

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391602 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.09.15

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.11.29

(54) ИНГИБИТОР ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ФИБРОЗА

(31) PCT/JP2020/044406

(32) 2020.11.30

(33) JP

(86) PCT/JP2021/043543

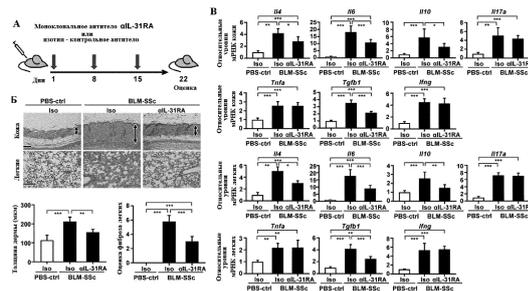
(87) WO 2022/114165 2022.06.02

(71) Заявитель:
МАРУХО КО., ЛТД.; ДЗЕ
ЮНИВЕРСИТИ ОФ ТОКИО (JP)

(72) Изобретатель:
Ёсидзаки Аюми, Кудзуми Ай, Сато
Синити, Фудзита Томоюки, Ватанабе
Хидеки (JP)

(74) Представитель:
Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) В одном варианте осуществления изобретение по настоящей заявке относится к фармацевтическим композициям для подавления прогрессирования фиброза при системном склерозе, которые содержат антитело против рецептора A IL-31 в качестве активного ингредиента. В другом варианте осуществления настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям для подавления поляризации Th2 для подавления прогрессирования фиброза при системном склерозе, которые содержат антитело против рецептора A IL-31 в качестве активного ингредиента. В определенном варианте осуществления настоящего изобретения вышеуказанное антитело представляет собой антитело, обладающее нейтрализующей активностью в отношении рецептора A IL-31.



A1

202391602

202391602

A1

ИНГИБИТОР ПРОГРЕССИРОВАНИЯ ФИБРОЗА

5 Настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитело против рецептора А IL-31 в качестве активного ингредиента. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к агентам для подавления прогрессирования фиброза при системном склерозе, которые содержат антитело против рецептора А IL-31 в качестве
10 активного ингредиента. В одном варианте осуществления настоящее изобретение относится к агентам подавления поляризации Th2 для подавления прогрессирования фиброза при системном склерозе, которые содержат антитело против рецептора А IL-31 в качестве активного ингредиента.

Предшествующий уровень техники

15 Системный склероз (СС) представляет собой заболевание соединительной ткани, характеризующееся избыточным отложением внеклеточного матрикса, такого как коллаген, в коже и внутренних органах (непатентная литература (НПЛ) 1 и 2). Фиброз, возникающий в результате чрезмерного отложения, приводит к дисфункции тканей и органной недостаточности, что может быть
20 изнурительным и опасным для жизни пациентов. Хотя патогенез СС до сих пор остается неизвестным, в него в значительной степени вовлечены три аномалии — аутоиммунная реакция, ангиопатия и фиброз. Активация и поляризация (ошибка, предвзятость) Т-клеток широко изучались как у пациентов, так и на животных моделях с СС (НПЛ 3). Например, было показано, что CD4+ Т-клетки
25 инфильтрируют пораженную кожу на ранней стадии СС (НПЛ 4). Такие инфильтрирующиеся Т-клетки демонстрируют высокую экспрессию маркеров активации (НПЛ 5). Кроме того, также показано, что Т-клетки в периферической крови активированы (НПЛ 6). Также обнаружено, что активированные CD4+ Т-клетки при СС преимущественно смещены в сторону Т-хелперов (Th) 2 (НПЛ 3 и
30 7). Действительно, основные цитокины Th2 (цитокины, продуцируемые клетками Th2), такие как интерлейкин (IL)-4, IL-6 и IL-13, сверхэкспрессируются в коже и сыворотке пациентов с СС (НПЛ 8-11). Сообщают, что цитокины Th2 также связаны с фиброзом кожи и легких у

5 модельных мышей с индуцированным блеомицином СС (BLM-SSc), известной моделью животных, подобной SSc (НПЛ 12-13). Механистически эти цитокины Th2 непосредственно индуцируют выработку коллагена в фибробластах (НПЛ 14-16). Более того, IL-4 и IL-6 управляют дифференцировкой наивных CD4+ Т-клеток в клетки Th2, тем самым закрепляя Th2 и профибротические ответы (НПЛ 17-18). В совокупности эти исследования показывают, что доминирование Th2 является ключевым иммунологическим признаком СС, который способствует развитию фиброзу.

10 Факторы, связь которых с Th2-доминантными заболеваниями была предложена, включают IL-31, цитокин Th2 семейства IL-6, в дополнение к IL-4, IL-6 и IL-13. Конкретно, было показано, что IL-31 экспрессируется на высоком уровне при Th2-доминантных заболеваниях, таких как аллергическая астма, атопический дерматит и кожная Т-клеточная лимфома (НПЛ 19-24). В контексте СС сообщалось, что экспрессия IL-31 увеличивается в фиброзных легких мышей BLM-SSc (НПЛ 25).

15 Чрезмерная выработка внеклеточных матриц, таких как вырабатываемый фибробластами коллаген, и их избыточное отложение известны как кардинальные патологические признаки СС, что приводит к прогрессирующему фиброзу кожи и внутренних органов (НПЛ 26). Имеется несколько сообщений об исследованиях роли IL-31 в избыточной выработке и избыточном отложении коллагена и/или подобных веществ при СС, но недавние сообщения показали, что стимуляция IL-31 способствует выработке коллагена кожными фибробластами у здоровых людей (НПЛ 27 и 28). Однако в этих сообщениях стимуляция IL-31 не увеличивала выработку коллагена в кожных фибробластах у пациентов с СС. Таким образом, роль IL-31 в фиброзе до сих пор не ясна. Также нет никаких сообщений, подтверждающих, что введение антитела к рецептору А анти-IL-31 может подавлять прогрессирование фиброза.

Цитируемая непатентная литература

30 [НПЛ 1] Gabrielli A, Avvedimento EV, Krieg T. Scleroderma. *N Engl J Med* 2009; 360: 1989-2003.

[НПЛ 2] Yoshizaki A. Pathogenic roles of B lymphocytes in systemic sclerosis. *Immunol Lett* 2018; 195: 76-82.

[HIII 3] O'Reilly S, Hogle T, van Laar JM. T cells in systemic sclerosis: a reappraisal. *Rheumatology* (Oxford) 2012; 51: 1540-9.

[HIII 4] Roumm AD, Whiteside TL, Medsger TA, c coавт. Lymphocytes in the skin of patients with progressive systemic sclerosis. Quantification, subtyping, and clinical correlations. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 645-53.

[HIII 5] Kalogerou A, Gelou E, Mountantonakis S, c coавт. Early T cell activation in the skin from patients with systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 2005; 64: 1233-5.

[HIII 6] Fiocco U, Rosada M, Cozzi L, c coавт. Early phenotypic activation of circulating helper memory T cells in scleroderma: correlation with disease activity. *Ann Rheum Dis* 1993; 52: 272-7.

[HIII 7] Barron L, Wynn TA. Fibrosis is regulated by Th2 and Th17 responses and by dynamic interactions between fibroblasts and macrophages. *Am J Gastrointest Liver Physiol* 2011; 300: G723-8.

[HIII 8] Sato S, Hasegawa M, Takehara K. Serum levels of interleukin-6 and interleukin-10 correlate with total skin thickness score in patients with systemic sclerosis. *J Dermatol Sci* 2001; 27: 140-6.

[HIII 9] Hasegawa M, Fujimoto M, Kikuchi K, c coавт. Elevated serum levels of interleukin 4 (IL-4), IL-10, and IL-13 in patients with systemic sclerosis. *J Rheumatol* 1997; 24: 328-32.

[HIII 10] Salmon-Ehr V, Serpier H, Nawrocki B, c coавт. Expression of interleukin-4 in scleroderma skin specimens and scleroderma fibroblast cultures. Potential role in fibrosis. *Arch Dermatol* 1996; 132: 802-6.

[HIII 11] Koch AE, Kronfeld-Harrington LB, Szekanecz Z, c coавт. In situ expression of cytokines and cellular adhesion molecules in the skin of patients with systemic sclerosis. *Pathobiology* 1993; 61: 239-46.

[HIII 12] Yoshizaki A, Yanaba K, Iwata Y, c coавт. Cell Adhesion Molecules Regulate Fibrotic Process via Th1/Th2/Th17 Cell Balance in a Bleomycin-Induced Scleroderma Model. *J Immunol* 2010; 185: 2502-15.

[HIII 13] Yamamoto T, Takagawa S, Katayama I, c coавт. Animal model of sclerotic skin. I: Local injections of bleomycin induce sclerotic skin mimicking scleroderma. *J Invest Dermatol* 1999; 112: 456-62.

[HIII 14] Postlethwaite AE, Holness MA, Katai H, c coавт. Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *J Clin Invest* 1992; 90: 1479-85.

5 [HIII 15] O'Reilly S, Ciechomska M, Cant R, c coавт. Interleukin-6 (IL-6) trans signaling drives a STAT3-dependent pathway that leads to hyperactive transforming growth factor- β (TGF- β) signaling promoting SMAD3 activation and fibrosis via Gremlin protein. *J Biol Chem* 2014;289:9952-60.

10 [HIII 16] Lee CG, Homer RJ, Zhu Z, c coавт. Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor β 1. *J Exp Med* 2001; 194: 809-21.

[HIII 17] Kopf M, Le GG, Bachmann M, c coавт. Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. *Nature* 1993; 362: 245-8.

[HIII 18] Rincon M, Anguita J, Nakamura T, c coавт. Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T cells. *J Exp Med* 1997; 185: 461-9.

15 [HIII 19] Lei Z, Liu G, Huang Q, c coавт. SCF and IL-31 rather than IL-17 and BAFF are potential indicators in patients with allergic asthma. *Allergy* 2008; 63: 327-32.

[HIII 20] Lai T, Wu D, Li W, c coавт. Interleukin-31 expression and relation to disease severity in human asthma. *Sci Rep* 2016; 6: 22835.

20 [HIII 21] Neis MM, Peters B, Dreuw A, c coавт. Enhanced expression levels of IL-31 correlate with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 118: 930-7.

[HIII 22] Raap U, Wichmann K, Bruder M, c coавт. Correlation of IL-31 serum levels with severity of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 421-3.

25 [HIII 23] Ohmatsu H, Sugaya M, Suga H, c coавт. Serum IL-31 levels are increased in patients with cutaneous T-cell lymphoma. *Acta Derm Venereol* 2012; 92: 282-3.

[HIII 24] Nattkemper LA, Martinez-Escala ME, Gelman AB, c coавт. Cutaneous T-cell Lymphoma and Pruritus: The Expression of IL-31 and its Receptors in the Skin. *Acta Derm Venereol* 2016; 96: 894-8.

30 [HIII 25] Shi K, Jiang J, Ma T, c coавт. Pathogenesis pathways of idiopathic pulmonary fibrosis in bleomycin-induced lung injury model in mice. *Respir Physiol Neurobiol* 2014;190:113-7.

[НПЛ 26] Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa A, с соавт. The specific free radical scavenger edaravone suppresses fibrosis in the bleomycin-induced and tight skin mouse models of systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 3086-97.

5 [НПЛ 27] Yaseen B, Lopez H, Taki Z, с соавт. Interleukin-31 promotes pathogenic mechanisms underlying skin and lung fibrosis in scleroderma. *Rheumatology (Oxford)*. [Epub ahead of print: 4 May 2020].

[НПЛ 28] Taki Z, Gostjeva E, Thilly W, с соавт. Pathogenic Activation of Mesenchy

Краткое описание изобретения

10 Техническая проблема

Настоящее изобретение было создано с учетом вышеупомянутых обстоятельств. В одном варианте осуществления настоящего изобретения целью является создание новых средств для подавления прогрессирования фиброза. В другом варианте осуществления настоящего изобретения цель изобретения состоит в том, чтобы предоставить новые средства для подавления поляризации Th2, другой ключевой характеристики прогрессирования фиброза при системном склерозе.

Решение проблемы

20 В результате специального исследования авторы настоящего изобретения обнаружили, что введение антитела, блокирующего рецептор А анти-IL-31, животным с моделью системного склероза, подавляет прогрессирование фиброза. Кроме того, авторы настоящего изобретения обнаружили, что введение антитела против рецептора А анти-IL-31 подавляет поляризацию Т-клеток Th2.

25 Настоящее описание основано на этих выводах и, в частности, включает варианты осуществления, описанные ниже в качестве примеров.

[A1] Средство для подавления прогрессирования фиброза при системном склерозе, содержащее антитело против рецептора А IL-31 в качестве активного ингредиента.

30 [A2] Средство для подавления прогрессирования фиброза согласно пункту [A1], которое подавляет поляризацию Th2.

[A3] Средство для подавления прогрессирования фиброза согласно пункту [A1] или [A2], где антитело представляет собой антитело, обладающее нейтрализующей активностью в отношении рецептора IL-31 А.

[A4] Средство для подавления прогрессирующего фиброза согласно любому из пунктов с [A1] по [A3], в котором антитело характеризуется следующим образом:

(1) антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, а также переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

(2) антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; или

(3) антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

[B1] Средство для подавления поляризации Th2, которое содержит антитело против рецептора А IL-31 в качестве активного ингредиента и подавляет прогрессирующее фиброза при системном склерозе.

[B2] Средство для подавления поляризации Th2 в соответствии с пунктом [B1], в котором антитело представляет собой антитело, обладающее нейтрализующей активностью в отношении рецептора А IL-31.

[D1] Фармацевтическая композиция для подавления прогрессирующего фиброза при системном склерозе, содержащая антитело против рецептора А IL-31 в качестве активного ингредиента.

[D2] Фармацевтическая композиция для подавления поляризации Th2, содержащая антитело против рецептора А IL-31 в качестве активного ингредиента, предназначена для подавления прогрессирующего фиброза при системном склерозе.

[D3] Фармацевтическая композиция согласно пунктам [D1] или [D2], в которых антитело представляет собой антитело, обладающее нейтрализующей активностью в отношении рецептора А IL-31.

[E1] Способ подавления прогрессирующего фиброза при системном склерозе, включающий введение антитела против рецептора А IL-31.

[E2] Способ подавления поляризации Th2 для подавления прогрессирующего фиброза при системном склерозе, включающий введение антитела против рецептора А IL-31.

[E3] Способ согласно пунктам [E1] или [E2], где антитело представляет собой антитело, обладающее нейтрализующей активностью в отношении рецептора А IL-31.

[F1] Антитело против рецептора А IL-31 для подавления прогрессирующего фиброза при системном склерозе.

[F2] Антитело против рецептора А IL-31 для применения при подавлении поляризации Th2 для подавления прогрессирующего фиброза при системном склерозе.

[F3] Антитело согласно пунктам [F1] или [F2], где антитело представляет собой антитело, обладающее нейтрализующей активностью в отношении рецептора А IL-31.

[G1] Применение антитела против рецептора А IL-31 при получении средства для подавления прогрессирующего фиброза при системном склерозе.

[G2] Применение антитела против рецептора А IL-31 при получении агента, подавляющего поляризацию Th2, для подавления прогрессирующего фиброза при системном склерозе.

[G3] Применение согласно пунктам [G1] или [G2], где антитело представляет собой антитело, обладающее нейтрализующей активностью в отношении рецептора А IL-31.

25 Краткое описание фигур

Фигура 1. Анти-IL-31RA антитело ослабляет прогрессирование фиброза, индуцированного у мышей BLM-SSc. (А) BLM-SSc и ФСБ-обработанные контрольные (ФСБ-контроль) мыши (n = 5 в каждой группе) получали антитело против мышинового IL-31RA (α IL-31RA) или контрольный изотип IgG (Iso) в дни 1, 8 и 15; для оценки результата животных умерщвляли на 22-й день. (Б) Толщину дермы и оценку фиброза легких определяют с использованием гистологических срезов, полученных от каждой мыши. Были показаны репрезентативные гистологические срезы кожи и легких, окрашенные

гематоксилином и эозином (горизонтальные шкалы = 100 мкм). Вертикальные полосы со стрелками обозначают толщину дермы. (В) Экспрессию мРНК IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF- α , TGF- β 1 и IFN- γ в коже и легких этих мышей оценивали с помощью ПЦР реального времени. Гистограммы показывают среднее значение + стандартное отклонение. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$.

Фигура 2. Анти-IL-31RA антитело ослабляет поляризацию Th2 у мышей BLM-SSc. (А) Процентное содержание Th1, Th2, Th17 и клеток Treg в селезенке у мышей BLM-SSc и мышей, обработанных ФСБ (ФСБ-контроль), которым вводили антитело анти-IL-31RA мыши (α IL-31RA) или контрольный изотип IgG (Iso), анализируют с помощью проточной цитометрии. После гейтирования спленоцитов в популяциях CD3+ клетки IFN- γ +CD4+ идентифицируют как клетки Th1, клетки IL-4+CD4+ как клетки Th2 и клетки IL-17A+CD4+ как клетки Th17. Среди клеток, гейтированных по популяциям CD3+CD4+, клетки CD25+Foxp3+ рассматривают как клетки Treg. Гистограммы показывают среднее значение + стандартное отклонение. (Б) Уровни IL-4 и IL-6 в сыворотке оценивают с помощью специфических анализов ELISA. Символы представляют отдельных мышей. Горизонтальные линии представляют средние значения. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ и *** $p < 0,001$.

Описание вариантов осуществления настоящего изобретения

В одном варианте осуществления настоящее изобретение предусматривает фармацевтическую композицию для подавления прогрессирования фиброза при системном склерозе и фармацевтическую композицию для подавления поляризации Th2 для подавления прогрессирования фиброза при системном склерозе (в настоящем изобретении также называемую средством для подавления прогрессирования фиброза при системном склерозе и средство, подавляющее поляризацию Th2, для подавления прогрессирования фиброза при системном склерозе, соответственно), которые содержат антитело против рецептора A IL-31 в качестве активного ингредиента.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может подавлять прогрессирование фиброза при системном склерозе. Например, она может подавлять прогрессирование склероза и/или прогрессирование фиброза в коже и внутренних органах (например, в легких). В одном из вариантов осуществления

настоящего изобретения фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может подавлять поляризацию Th2 при системном склерозе. Например, она может подавлять выработку цитокинов Th2 при системном склерозе и/или прогрессирование доминантного состояния Th2 при системном склерозе.

Патологическая аномалия, при которой возникает фиброз, называется «фиброзной болезнью». В зависимости от ткани, в которой возникает фиброз, его называют фиброзом кожи, фиброзом легких, фиброзом печени и т.п. При «системном склерозе (СС)» этот фиброз возникает в коже и внутренних органах.

Известно, что CD4+ Т-клетки играют важную роль в развитии СС и инфильтрируются в поражения кожи на ранней стадии СС. Известно, что CD4+ Т-клетки имеют подтипы, такие как клетки Th1, клетки Th2, клетки Th17, регуляторные Т-клетки (Treg). Известно, что каждый подтип имеет свой характерный паттерн секреции цитокинов. В частности, клетки Th1 и клетки Th2 поддерживают гомеостаз живого организма, регулируя функции друг друга, и сохраняя их сбалансированными. Полагают, что когда этот баланс (баланс Th1/Th2) смещается в сторону любого подтипа, возникают заболевания, специфичные для каждого подтипа. Сдвиг баланса Th1/Th2 в сторону доминирования Th1 называется «поляризацией Th1», а сдвиг в сторону доминирования Th2 называется «поляризацией Th2». Утверждают, что в развитии заболевания участвует не только дисбаланс между клетками Th1 и Th2, но и дисбаланс между подтипами CD4+ Т-клеток, включая клетки Th17 и Treg. Между тем, «поляризация Th2» также может быть выражена как «смещение в сторону Th2-типа» или «сдвиг в сторону иммунного ответа Th2-типа». Сходные экспрессии также возможны для поляризации в сторону других подтипов CD4+ Т-клеток.

В настоящем описании термин «фиброз» относится к явлению, при котором кожа или внутренний орган становятся жесткими в результате отложения внеклеточного матрикса, такого как коллаген, в коже или внутреннем органе. Известно, что после возникновения фиброза фиброзированные части тела никогда не вернутся к исходным мягким тканям.

В настоящем изобретении фраза «подавление прогрессирования фиброза» относится к подавлению или ингибированию прогрессирования фиброза по

сравнению с контролем (например, субъектом или группой субъектов, которым не вводят агент по настоящему изобретению, подавляющий прогрессирующее фиброза).

5 Известны различные методы оценки степени фиброза. Фиброз кожи можно оценить, например, по толщине кожи в образце кожной ткани, наблюдаемом под микроскопом. Тяжесть фиброза в легком можно оценить, например, с помощью шкалы оценки фиброза легких, известной как шкала Эшкрофта.

10 В настоящем изобретении фраза «подавление поляризации Th2» относится к подавлению или ингибированию смещения баланса Th1/Th2 в сторону доминирования Th2 по сравнению с контролем. Степень подавления поляризации Th2 не ограничена. Например, сдвиг баланса Th1/Th2 в сторону доминирования Th2 может быть подавлен, заторможен или уменьшен на 10% и более, 20% и более, 30% и более, 40% и более, 50% и более, 60% или более, 70% или более, 80% или более, 90% или более или 100% по сравнению с контролем.

15 В одном из вариантов осуществления настоящего изобретения контроль относится к степени поляризации Th2 у субъекта или группы субъектов (например, у пациента с системным склерозом или у группы пациентов с системным склерозом с заболеваниями с преобладанием Th2), которым не вводят агент, подавляющий поляризацию Th2, для подавления прогрессирующего фиброза при системном склерозе по настоящему изобретению

20 (фармацевтическая композиция по настоящему изобретению). В другом варианте сдвиг баланса Th1/Th2 в сторону доминирования Th2 может быть подавлен, ингибирован или уменьшен до уровня, равного или близкого к таковому у здоровых индивидов, например, в 2,0 раза, 1,9 раза, 1,8 раза, 1,7 раза, 1,6 раза, 25 1,5 раза, 1,4 раза, 1,3 раза, 1,2 раза, 1,1 раза или 1,0 раз относительно уровня здоровых индивидов.

Известны методы оценки степени поляризации Th1 или поляризации Th2 Th-клеток (хелперных T-клеток). Например, его можно оценить, измеряя уровни экспрессии цитокинов, специфичных для каждой из клеток Th1 и Th2, в

30 биологическом образце, полученном от субъекта, и вычисляя их соотношение. Точно так же поляризацию Th17/Treg можно оценить, вычислив соотношение между уровнями экспрессии цитокинов, специфичных для каждой из клеток Th17 и Treg.

В настоящем изобретении фраза «подавление прогрессирующего фиброза при системном склерозе» относится к подавлению или ингибированию прогрессирующего системного склероза при сравнении с контролем. В одном варианте осуществления настоящего изобретения контроль относится к тяжести системного склероза у субъекта или группы субъектов (например, пациента с системным склерозом или группы пациентов с системным склерозом), которым не вводят средство для подавления прогрессирующего фиброза при системном склерозе по настоящему изобретению (фармацевтическая композиция по настоящему изобретению). Известны методы оценки степени прогрессирующего фиброза при системном склерозе. Например, его можно оценить на основании степени фиброза кожи и/или внутреннего органа (например, легкого), степени поляризации Th2 или их комбинации.

Термин «IL-31» является новым членом семейства цитокинов IL-6, о котором первоначально сообщалось, что он индуцирует дерматит у мышей. IL-31 в основном продуцируется клетками Th2 и экспрессируется в различных клетках, включая фибробласты, кератиноциты и макрофаги. Связывание IL-31 с комплексом рецептора IL-31 на клеточной поверхности активирует JAK/STAT, PI3K/AKT и другие внутриклеточные сигнальные пути, что приводит к широкому спектру иммунных ответов.

Комплекс рецептора IL-31 представляет собой гетеродимер, состоящий из «рецептора А IL-31 (IL-31RA)» и «рецептора онкостатина М». IL-31RA уникален для рецептора IL-31, тогда как рецептор онкостатина М является общим для рецепторного комплекса для онкостатина М. Внутри этих двух субъединиц рецептора IL-31 связывается преимущественно с IL-31RA.

В настоящем изобретении фразу «антитело против рецептора А IL-31» используют применительно к антителу, способному специфически связываться с рецептором А IL-31 (IL-31RA). В контексте настоящего антитело против рецептора А IL-31 предпочтительно представляет собой антитело, обладающее нейтрализующей активностью против рецептора А IL-31.

В настоящем изобретении фраза «нейтрализующая активность в отношении рецептора IL-31 А» означает активность по ингибированию связывания рецептора А IL-31 с его лигандом, IL-31, и предпочтительно представляет собой активность по подавлению биологической активности на основе рецептора А IL-

31. Таким образом, «антитело, обладающее нейтрализующей активностью в отношении рецептора А IL-31», может ингибировать связывание IL-31RA с IL-31 и тем самым подавлять, ингибировать или блокировать внутриклеточную передачу сигналов через IL-31RA.

5 В настоящем изобретении термин «антитело» относится к молекуле, которая специфически связывается с определенной детерминантой антигена (эпитопом). Антитела включают различные структуры антител, включая моноклональные антитела, поликлональные антитела и фрагменты антител, но ими не ограничиваются.

10 В контексте настоящего изобретения антитело против IL-31RA предпочтительно представляет собой антитело против IL-31RA млекопитающих и более предпочтительно антитело против IL-31RA человека.

Нейтрализующие антитела против IL-31RA человека включают, например, антитело А. В клинических испытаниях показано, что антитело А улучшает
15 симптомы атопического дерматита. Антитело А содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи,
20 содержащую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. Антитело А содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи,
25 имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. Антитело А содержит тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: ID NO: 9 и легкая цепь, имеющая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.

Нейтрализующие антитела против IL-31RA мыши включают, например,
30 моноклональное антитело, блокирующее функцию рецептора А мышиного IL-31, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12. Нуклеотидные

последовательности переменных областей этих тяжелой цепи и легкой цепи зарегистрированы под номерами LC554895 и LC554896, соответственно, в международной базе данных нуклеотидных последовательностей DDBJ/EMBL/GenBank.

5 Все цитируемые публикации на предшествующий уровень техники полностью включены в настоящее изобретение в качестве ссылки.

Примеры

Ниже настоящее описание подробно описано со ссылкой на примеры, которые не ограничивают рамок охвата настоящего изобретения.

10 Мыши и протокол проведения эксперимента

Мыши C57BL/6 дикого типа приобретены на фирме The Jackson Laboratory (Бар-Харбор, Мэн, США). Блеомицин (BLM; фирма Nippon Kayaku, Токио, Япония) растворяют в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) в концентрации 1 мг/мл. Для создания модели мышей, индуцированной BLM (BLM-SSc), 200 мкг БЛМ
15 вводят подкожно в выбритые спины самок мышей ежедневно, как описано ранее (Yoshizaki A., Iwata Y., Komura K. с соавт. *Am J Pathol* 2008; 172: 1650-1663). Мышей, получавших ФСБ вместо BLM (мыши с ФСБ-контролем), используют в качестве контроля для мышей BLM-SSc. Для оценки эффектов блокирования
20 рецептор А анти-мышинного IL-31 (варибельная область тяжелой цепи: SEQ ID NO: 11; варибельная область легкой цепи: SEQ ID NO: 12; зарегистрирована как регистрационные номера DDBJ/EMBL/GenBank LC554895, LC554896 соответственно), или контроль изотипа каппа IgG1 мыши (фирма eBioscience, Сан-Диего, Калифорния, США) вводят инъекцией в дозе 200 мкг
25 внутрибрюшинно каждые 7 дней (в 1, 8 и 15 дни). Все мыши в исследовании были в возрасте шести недель. Исследуют по пять мышей в группе.

Иммуноферментный анализ (ELISA)

Образцы сыворотки замораживают при -80°C до тех пор, пока их не используют для анализов. Уровни IL-4 и IL-6 в сыворотке мышей определяют с
30 помощью наборов ELISA (фирма R&D Systems). Все эксперименты проводят в соответствии с инструкциями производителя.

Гистологический анализ

Ткани кожи и легких фиксируют формалином, заливают в парафин и окрашивают гематоксилином и эозином для гистологического исследования. Измеряют толщину дермы, определяемую как расстояние между эпидермально-дермальным соединением и кожно-жировым соединением. Тяжесть фиброза легких оценивают полуколичественно, как описано Ashcroft с соавт. (Ashcroft T., Simpson J.M., Timbrell V. *J Clin Pathol* 1988; 41: 467-470). Вкратце, критерии классификации следующие: степень 0 = нормальное легкое; степень 1 = минимальное фиброзное утолщение стенок альвеол или бронхиол; степень 3 = умеренное утолщение стенок без явного повреждения легочной архитектуры; степень 5 = повышенный фиброз с определенным повреждением структуры легкого и образованием фиброзных тяжей или небольших фиброзных масс; степень 7 = сильное искажение структуры и больших фиброзных областей; и степень 8 = полная фиброзная облитерация полей. Оценки 2, 4 и 6 используют как промежуточные между вышеупомянутыми критериями.

Выделение РНК и полимеразная цепная реакция реального времени (ПЦР)

Суммарную РНК выделяют из тканей с помощью спин-колонок RNeasy (фирма Qiagen, Кроули, Великобритания) в соответствии с инструкциями производителей. Суммарную РНК из каждого образца подвергают обратной транскрипции в кДНК. Экспрессию генов оценивают количественно методом помощи ПЦР реального времени с флуорофором SYBR green на детекторе последовательностей ABI Prism 7000 (фирма Applied Biosystems, Фостер-сити, Калифорния, США). Для нормализации количества загруженной кДНК в качестве внутреннего контроля используют GAPDH. Относительные кратные различия рассчитывают с использованием сравнительного метода Ct, как описано ранее (Yoshizaki A, Iwata Y, Komura K, с соавт. *Am J Pathol* 2008; 172: 1650-1663.). Последовательности праймеров следующие:

И4-прямой 5'-СААСГААГААССАССАСАГАГ-3' (SEQ ID NO: 13),

И4- обратный 5'- GGACTTGGACTCATTCATGG-3' (SEQ ID NO: 14);

И6- прямой 5'- GATGGATGCTАССАААСТGGAT-3' (SEQ ID NO: 15),

И6- обратный 5'- ССАGGTAGCTATGGTACTCCАGА-3' (SEQ ID NO: 16);

Ifng- прямой 5'-ТСАAGTGGCАTAGATGTGGАAGАА-3' (SEQ ID NO: 17),

Ifng- обратный 5'-TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3' (SEQ ID NO: 18);

Il17a- прямой 5'-CAGCAGCGATCATCCCTCAAAG-3' (SEQ ID NO: 19),
Il17a- обратный 5'-CAGGACCAGGATCTCTTGCTG-3' (SEQ ID NO: 20),
Il10- прямой 5'-TTTGAATTCCCTGGGTGAGAA-3' (SEQ ID NO: 21);
Il10- обратный 5'-ACAGGGGAGAAATCGATGACA-3' (SEQ ID NO: 22);
5 *Tgfb1*- прямой 5'-GCAACATGTGGAАСТСТАССАGAA-3' (SEQ ID NO: 23),
Tgfb1- обратный 5'-GACGTCAAAAGACAGCCACTCA-3' (SEQ ID NO: 24);
Tnfa- прямой 5'-ACCCTCACACTCAGATCATCTTC-3' (SEQ ID NO: 25),
Tnfa- обратный 5'-TGGTGGTTTGCTACGACGT-3' (SEQ ID NO: 26); и
Gapdh- прямой 5'-CGTGTTCCTACCCCAATGT-3' (SEQ ID NO: 27),
10 *Gapdh*-обратный 5'-TGTCATCATACTTGGCA GGTТТСТ-3' (SEQ ID NO:
28).

Проточная цитометрия

Дифференцировку клеток CD4⁺ Т исследуют методом проточной цитометрии согласно ранее описанному (Wen X., He L., Chi Y. с соавт. *PLoS Negl Trop Dis* 2011; 5: e1399). Вкратце, для определения клеток Th1, Th2 или Th17 спленоциты суспендируют в количестве 2×10^6 /мл в среде RPMI 1640 и стимулируют с помощью 25 нг/мл PMA (фирма Adipogen, Сан-Диего, Калифорния, США) и 1 мг/мл иономицина (фирма Sigma, Сент-Луис, Миссури, США) в присутствии 2 мкМ монензина (фирма Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) в течение 6 ч при 37°C при 5% CO₂. Затем образцы окрашивают с поверхности анти-CD3-PE моноклональным антителом и анти-CD4-FITC моноклональным антителом (фирма eBioscience). После фиксации и пермеабиллизации буфером Cytotfix/Cytoperm (фирма BD PharMingen, Сан-Диего, Калифорния, США) образцы внутриклеточно окрашивают APC-
25 конъюгированными моноклональными антителами против IFN- γ , IL-4 или IL-17A (фирма eBioscience) для обнаружения клеток Th1, Th2 или Th17, соответственно. APC-конъюгированные соответствующие изотипу моноклональные антитела (фирма eBioscience) используют в качестве контролей. Для обнаружения клеток Treg используют набор Mouse Regulatory T Cell Staining
30 Kit по протоколу производителя (фирма eBioscience). Вкратце, спленоциты, суспендированные в количестве 2×10^6 /мл, окрашивают по поверхности моноклональным антителом анти-CD3-PE/Cy7, моноклональным антителом анти-CD4-FITC и моноклональным антителом анти-CD25-APC (фирма

eBioscience) с последующей фиксацией и пермеабиллизацией клеточных мембран с помощью Cytofix/Cytoperm и внутриклеточным окрашиванием моноклональным антителом анти-Foxp3-PE или IgG2a-PE крысы в качестве контроля. Образцы анализируют с помощью проточного цитометра FACS Verse (фирма BD Biosciences, Сан-Диего, Калифорния, США).

Статистический анализ

Данные выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Статистический анализ проводят с помощью U-критерия Манна-Уитни для сравнения двух групп. Значения P менее 0,05 считают значимыми. Все анализы проводят с помощью программы GraphPad Prism 7.03 (фирма GraphPad Software, Ла-Хойя, Калифорния, США).

Функциональное блокирование анти-IL-31RA моноклональным антителом ослабляет фиброз и поляризацию Th2 у мышей BLM-SSc

Для определения роли IL-31 в развитии SSc оценивают фиброз и поляризацию Th2 у мышей BLM-SSc, получавших функционально блокирующее анти-IL-31RA моноклональное антитело. Анти-IL-31RA моноклональное антитело вводят еженедельно вместе с ежедневными подкожными инъекциями BLM в течение трех недель (фиг. 1А). Анти-IL-31RA моноклональное антитело значительно уменьшает толщину дермы мышей BLM-SSc по сравнению с контрольным изотипом IgG ($p < 0,01$; фиг. 1Б). Анти-IL-31RA моноклональное антитело также обладает выраженным эффектом снижения проявления фиброза легких у мышей BLM-SSc ($p < 0,001$; фиг. 1Б). Кроме того, анти-IL-31RA моноклональное антитело значительно снижает процент Th2-клеток ($p < 0,01$) и соотношение Th2/Th1 ($p < 0,05$), а не соотношение Th17/Treg в Т-клетках селезенки мышей BLM-SSc (фиг. 2А). Анти-IL-31RA моноклональное антитело также улучшает повышенную выработку сывороточных IL-4 и IL-6 у мышей BLM-SSc ($p < 0,01$ и $p < 0,001$, соответственно; фиг. 2Б). В целом анти-IL-31RA моноклональное антитело значительно ослабляет BLM-индуцированный фиброз и поляризацию Th2.

Применимость в промышленности

Изобретение по настоящему описанию проясняет эффект введения анти-IL-31RA антитела животным, моделирующим системный склерозирующий фиброз. В частности, фармацевтические композиции по настоящему изобретению,

содержащие анти-IL-31RA антитело, подавляют прогрессирование фиброза, например, в коже и легких, и поэтому их можно использовать в качестве средств для подавления прогрессирования фиброза при системном склерозе. Кроме того, фармацевтические композиции по настоящему изобретению, содержащие анти-IL-31RA антитело, подавляют поляризацию Th2 и, следовательно, могут использоваться в качестве агентов, подавляющих поляризацию Th2, для подавления прогрессирования фиброза при системном склерозе.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

5 1. Средство для подавления прогрессирования фиброза при системном склерозе, включающее антитело против рецептора А IL-31 в качестве активного ингредиента.

2. Средство для подавления прогрессирования фиброза по п. 1, которое подавляет поляризацию Th2.

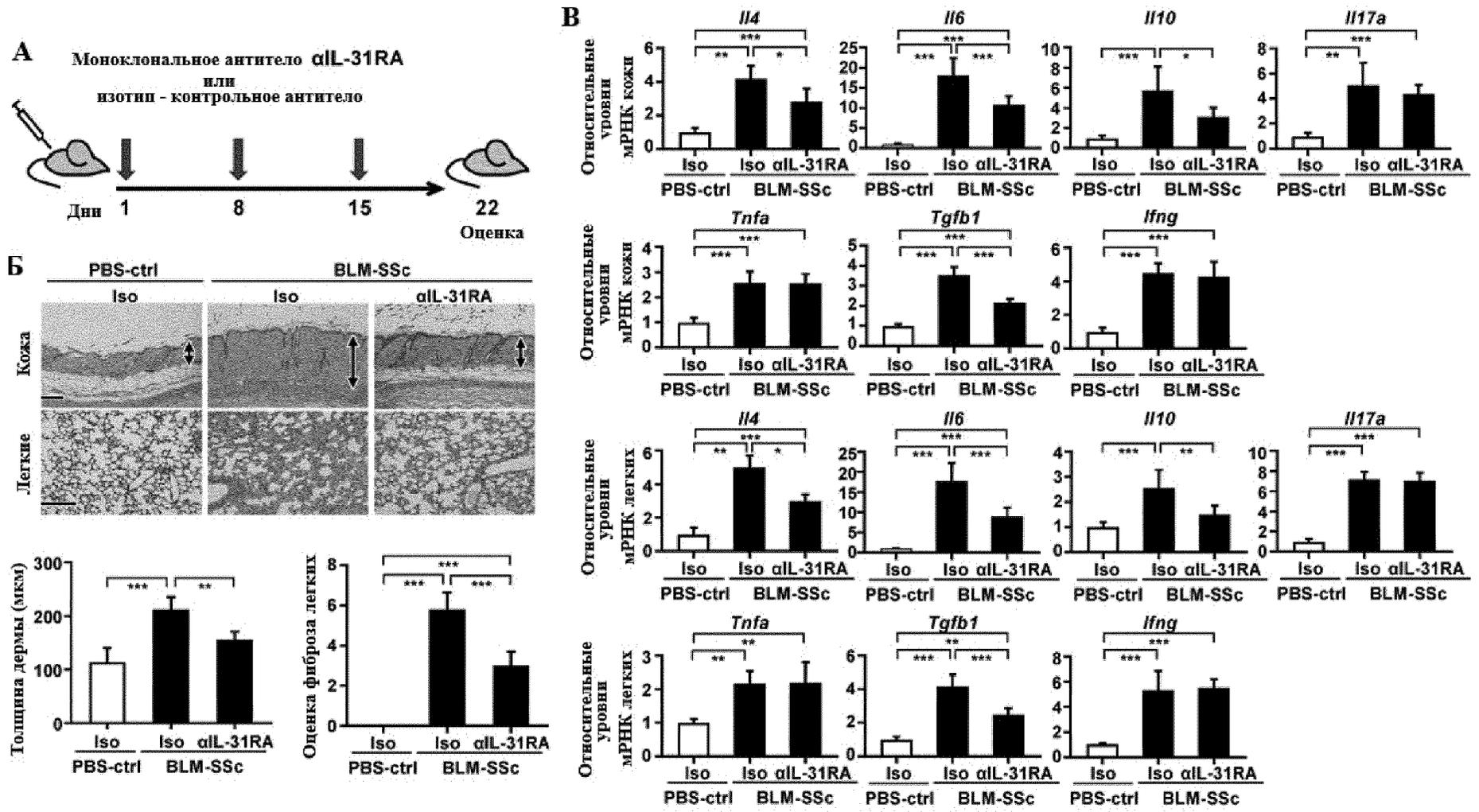
10 3. Средство для подавления прогрессирования фиброза по п.п. 1 или 2, в котором антитело является антителом, обладающим нейтрализующей активностью против рецептора А IL-31.

15 4. Средство для подавления прогрессирования фиброза по любому из п.п. 1-3, в котором антитело представляет собой:

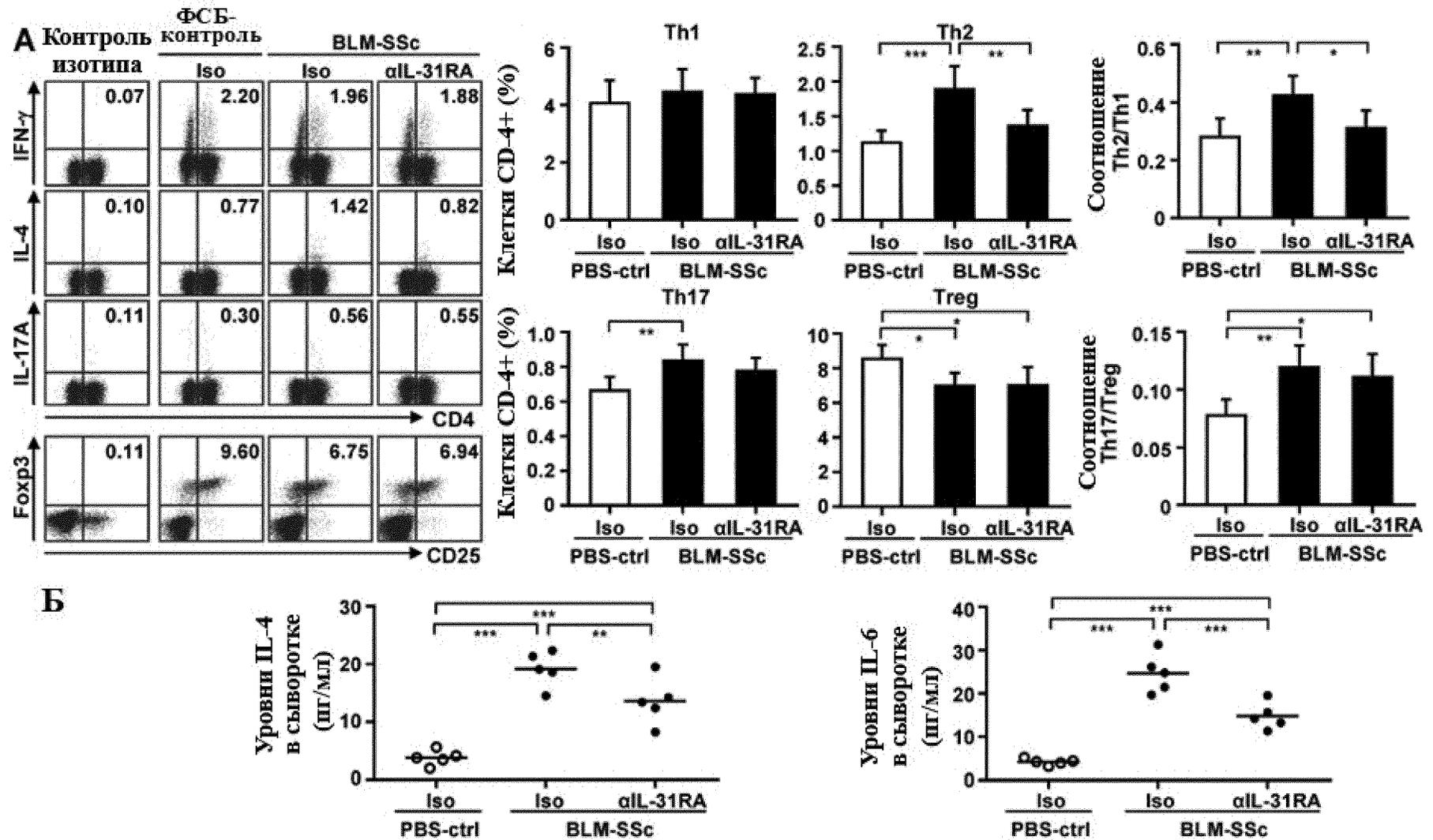
(1) антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, включающую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и
20 переменную область легкой цепи, включающую CDR1, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6;

(2) антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую
25 аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; или

(3) антитело, содержащее тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10.



Фигура 1.



Фигура 2.