед додаванням sIL6R, б) дозволяють зв'язатися з sIL6R перед додаванням rhIL6, або в) якщо rhIL6 дозволяють зв'язатися з sIL6R перед додаванням cCLB8 та клітин. Клітини THP-1 інкубують у середовищі без сироватки протягом 16 год., зішкрібають з колб та ресуспендують у 0,5мл середовища. Доріжки 2-6: інкубують IL6 +/- антитіло протягом 15хв., потім додають sIL6R та інкубують протягом 15хв. Додають клітини та інкубують ще 15хв. Доріжка 7: IL6 інкубують з sIL6R протягом 15хв., потім додають CLB-IL6 та інкубують протягом 15хв. Додають клітини та інкубують ще 15хв. Зразки імунопреципітують за допомогою анти-STAT3 [1мкг/мл], ресуспендують у буфері для зразків Laemmli та розділяють на 7,5% SDS-PAGE і переносять на Hybond-P. Мембрану інкубують з анти-фосфотирозин-HRP.

cCLB8 інгібує продукування сироваткового амілоїду А

IL-1 β є сильним індуктором продукування сироваткового амілоїду А (SAA) клітинами гепатоми людини HepG2 у присутності людського IL-6 (Smith and McDonald, Clin. Exp. Immunol. 90:293-9 (1992)). Тому cCLB8 Mab випробовували на здатність інгібувати IL-1 β /IL-6-індуковане продукування SAA цими клітинами. Стисло, клітини HepG2 висівають у кількості $2,25 \times 10^5$ /лунку на 24 години. IL-6 (100нг/мл, RDI) та IL-6sR (200нг/мл, S & D) преінкубують протягом 30 хвилин та змішують з IL-1 β (1нг/мл, R&D). cCLB8 Mab та Mab негативного ізотипичного контролю (cSF25) серійно розводять, а потім преінкубують з вказаними вище сумішами протягом ще 30 хвилин.

Для експериментальних результатів, зображених на Фіг.5, серійні розведення cCLB8 чи cSF25 (ізотипично-схоже іррелевантне Mab) преінкубують з IL-6sR та IL-1 β , а потім культивують з клітинами HepG2 протягом 24 годин. Клітинний супернатант потім аналізують для визначення рівнів продукування сироваткового амілоїду А методом ELISA. (Human SAA ELISA kit, Biosource, проводять згідно з інструкціями виробника). Вуси похибки вказують стандартну середню похибку (SEM) для двох паралельних зразків. Дані на Фігурі 5 показують, що cCLB8 було здатним інгібувати IL-1 β /IL-6-індуковане продукування SAA клітинами HepG2 у доза-залежний спосіб.

Інгібування IL-6-індукованої проліферації клітин за допомогою cCLB8 Mab

Клітинну лінію мишачої В мієломи 7TD1 індукують до проліферації у присутності IL-6. Для того, щоб продемонструвати здатність cCLB8 Mab нейтралізувати активність IL-6, клітини інкубують при 37°C протягом 72 годин у IMDM, що містить 10% FBS та 0,5нг/мл рекомбінантного людського IL-6 (R&D Systems), та з серійними розведеннями cCLB8 Mab чи Mab 17-1A, що використовується як негативний контроль. Проліферацію клітин вимірюють методом люмінесцентного АТФ-аналізу (ATPLite, Packard Bioscience), який прямо корелює з кількістю клітин.

Дані, представлені на Фігурі 6, демонструють, що IL-6, дуже сильно стимулює проліферацію клітин 7TD1, а cCLB8 інгібує цю проліферацію клітин у концентрація-залежний спосіб при EC₅₀, що дорівнює 7,2нг/мл. Вуси похибки вказують стандартну середню похибку (SEM) для двох паралельних зразків. * позначає проліферацію клітин без IL-6.

Приклад 5: Картування епітопа

Епітопи кількох нейтралізуючих анти-IL-6 Mab, включаючи CLB8, характеризують шляхом зв'язування антитіла з людськими мутантними протеїнами IL-6, як описано (Brakenhoff, J. et al. (1990) J. Immunology 145: 561-568). Були одержані мутанти з аміно- та карбоксил-термінальними делеціями і панель антитіл до IL-6 аналізують за допомогою експериментів з конкурентного зв'язування антитіл. На основі досліджень конкурентного зв'язування, нейтралізуючі Mabs були розділені на 2 групи (I та II). В цьому методі, залишки, що входять до складу епітопа даного Mab, розрізняють за їхньою нездатністю розпізнавати відповідні варіанти антигенного протеїну із сайт-специфічними заміщеннями окремої амінокислоти. CLB8-IL-6/8 було картоване на Сайті I людської молекули IL-6, що складається з амінокислот Gln29-Leu34 у безпосередній близькості до карбоксильного кінця молекули. Подальші дослідження (Kalai, M, et al., Eur. J. Biochem. 249, 690-700 (1997)) показали, що CLB8-IL-6/8 розпізнає амінокислотні залишки, критичні для зв'язування IL-6 з IL-6R (gp80). Ці дослідження також показують, що його епітоп охоплює кінцеві ділянки АВ-петлі та D-спіралі молекули IL-6.

Приклад 6: Характеризація in vivo

Лікування анти-людським ІЛ-6 (сCLB8) та анти-мишачими ІЛ-6 мишачими Mabs уповільнює розвиток пухлини хакексії

Клітини меланоми людини (A375S2) інокулюють самкам голих мишей і того ж дня починають терапію Mab. Антитіла вводять інтраперитонеальною ін'єкцією з дозою 10мг/кг (2х/тиждень), а C57 (анти-CMV) використовують як контрольне mAb. Комбінація сCLB8 (анти-людський ІЛ-6) та MP520F3 (Mab до мишачого ІЛ-6, R&D Системи) була використана для створення комбінованої блокади, що істотно інгібує втрату ваги тваринами, які несуть пухлину меланоми людини, у порівнянні з контрольними тваринами, які одержують антитіло C57 (Фігура 7). Терапія антитілом не впливає на ріст пухлин чи на кінцеву вагу пухлини. Ці результати вказують на те, що ІЛ6 бере участь у пухлина-індукованій втраті ваги твариною, і що блокада ІЛ-6 може уповільнити розвиток пухлинної хакексії в цій моделі.

Фігура 7. Комбінована блокада людського та мишачого ІЛ6 (анти-ІЛ6 mAbs сCLB8 та MP520F3) приводить до істотного інгібування втрати ваги тваринами. Кориговані значення втрати ваги тваринами на осі Y дорівнюють величині (вага тварини - вага пухлини наприкінці досліджень) мінус вага тварини на початку досліджень. Кожна колонка є середнім для результатів від щонайменше 14 тварин/групу, а вуса похибки вказують стандартний відхил. Двосторонній аналіз за критерієм Ст'юдента показав, що група анти-ІЛ-6 істотно інгібувала втрату ваги тіла з $p=0,007$.

Приклад 7: Виміри афінності

Мікросхема датчика CM-5 (BIAcore 2000) (золота поверхня на мікросхемі, покрита матрицею карбоксиметилованого декстрану), HBS (10мМ HEPES з добавкою 0,15М NaCl, 3,4мМ EDTA та 0,05% поверхнево-активної речовини P20 при pH 7,4), амінізв'язуючі реагенти (Н-гідроксисукцинімід (NHS), Н-етил-N'-(3-метиламінопропіл)-карбодімід (EDC) та 1М етаноламін-HCl) були одержані від BIAcore і підготовлені до використання згідно з інструкціями виробника. Анти-людський Fc (Jackson AffiniPure козячий анти-людський IgG, FcD, Cat# 109-005-098, Lot#48646) був придбаний у Jackson ImmunoResearch.

Химерне моноклональне антитіло IgG CLB8 (Lot# PD1F03) у 5мл 0,15М хлориді натрію, 0,01М фосфаті натрію, pH 7,2, було вироблене фірмою Centocor. Реконбінантний людський ІЛ-6 (Lot# A1197111) був придбаний у R&D Systems.

Анти-людський Fc (1,8мг/мл) розводять до концентрації 50мг/мл у NaOAc буфері (10мМ, pH 4,8) та проводять реакцію зв'язування з матрицею карбоксиметилованого декстрану мікросхеми датчика CM-5 з використанням амінізв'язуючих реагентів виробника, як описано у посібнику з користування системою BIAcore. За допомогою мастера приготування поверхні, розрахованого на 10000 RU, карбоксильні групи на поверхнях датчика спочатку активують NHS/EDC, а потім додають анти-людський Fc. Решту активованих груп блокують ін'єкцією 1М етаноламіну. Реакцію зв'язування проводять окремо для кожної з проточних кювет. З використанням таких умов було підготовлено чотири поверхні проточних кювет, що мали 7554-9571 резонансні одиниці (RU) анти-людського Fc. У попередніх експериментах було визначено, що три ін'єкції (15мкл при 30мкл/хв.) 100мМ H_3PO_4 /0,05% CHAPS ефективно видаляють зв'язаний імуноглобулін при збереженні зв'язувальної здатності іммобілізованого анти-людського Fc.

Два експерименти були проведені на BIAcore 2000 при 25°C і витраті 30мкл/хв. сCLB8 розчиняють у HBS в кількості 5мг/мл. Аналіт ІЛ-6 розчиняють у HBS з концентраціями 0,25, 0,125, 0,062, 0,031 та 0,015мг/мл. Визначену кількість антитіла пропускають у потоці крізь відповідну проточну кювету, а потім вводять 30мкл кожної концентрації ІЛ-6 при витраті 30мкл/хв. (фаза асоціації) та безперервному потоці буфера протягом 800 секунд (фаза дисоціації). Поверхню мікросхеми регенерують трьома послідовними ін'єкціями по 15мкл 100мМ H_3PO_4 /0,05% CHAPS кожна. Ін'єкції HBS використовують як еталонні (холоста сенсограма) для віднімання коефіцієнтів заломлення середовища при аналізі. Здійснюють локальну апроксимацію з використанням моделі 1:1 у BIAanalysis 3.0 як для дисоціації (k_d , [s-1]), так і асоціації (k_a , [M-1s-1]) і розраховують константу дисоціації (K_D , [M]) (k_d/k_a).

Аналіз проводять з використанням BIAevaluation version 3.0. Кінетичні константи одержують з даних сенсограми шляхом апроксимації експериментальних кривих рівняннями швидкості, укладеними на основі моделей механізму взаємодії. Значення k_a , k_d , K_D були визначені шляхом глобального аналізу з використанням 1:1 моделі зв'язування з локальною апроксимацією R_{Umax} (табл. 1).

Таблиця 1

Виміри афінності для сCLB8 Mab за методом BIAcore

Зразок	$k_a(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})(\times 10^6)$	$k_d(\text{s}^{-1})(\times 10^{-5})$	$K_D(\text{M})(\times 10^{-11})$	χ^2
CCLB8	1,1	6,2	5,7	0,111
CCLB8	0,37	5,2	14	0,236

Приклад 8: Анти-ідіотип антитіла

Розробка ефективних систем аналізу (імуногістохімія та детектування сироватки) для сCLB8 потребує використання анти-ідіотипичних антитіл. Тому мишей Balb/c імунізують сCLB8 для одержання анти-ідіотипичних антитіл до сCLB8, які можуть бути використані як фармакокінетичні зонди для детектування сироватки та в імуногістохімічних аналізах.

Імунізація

П'ять мишей Balb/c (Charles River Laboratories) у віці 6-7 тижнів імунізують протягом періоду часу у 12 тижнів за допомогою сCLB8 (Centocor, PD1F03), який вводять в дозах 50мг IP та 25мг SC. Кожна миша одержує IP- та SC-ін'єкції. Ін'єкції роблять з інтервалами 2 тижня протягом періоду імунізації. Матеріал для IP ін'єкцій емульгують з рівним об'ємом ад'юванта Фрейнда (Sigma). Для першої IP ін'єкції використовують

повний ад'ювант Фрейнда у загальному об'ємі 200мкл. Наступні IP ін'єкції містять неповний ад'ювант Фрейнда. Матеріал, який вводять за допомогою SC-ін'єкцій, розводять у PBS та розподіляють між двома ділянками ін'єкції по 100мкл/ділянку. У мишей беруть кров в дні 0, 21, 47 та 77. Кров беруть у анестезованих мишей шляхом ретроорбітальної пункції, і відбирають сироватку для визначення титру cCLB8 методом твердофазового імуоферментного аналізу. Через три тижні після завершення протоколу імунізації, миша №1 одержує внутрішньовенно (IV) кінцеву бустерну ін'єкцію 100мкг cCLB8, розведеного у 125мкл PBS.

Генерування мишачих cCLB8 анти-ідіотипічних моноклональних антитіл

Одне злиття з використанням селезінки cCLB8 імунізованої Balb/c миші дало змогу ідентифікувати методом імуоферментного аналізу 7 анти-ід антитіл, специфічних по відношенню до cCLB8. Було показано, що 7 анти-ід антитіл не зв'язують інші мишачі/людські химерні антитіла, такі як C207A, C128A, C168J, C116J, C300A та C301A. Шість з семи антитіл належали до ізотипу IgG1k, а одне антитіло - до IgG2bk. Результати злиття представлені у таблиці 1. Слід відзначити, що максимальний титр сироватки 1:800 був одержаний у миші через 47 днів і залишався постійним протягом періоду імунізації.

Ізотипування

Визначення ізотипу антитіла здійснювали за допомогою набору для ізотипування мишачих моноклональних антитіл (Life Technologies) у форматі вимірювального зонду. Суміш буфера для розведення, супернатанта гібридоми та анти-мишачого кон'югата щура інкубують протягом ночі при кімнатній температурі при струшуванні у пробірках, що містять палички з попередньо нанесеним покриттям для захоплення різних ізотипів мишачих антитіл. Палички виймають з пробірок, обережно промивають у дистильованій H₂O та визначають ізотипи.

Таблиця 2

Властивості мишачих cCLB8 анти-ідіотипічних моноклональних антитіл

С-код	Ізотип
C433A	IgG1k
C434A	IgG1k
C435A	IgG1k
C436A	IgG1k
C437A	IgG1k
C438A	IgG1k
C439A	IgG1k

Аналізи інгібування сироватки

Визначають вплив пула нормальної людської сироватки (NHS) на здатність 7 анти-ід антитіл зв'язувати cCLB8. Двократні розведення анти-ід Mabs, починаючи з 50мкг/мл, інкубують у присутності 0%, 0,5%, 5% та 50% NHS протягом 30 хвилин при 37°C. Суміші переносять до планшетів, що мають покриття cCLB8, та інкубують протягом 30 хвилин при 37°C. Планшети промивають, а потім зондують козячим анти-мишачим IgG Fc*HRP. 0% та 0,5% NHS не перешкоджають зв'язуванню cCLB8 жодним з анти-ід Mabs. Три Mabs (C433A, C435A та C437A) виявляють часткове інгібування зв'язування при використанні 5% NHS. Всі, за винятком, C434A та C436A, зазнають істотного впливу при концентрації NHS 50% (Фіг.8 A-G).

Інгібування зв'язування cCLB8 з HuL-6 за допомогою анти-ід Mabs

Оцінюють здатність 7 анти-ід антитіл інгібувати зв'язування cCLB8 з HuL-6. Попередні дослідження з використанням методу імуоферментного аналізу показали, що cCLB8 дуже слабо зв'язується з планшетами, що мають покриття HuL-6. Два Mabs (C435A та C437A) при 6-25-кратному надлишку концентрацій демонстрували практично повне інгібування зв'язування cCLB8 з HuL-6. C434A виявляє інгібуючий ефект по відношенню до cCLB8 лише при 25-кратному надлишку. Двома кращими антитілами за показником інгібування зв'язування cCLB8 з HuL-6 були C436A та C439A. Ці два антитіла були здатними повністю інгібувати зв'язування cCLB8 в інтервалі надлишкових концентрацій від 3- до 25-кратного. C433A та C438A не виявляли інгібіторної активності (Фіг.9). Цей аналіз підтвердив результати, одержані у попередніх дослідженнях.

Анти-ід зв'язування з cCLB8, попередньо зв'язаним з HuL-6

Вивчають здатність 7 анти-ід антитіл до зв'язування cCLB8, попередньо зв'язаного з HuL-6. cCLB8 у концентрації 10мкг/мл інкубують на планшетах HuL-6 протягом 30 хвилин при 37°C. Планшети промивають, а потім інкубують з трикратними розведеннями анти-ід Mabs, починаючи з 10мкг/мл, протягом 30 хвилин при 37°C. Планшети промивають, а потім зондують козячим анти-мишачим IgG Fc*HRP. Як і в попередніх дослідженнях, C436A та C438A були єдиними антитілами, здатними зв'язувати cCLB8, попередньо зв'язаний з HuL-6.

Фігура 10 ілюструє зв'язувальну здатність 7 анти-ід антитіл по відношенню до cCLB8, попередньо зв'язаного з HuL-6.

Загалом, в результаті злиття клітин мишачої мієломи та клітин селезінки мишей Balb/c, імунізованих химерним анти-людським ІЛ-6 антитілом (cCLB8), були продуктовані сім анти-ідіотипічних антитіл. П'ять з анти-ід антитіл (C434A, C435A, C436A, C437A та C439A) були здатні блокувати зв'язування cCLB8 з HuL-6. Два антитіла (C436A та C438A) мали здатність до зв'язування cCLB8, попередньо зв'язаного з HuL-6, а для двох антитіл (C434A та C436A) зв'язування cCLB8 було практично незалежним від будь-яких випробуваних концентрацій NHS. Широкий профіль зв'язування для цих cCLB8 анти-ідіотипічних антитіл робить деякі з них потенційними кандидатами для використання як фармакокінетичні зонди для детектування сироватки та імуногістохімічного аналізу.

Слід розуміти, що винахід може бути здійснений інакше, ніж конкретно описано у наведеному вище описі

та прикладах.

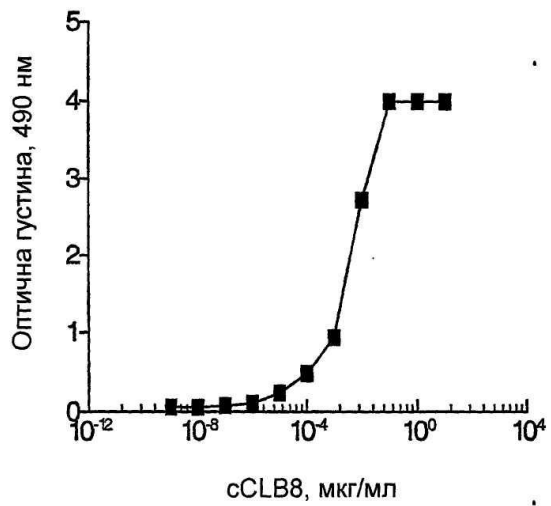
Численні модифікації та варіанти даного винаходу є можливими у світлі наведеного вище опису і, тому, входять до обсягу формули винаходу, що додається.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

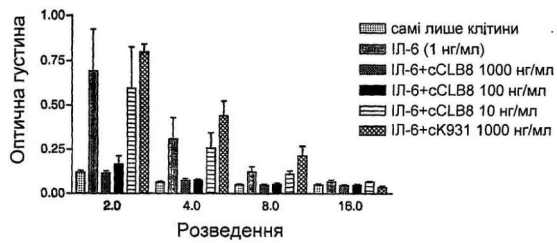
```
<110> Centocor Inc.  
Giles-Komar, Jill  
Tripathi, Mohit  
Peritt, David  
Knight, David M  
  
<120> Анти-IL-6 антитіла, композиції, способи та використання  
  
<130> CEN0270  
  
<140> 60/332743  
<141> 2001-11-14  
  
<150> 60/332743  
<151> 2001-11-14  
  
<160> 16  
  
<170> PatentIn version 3.1  
  
<210> 1  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 1  
Ser Phe Ala Met Ser  
1 5  
  
  
<210> 2  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 2  
Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr  
1 5 10 15  
  
Gly  
  
  
<210> 3  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 3  
Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr  
1 5 10  
  
  
<210> 4  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 4  
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr  
1 5 10  
  
  
<210> 5  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 5  
Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5  
  
  
<210> 6  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 6  
Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr  
1 5  
  
  
<210> 7  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Mus musculus  
  
<400> 7  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Lys Leu Leu Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
  
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe  
20 25 30  
  
Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ser Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
  
Ala Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val  
50 55 60  
  
Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80
```

Leu	Glu	Met	Ser	85	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Cys	90	Thr	Ala	Met	Tyr	Cys	95
Ala	Arg	Gly	Leu	Trp	Gly	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100					
Thr	Ser	Val	Thr	Val	Ser	Ser										115					
<210> 8 <211> 106 <212> PRT <213> Mus musculus <400> 8																					
Gln	Ile	Val	Leu	Ile	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala	Ser	Pro	Gly	1	5	10	15		
Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	20	25	30			
Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Ser	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	35	40	45			
Asp	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Val	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	50	55	60			
Gly	Ser	Gly	Thr	Ser	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Met	Glu	Ala	Glu	65	70	75	80		
Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Trp	Ser	Gly	Tyr	Pro	Tyr	Thr	85	90	95			
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys 100 105																					
<210> 9 <211> 15 <212> DHK <213> Mus musculus <400> 9 agcttttgcca tgtct																					
<210> 10																					
<211> 51 <212> DHK <213> Mus musculus <400> 10 gaaattagta gtggtggagg ttacacctac tatctgaca ctgtgacggg c																					
<210> 11 <211> 30 <212> DHK <213> Mus musculus <400> 11 ggtttatggg ggtcatctagc tcttgactac																					
<210> 12 <211> 30 <212> DHK <213> Mus musculus <400> 12 agtgccagct caagtgtgaag ttacatgtac																					
<210> 13 <211> 21 <212> DHK <213> Mus musculus <400> 13 gacacatcca acctggcttc t																					
<210> 14 <211> 27 <212> DHK <213> Mus musculus <400> 14 cagcagtggg gtggtttacc atacacg																					
<210> 15 <211> 357 <212> DHK <213> Mus musculus <400> 15 ggggtgcaac tgggtggaat tggaggaaaa ttactgaagc ctggagggtc cctgaaactc																					
tctgtgtcag cctctggaat caecttcagt agcttttgcca tgtcttgggt togccagtct																					
ccagagaaga ggcctggagtg ggtgcagaaa attagtagtg ttgggaggtta cactactact																					
ctgcagactg tgacgggccg attaccattc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac																					
ctggaaatga cgcagctcag gtctcaggac acggccatgt attattgtgc aagggggtta																					
tgggggtact atgtctctga ctactggggt caaggaaact cagtcacagt ctcctca																					
<210> 16 <211> 318 <212> DHK <213> Mus musculus <400> 16 caaatgtctc tcatcagtc tccagcaatc atgtctgcac ctccagggga gaaggtcacc																					
atgacctgca gtgccagctc aagtgaagt tacatgtact ggtaccagaa gaagccagga																					
tctctcccca gactctgat ttatgacaca tccaaactgg ctctctggagt cctgtttgc																					
ttcagtgcca ttgggtctcg gactctttac ttcttcacaa tcagccgaat ggaggtcagc																					
gatctgcaca cttattactg ccagcagctgg agtggtttacc catacacggt cggagggggg																					
accgaactgg aaataaaa																					

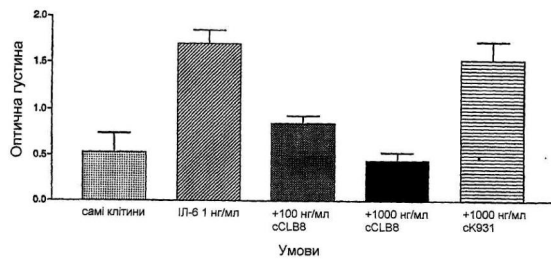
Зв'язування cCLB8 з ІЛ-6 людини



ФІГ. 1

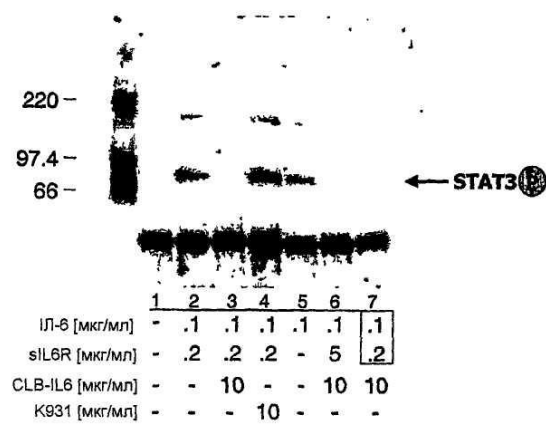


ФІГ. 2



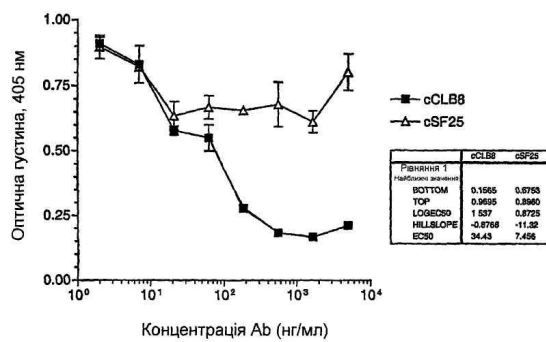
ФІГ. 3

cCLB8 інгібує передачу сигналів ІЛ-6 у THP-1



ФІГ. 4

Інгібування за допомогою cCLB8 ІЛ-6-індукованого
продукування сироваткового амілоїду А клітинами НерG2

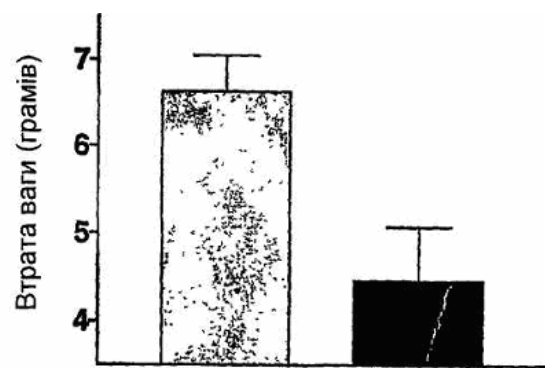


ФІГ. 5

Нейтралізація за допомогою cCLB8
rhIL-6-індукованої проліферації клітин

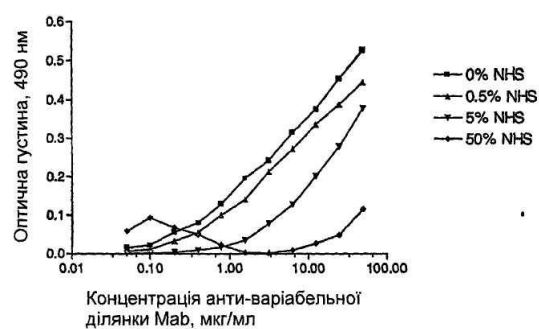


ФІГ. 6

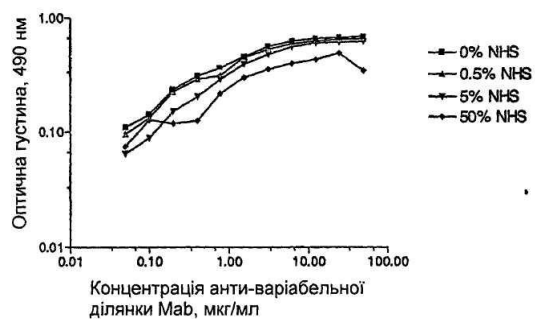


ФІГ. 7

A. C433A

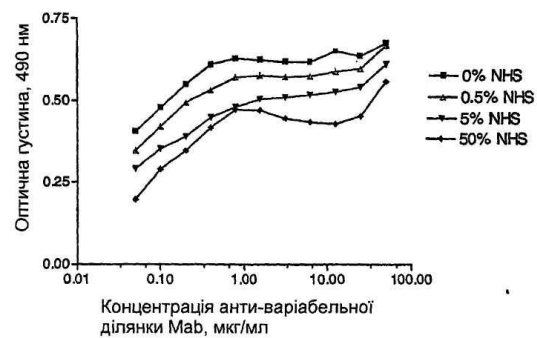


B. C434A

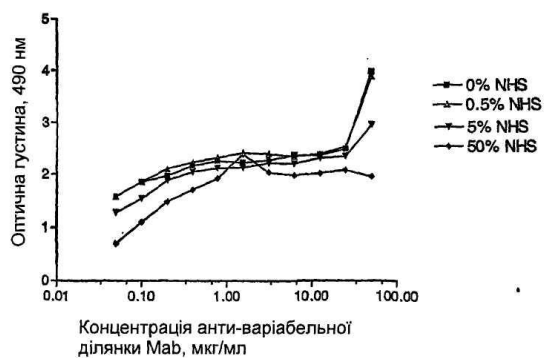


ФІГ. 8

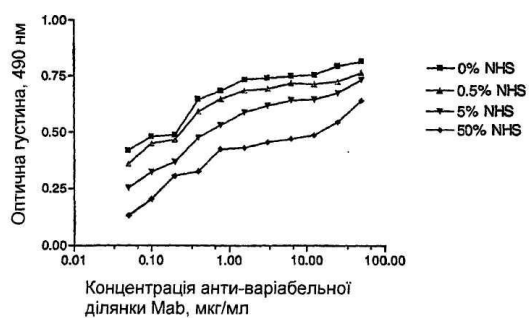
C. C435A



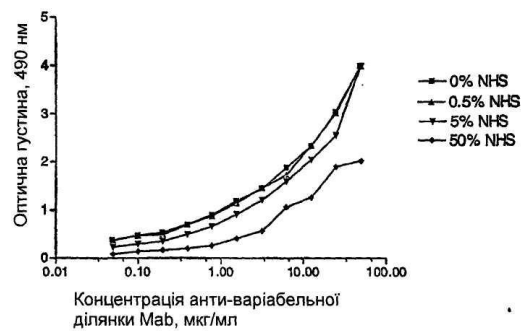
D. C436A



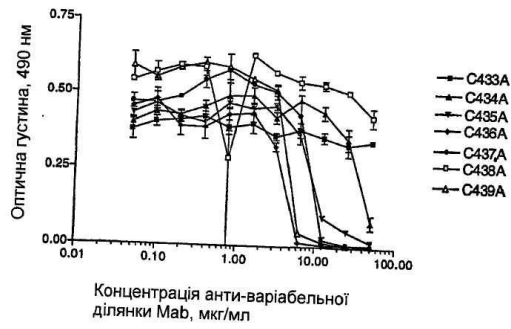
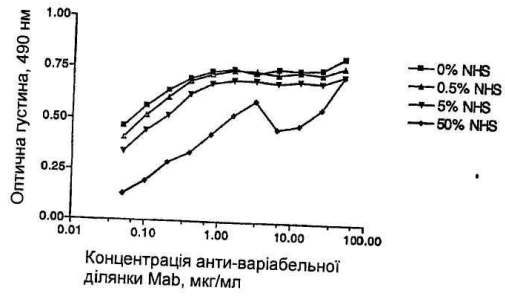
E. C437A



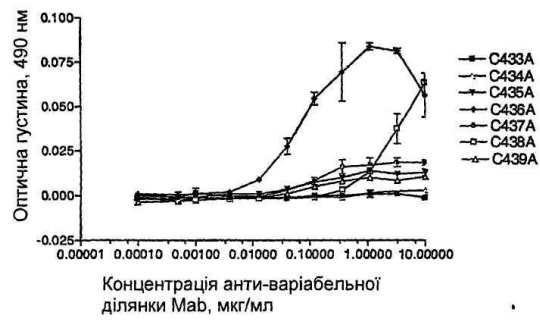
F. C438A



G. C439A



ФІГ. 9



ФІГ. 10