

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **041768**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.11.30

(51) Int. Cl. *C12Q 1/68* (2006.01)

(21) Номер заявки
201890185

(22) Дата подачи заявки
2016.07.28

(54) **СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ ОПОСРЕДОВАННЫХ ГЕПСИДИНОМ НАРУШЕНИЙ**

(31) **62/199,434; 62/268,788**

(32) **2015.07.31; 2015.12.17**

(33) **US**

(43) **2018.07.31**

(86) **PCT/US2016/044528**

(87) **WO 2017/023699 2017.02.09**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕДИММУН ЛИМИТЕД (GB)

(72) Изобретатель:
**Каккар Рахул, Девалараджа
Мадхав Н., Эскотт Кэтрин Джейн (US)**

(74) Представитель:
**Хмара М.В., Рыбаков В.М., Липатова
И.И., Дощечкина В.В., Пантелеев
А.С., Ильмер Е.Г., Осипов К.В. (RU)**

(56) "Down-regulation of hepcidin resulting from long-term treatment with an anti-IL-6 receptor antibody (tocilizumab) improves anemia of inflammation in multicentric Castleman disease" (Song et al.) Blood. 2010; 116(18):3627-3634; abstract, pg 3629, col. 2, para 2-3, pg. 3632, col. 2, para 3, Table 1, Fig. 3

"TMPRSS6 rs855791 modulates hepcidin transcription in vitro and serum hepcidin levels in normal individuals" (Nai et al.) Blood. 2011; 118(16):4459-4462; abstract, pg. 4460, col. 2, para 2-3 US-A1-20160017056

(57) Изобретение относится к способам лечения опосредованных гепсидином нарушений.

B1

041768

041768

B1

1. Ссылки на родственные заявки

Согласно заявке на данное изобретение испрашивается приоритет в соответствии с предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/199434, поданной 31 июля 2015 г., и предварительной заявкой на выдачу патента США № 62/268788, поданной 17 декабря 2015 г., каждая из которых включена в настоящий документ посредством ссылок в полном их объеме.

2. Перечень последовательностей

Заявка на данное изобретение содержит перечень последовательностей, который был представлен в электронном формате ASCII и включен в настоящее описание посредством ссылки в полном объеме. Указанная копия ASCII, созданная 12 сентября 2016 г., обозначена 34392PCT_CRF_sequencelisting.txt и имеет размер 51 KB.

3. Предшествующий уровень техники настоящего изобретения

Пептидный гормон, гепсидин, играет центральную роль в системном гомеостазе железа. Hentze et al., Cell, 142:24-38 (2010). Известно, что экспрессия гепсидина находится под влиянием продукта гена TMPRSS6, матриптазы-2, трансмембранной серин-протеазы II типа. Было показано, что обычные варианты гена TMPRSS6 коррелируют со статусом железа, Benyamin et al., Nature Genetics, 41(11):1173-1175 (2009), при этом было показано, что SNP rs855791 (2321G→A; A736V) коррелирует с естественными колебаниями экспрессии гепсидина и уровней гемоглобина в крови.

Экспрессия гепсидина вовлечена в развитие нарушений, связанных с метаболизмом железа, у человека, Pietrangelo, J. Hepatology, 54:173-181 (2011), и в развитие анемии при хроническом заболевании (ACD) (также известной как анемия при воспалении (AI)). ACD чаще всего встречается у пациентов с хронической инфекцией, аутоиммунным заболеванием, злокачественной опухолью и хронической болезнью почек (CKD). Sun et al., Am. J. Hematol. 87(4):392-400 (2012).

В настоящей области техники существует потребность в способах лечения опосредованных гепсидином нарушений.

4. Сущность изобретения

Авторами настоящего изобретения было продемонстрировано, что уменьшение передачи сигнала IL-6 дает клинический положительный эффект у пациентов с опосредованным гепсидином нарушением, в том числе с анемией при хроническом заболевании и опосредованных гепсидином клеточных токсичностях, но только у тех пациентов, которые имеют по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMPRSS6, с наибольшим эффектом у пациентов с повышенными уровнями IL-6.

Следовательно, в соответствии с первым аспектом, настоящее изобретение относится к способам лечения опосредованного гепсидином нарушения. Способы предусматривают введение терапевтически эффективного количества антагониста IL-6 пациенту с опосредованным гепсидином нарушением, который был определен как имеющий по меньшей мере одну копию основного аллеля с SNP rs855791 TMPRSS6. В соответствии с первой серией вариантов осуществления, пациент был ранее определен как имеющий по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMPRSS6. В соответствии с другой серией вариантов осуществления способ дополнительно предусматривает более ранний этап определения того, что пациент имеет по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMPRSS6. Обычно пациент имеет повышенные уровни IL-6 в сыворотке крови перед началом лечения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент имеет повышенные уровни CRP в сыворотке крови перед началом лечения.

В соответствии с различными вариантами осуществления, опосредованное гепсидином нарушение представляет собой анемию при хроническом заболевании.

В соответствии с некоторыми связанными с анемией вариантами осуществления, пациент является пациентом мужского пола и имеет уровень гемоглобина (Hb) перед началом лечения менее 14 г/дл, уровень Hb перед началом лечения менее 13 г/дл, уровень Hb перед началом лечения менее 12 г/дл или уровень Hb перед началом лечения менее 11 г/дл. В соответствии с некоторыми связанными с анемией вариантами осуществления, пациент представляет собой пациента женского пола и имеет уровень Hb перед началом лечения менее 12 г/дл, уровень Hb перед началом лечения менее 11 г/дл, уровень Hb перед началом лечения менее 10 г/дл или уровень Hb перед началом лечения менее 9 г/дл.

В соответствии с некоторыми связанными с анемией вариантами осуществления, пациент представляет собой пациента мужского пола и имеет гематокрит перед началом лечения менее 40%, менее 35% или 30-34%. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент представляет собой пациента женского пола и имеет гематокрит перед началом лечения менее 36%, менее 35%, менее 34%, менее 33%, менее 32% или менее 31%. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент женского пола имеет гематокрит перед началом лечения 26-29%.

В соответствии с различными связанными с анемией вариантами осуществления, пациент получил по меньшей мере одно введение стимулирующего эритропоз средства (ESA) перед началом лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент получил по меньшей мере одно введение ESA перед началом лечения и имеет нормальный уровень Hb или нормальный гематокрит. В соответствии с различными вариантами осуществления, пациент получил по меньшей мере одно введение железосодержащей добавки перед началом лечения. В соответствии с определенными вариантами осу-

шества, пациент получил по меньшей мере одно введение железосодержащей добавки перед началом лечения и имеет нормальный уровень Hb или нормальный гематокрит. В соответствии с различными вариантами осуществления, пациент получил по меньшей мере одно переливание крови или эритроцитарной массы перед началом лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент получил по меньшей мере одно переливание крови или эритроцитарной массы перед началом лечения и имеет нормальный уровень Hb или нормальный гематокрит.

В соответствии с различными связанными с анемией вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для увеличения Hb у пациента выше уровней перед началом лечения. В соответствии с различными вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для увеличения гематокрита у пациента выше уровней перед началом лечения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного, чтобы позволить уменьшить у пациента дозу ESA без уменьшения у пациента уровней Hb ниже уровней, присутствовавших непосредственно перед началом лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного, чтобы позволить уменьшить у пациента дозу ESA без уменьшения у пациента гематокрита ниже уровней, присутствовавших непосредственно перед началом лечения.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного, чтобы позволить по меньшей мере на 10% уменьшить у пациента дозу ESA по сравнению с дозой ESA перед началом лечения, по меньшей мере на 20% уменьшить у пациента дозу ESA по сравнению с дозой ESA перед началом лечения, по меньшей мере на 30% уменьшить у пациента дозу ESA по сравнению с дозой ESA перед началом лечения, по меньшей мере на 40% уменьшить у пациента дозу ESA по сравнению с дозой ESA перед началом лечения или по меньшей мере на 50% уменьшить у пациента дозу ESA по сравнению с дозой ESA перед началом лечения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для обращения функциональной железодефицитной анемии.

В соответствии с серией вариантов осуществления, опосредованное гепсидином нарушение представляет собой анемию при хроническом заболевании, причем хроническое заболевание представляет собой хроническую болезнь почек (CKD).

В соответствии с некоторыми связанными с CKD вариантами осуществления, пациент имеет 1-ю стадию хронической болезни почек KDOQI, 2-ю стадию хронической болезни почек KDOQI, 3-ю стадию хронической болезни почек KDOQI, 4-ю стадию хронической болезни почек KDOQI или 5-ю стадию хронической болезни почек KDOQI. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, пациент имеет 5-ю стадию хронической болезни почек KDOQI.

В соответствии с некоторыми связанными с CKD вариантами осуществления, пациент имеет кардиоренальный синдром (CRS). В соответствии с отдельными вариантами осуществления, пациент имеет CRS 4-го типа. В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент получил по меньшей мере одно лечение диализом перед началом лечения.

В соответствии с некоторыми связанными с CKD вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для уменьшения смертности, связанной с сердечно-сосудистым заболеванием (CV), по сравнению с совпадающими по возрасту и по заболеванию историческими контролями.

В соответствии с различными вариантами осуществления, опосредованное гепсидином нарушение представляет собой анемию при хроническом заболевании, причем хроническим заболеванием является хроническое воспалительное заболевание.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, хроническое воспалительное заболевание представляет собой ревматоидный артрит (RA). В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент перед началом лечения имеет показатель DAS28 более 5,1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент перед началом лечения имеет показатель DAS28, составляющий от 3,2 до 5,1. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, пациент перед началом лечения имеет показатель DAS28 менее 2,6. В соответствии с выбранными вариантами осуществления, RA у пациента перед началом лечения имеет степень активности от средней до высокой.

В соответствии с некоторыми относящимися к RA вариантами осуществления, пациент получил по меньшей мере одно введение метотрексата перед началом лечения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент получил по меньшей мере одно введение антагониста TNF α перед началом лечения. В соответствии с выбранными вариантами осуществления, антагонист TNF α выбран из группы, состоящей из этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, цертолизумаба и голимумаба.

В соответствии с некоторыми относящимися к RA вариантами осуществления, пациент получил по меньшей мере одно введение антагониста IL-6 перед началом лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществления, вводимым перед началом лечения антагонистом IL-6 является тоцилизумаб или тофацитиниб.

В соответствии с предпочтительной серией вариантов осуществления, вводимым в процессе лечения антагонистом IL-6 является MEDI5117.

В соответствии с различными вариантами осуществления, опосредованное гепсидином нарушение представляет собой анемию при хроническом заболевании, причем хроническое заболевание выбрано из группы, состоящей из ювенильного идиопатического артрита, анкилозирующего спондилоартрита, бляшечного псориаза, псориагического артрита, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона и язвенного колита.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, опосредованное гепсидином нарушение представляет собой анемию при хроническом заболевании, причем хроническое заболевание представляет собой злокачественную опухоль. В соответствии с определенными вариантами осуществления, злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из солидных опухолей, мелкоклеточной злокачественной опухоли легких, немелкоклеточной злокачественной опухоли легких, гематологической злокачественной опухоли, множественной миеломы, различных форм лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелоидного лейкоза (CML), различных форм лимфомы, лимфомы Ходжкина и аденомы печени.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, опосредованное гепсидином нарушение представляет собой анемию при хроническом заболевании, причем хроническое заболевание представляет собой хроническую инфекцию.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, опосредованное гепсидином нарушение представляет собой анемию при хроническом заболевании, причем хроническое заболевание представляет собой хроническую сердечную недостаточность (CHF).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, опосредованное гепсидином нарушение представляет собой железорефрактерную и железодефицитную анемию (IRIDA).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, опосредованное гепсидином нарушение представляет собой острый коронарный синдром. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, пациент перенес инфаркт миокарда (MI) в течение 60 дней, предшествующих первому введению антагониста IL-6, в течение 30 дней, предшествующих первому введению антагониста IL-6, в течение 48 ч, предшествующих первому введению антагониста IL-6 или в течение 24 ч, предшествующих первому введению антагониста IL-6.

В соответствии с некоторыми относящимися к острому коронарному синдрому вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для улучшения сократимости миокарда по сравнению с уровнями перед началом лечения. В соответствии с некоторыми относящимися к острому коронарному синдрому вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для улучшения сердечной фракции выброса по сравнению с уровнями перед началом лечения. В соответствии с некоторыми относящимися к острому коронарному синдрому вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для уменьшения фиброза сердца по сравнению с уровнями перед началом лечения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, опосредованное гепсидином нарушение представляет собой болезнь Кацлемана.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способам улучшения лечения опосредованного гепсидином нарушения. Способ предусматривает прекращение введения антагониста IL-6 пациенту с опосредованным гепсидином нарушением, причем пациент был определен как гомозиготный по минорному аллелю rs855791 TMPRSS6.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способам улучшения лечения опосредованного гепсидином нарушения путем прекращения терапии, которая является неэффективной, таким образом уменьшая побочные эффекты и уменьшая затраты без потери эффективности лечения. Способы предусматривают прекращение введения антагониста IL-6 пациенту с опосредованным гепсидином нарушением, причем пациент был определен как гомозиготный по минорному аллелю rs855791 TMPRSS6. В соответствии с серией вариантов осуществления, пациент был ранее определен как гомозиготный по минорному аллелю rs855791 TMPRSS6. В соответствии с другой серией вариантов осуществления, способ дополнительно предусматривает более ранний этап определения того, что пациент является гомозиготным по минорному аллелю rs855791 TMPRSS6. В соответствии с типичными вариантами осуществления, пациент имеет повышенные уровни IL-6 в сыворотке крови перед началом лечения. В соответствии с различными вариантами осуществления, пациент имеет повышенные уровни CRP в сыворотке крови перед началом лечения. В соответствии с различными вариантами осуществления, пациент имеет опосредованное гепсидином нарушение, выбранное из нарушений, описанных в разделе 5.2.1 настоящего описания. В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент имеет анемию при хроническом заболевании.

Из данных, представленных в приведенных ниже примерах 2, 3 и 5, видно, что антагонисты IL-6 дают положительный эффект у субъектов, имеющих повышенные уровни IL-6 перед началом лечения и по меньшей мере одну копию основного аллеля TMPRSS6, даже при отсутствии анемии. Следовательно, в соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способам лечения опосредован-

ных IL-6 воспалительных нарушений у пациентов без анемии при хроническом воспалении. Способы предусматривают введение терапевтически эффективного количества антагониста IL-6 субъекту, обычно пациенту-человеку, который имеет опосредованное IL-6 воспалительное заболевание, причем у пациента отсутствует анемия, и субъект был определен как имеющий по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMRSS6. В соответствии с первой серией вариантов осуществления, субъект ранее был определен как имеющий по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMRSS6. В соответствии с другой серией вариантов осуществления, способ дополнительно предусматривает более ранний этап определения того, что субъект имеет по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMRSS6. Как правило, способы предусматривают исключение лечения субъектов, если был получен положительный результат, что они являются гомозиготными по минорному аллелю rs855791 TMRSS6. Обычно пациент имеет повышенные уровни IL6 в сыворотке крови перед началом лечения.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления любого из способов лечения, пациент имеет повышенные уровни IL-6 в сыворотке крови перед началом лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент имеет уровень IL-6 в сыворотке крови перед началом лечения более 2,5 пг/мл, более 5 пг/мл, более 7,5 пг/мл, более 10 пг/мл или более 12,5 пг/мл.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для уменьшения уровней свободного IL-6 в сыворотке крови у пациента ниже уровней перед началом лечения. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для уменьшения уровней свободного IL-6 по меньшей мере на 10% по сравнению с уровнями перед началом лечения, по меньшей мере на 20% по сравнению с уровнями перед началом лечения или по меньшей мере на 50% по сравнению с уровнями перед началом лечения.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления любого из способов лечения, пациент перед началом лечения имеет повышенные уровни С-реактивного белка (CRP). В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент перед началом лечения имеет уровень С-реактивного белка более 2 мг/л, более 3 мг/л, более 5 мг/л, более 7,5 мг/л или даже более 10 мг/л.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для уменьшения уровней CRP у пациента ниже уровней перед началом лечения. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для уменьшения уровней CRP у пациента по меньшей мере на 50% по сравнению с уровнями перед началом лечения.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления любого из способов лечения, пациент был определен как имеющий по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMRSS6 с помощью анализа ПЦР в режиме реального времени TaqMan®.

В соответствии с вариантами осуществления любого из способов лечения, антагонист IL-6 представляет собой антитело к IL-6 или его антигенсвязывающий фрагмент или производное.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, антитело к IL-6 или его антигенсвязывающий фрагмент или производное имеет K_D в отношении связывания IL-6 человека менее 100 нМ, менее 50 нМ, менее 10 нМ или менее 1 нМ. В соответствии с определенными вариантами осуществления, антитело к IL-6 или его антигенсвязывающий фрагмент или производное имеет период полувыведения после внутривенного введения по меньшей мере 7 дней, по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 21 день или по меньшей мере 30 дней.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой полноразмерное моноклональное антитело к IL-6, такое как антитело IgG1 или IgG4.

В соответствии с выбранными вариантами осуществления, антитело к IL-6 или его антигенсвязывающий фрагмент или производное является полностью человеческим. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к IL-6 или его антигенсвязывающий фрагмент или производное является гуманизированным.

В соответствии с предпочтительными на данный момент вариантами осуществления, антитело к IL-6 или его антигенсвязывающий фрагмент или производное содержит все шесть CDR вариабельного участка из MED5117. В соответствии с некоторыми такими вариантами осуществления, антитело содержит VH и VL из MED5117. И в соответствии с отдельными вариантами осуществления, антитело представляет собой MED5117.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антитело к IL-6 или его антигенсвязывающий фрагмент или производное содержит все шесть CDR вариабельного участка антитела, выбранного из группы, состоящей из силтуксимаба, герилимзумаба, сирукумаба, клазакизумаба, олокизумаба, элсилимомаба, VX30 (VOP-R003; Vaccinex), EB-007 (EBI-029; Eleven Bio), ARGX-109 (ArGEN-X), FM101 (Femta Pharmaceuticals, Lonza) и ALD518/BMS-945429 (Alder Biopharmaceuticals, Bristol-Myers Squibb).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к IL-6 или его антигенсвязывающий фрагмент или производное содержит V участок тяжелой цепи и V участок легкой цепи из антитела, выбранного из группы, состоящей из силтуксимаба, герилимзумаба, сирукумаба, клазакизумаба,

олокизумаба, VX30 (VOP-R003; Vaccinex), EB-007 (EBI-029; Eleven Bio), ARGX-109 (ArGEN-X), FM101 (Femta Pharmaceuticals, Lonza) и ALD518/BMS-945429 (Alder Biopharmaceuticals, Bristol-Myers Squibb). В соответствии с отдельными вариантами осуществления, антитело к IL-6 является антителом, выбранным из группы, состоящей из силтуксимаба, герилимзумаба, сирукумаба, клазакизумаба, олокизумаба, VX30 (VOP-R003; Vaccinex), EB-007 (EBI-029; Eleven Bio), ARGX-109 (ArGEN-X), FM101 (Femta Pharmaceuticals, Lonza) и ALD518/BMS-945429 (Alder Biopharmaceuticals, Bristol-Myers Squibb).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к IL-6 или его антигенсвязывающий фрагмент или производное является антителом, выбранным из группы, состоящей из силтуксимаба, герилимзумаба, сирукумаба, клазакизумаба, олокизумаба, VX30 (VOP-R003; Vaccinex), EB-007 (EBI-029; Eleven Bio), ARGX-109 (ArGEN-X), FM101 (Femta Pharmaceuticals, Lonza) и ALD518/BMS-945429 (Alder Biopharmaceuticals, Bristol-Myers Squibb). В соответствии с отдельными вариантами осуществления, антитело к IL-6 является антителом, выбранным из группы, состоящей из силтуксимаба, герилимзумаба, сирукумаба, клазакизумаба, олокизумаба, VX30 (VOP-R003; Vaccinex), EB-007 (EBI-029; Eleven Bio), ARGX-109 (ArGEN-X), FM101 (Femta Pharmaceuticals, Lonza) и ALD518/BMS-945429 (Alder Biopharmaceuticals, Bristol-Myers Squibb).

В соответствии с различными вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой однодоменное антитело, нанотело VHH, Fab или scFv.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой антитело к IL-6R или его антигенсвязывающий фрагмент или производное. В соответствии с определенными вариантами осуществления, антитело к IL-6R, антигенсвязывающий фрагмент или производное представляет собой тоцилизумаб или вобарилизумаб.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой JAK-ингибитор. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, JAK-ингибитор выбран из группы, состоящей из тофацитиниба (Xeljanz), децрнотиниба, руксолитиниба, ападацитиниба, барицитиниба, филготиниба, лестауртиниба, пакритиниба, пефицитиниба, INCB-039110, АВТ-494, INCB-047986 и АС-410.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой ингибитор STAT3.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в которых антагонист IL-6 представляет собой антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или производное, антагонист IL-6 вводят парентерально. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят подкожно.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, в которых антагонист IL-6 представляет собой JAK-ингибитор или ингибитор STAT3, антагонист IL-6 вводят перорально.

5. Краткое описание фигур

На фиг. 1А и 1В представлены коробчатые диаграммы, на которых видно, что необходимы повышенные количества эритропоэтина для лечения пациентов с хронической болезнью почек (субъектов на диализе с 5-й стадией СКД) ("ЕРО"), у которых были повышенные уровни IL-6 в сыворотке крови и по меньшей мере одна копия основного аллеля с известным SNP в гене TMPRSS6, rs855791 (G или C в нуклеотидном положении 2321, кодирующего полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736; 736А), но не у пациентов с хронической болезнью почек, которые имели повышенные уровни IL-6 и были гомозиготными по минорному аллелю rs855791 TMPRSS6 (Т или А в нуклеотидном положении 2321, кодирующему полипептид TMPRSS6, имеющий валин в положении 736; 736V). Данные от пациентов, гомозиготных по минорному аллелю (А/А), показаны на фиг. 1А; данные от пациентов, имеющих по меньшей мере одну копию основного аллеля (гомозиготных G/G и гетерозиготных G/A), были объединены и показаны на фиг. 1В. Каждая из двух совокупностей пациентов была дополнительно стратифицирована на группы по тертилям уровня IL-6 в сыворотке крови: "нижний" тертиль (IL-6 <5 пг/мл); "средний" тертиль (IL-6 = 5-15 пг/мл); "наивысший" тертиль (IL-6 >15 пг/мл). Коробчатые диаграммы с "усами" наложены на необработанные данные. Каждая коробчатая диаграмма представляет собой группу пациентов как по уровню IL-6, так и по генотипу. Подробности приведены в примере 1.

На фиг. 2А и 2В приведены кривые выживаемости, из которых видно, что основной аллель rs855791 TMPRSS6 дает более высокую общую смертность в ответ на повышенные уровни IL-6 у субъектов на диализе с 5-й стадией хронической болезни почек.

На фиг. 2А показаны данные от пациентов, гомозиготных по минорному аллелю (А/А).

На фиг. 2В показаны данные от пациентов, имеющих по меньшей мере одну копию основного аллеля (гомозиготных G/G и гетерозиготных G/A).

Каждая группа была разделена на тертили уровня IL-6 в сыворотке крови с помощью уровней IL-6, использованных на фиг. 1. Подробности приведены в примере 1.

На фиг. 3 представлен график, на котором видно, что необходимы повышенные количества ЕРО для терапии у пациентов с хронической болезнью почек (субъектов на диализе с 5-й стадией СКД), которые имели повышенные уровни белка острой фазы воспаления CRP в сыворотке крови и которые имели по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMPRSS6, но не у пациентов с хронической

болезнью почек, которые имели повышенные уровни белка острой фазы воспаления CRP в сыворотке крови и которые были гомозиготными по минорному аллелю rs855791. Каждая группа генотипа была разделена на уровни CRP в сыворотке крови: <2 мг/л относительно >2 мг/л. Подробности приведены в примере 1.

На фиг. 4А и 4В приведены графики, на которых видно, что основной аллель rs855791 TMPRSS6 дает более высокую общую смертность в ответ на повышенные уровни IL-6 у пациентов после инфаркта миокарда ("MI").

На фиг. 4А показана совокупная вероятность смертельного исхода с течением времени (ось y) относительно дней после MI (по оси x) для совокупности, гомозиготной по минорному аллелю rs855791 TMPRSS6.

На фиг. 4В показана совокупная вероятность смертельного исхода с течением времени для совокупности, имеющей по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMPRSS6.

Каждую группу разделяли на тертили уровня IL-6 в сыворотке крови, как указано ранее. Уровень IL-6 измеряли спустя один месяц после инфаркта миокарда. Смертность измеряли спустя 1-12 месяцев после инфаркта миокарда. Подробности приведены в примере 2.

На фиг. 5А и 5В представлены графики, из которых видно, что основной аллель rs855791 TMPRSS6 дает более высокий риск сердечной недостаточности ("HF") в ответ на повышенные уровни IL-6 у пациентов после MI.

На фиг. 5А показана совокупная вероятность HF с течением времени (ось y) относительно дней после MI (по оси x) для совокупности, гомозиготной по минорному аллелю rs855791 TMPRSS6.

На фиг. 5В показана совокупная вероятность события HF с течением времени для совокупности, имеющей по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMPRSS6.

Каждую группу разделяли на тертили уровня IL-6 в сыворотке крови, как указано ранее. Уровень IL-6 измеряли спустя один месяц после инфаркта миокарда. HF измеряли спустя 1-12 месяцев после инфаркта миокарда. Подробности приведены в примере 2.

На фиг. 6А и 6В показаны результаты анализов клеток iPS человека, которые были трансфицированы конструкциями, конститутивно экспрессируют либо минорный аллель, либо основной аллель rs855791 TMPRSS6 и дифференцировались в кардиомиоциты под воздействием *in vitro* BMP2+IL-6 или только BMP2, это свидетельствует, что основной аллель rs855791 TMPRSS6 дает более высокий риск гибели клеток (положительных по трипановому синему) в ответ на IL-6.

На фиг. 6А показаны результаты в среде с нормальным содержанием кислорода.

На фиг. 6В показаны результаты после воздействия гипоксических условий и реоксигенации.

Данные свидетельствуют, что снижение воздействия IL-6 должно улучшить выживаемость кардиомиоцитов у пациентов с основным аллелем rs855791 TMPRSS6, но не у пациентов с минорным аллелем rs855791 TMPRSS6. Подробности приведены в примере 3.

На фиг. 7 представлена диаграмма, на которой проиллюстрирована схема эксперимента по исследованию кардиоренального синдрома, описанного в примере 4. У крыс, генотипически аналогичных людям, гомозиготным по основному аллелю rs855791 TMPRSS6, индуцировали CRS4. На диаграмме показаны различные события в исследовании по временной шкале. В исследовании инфаркт миокарда ("MI") индуцировали у крыс на 0-й неделе. На 2-й неделе проводили нефрэктомии одной почки ("Nx") у каждого субъекта. Антитело к IL-6 (ab9770, Abcam Plc, Великобритания) (Rx) или антитело изотипического контроля ("IgG", ab171516, Abcam Plc, Великобритания) вводили раз в 3 дня, начиная с 1-го дня (D1) после нефрэктомии и до конца исследования. Стандартное средство профилактической терапии (ингибитор АСЕ под названием периндоприл) вводили ежедневно с 1-го дня после Nx и до конца исследования. На 6-й неделе грызунов умерщвляли. MI и Nx не проводили в контрольной группе под названием группа "холостых" субъектов. В обозначенные стрелками моменты времени проводили различные оценки у грызунов.

На фиг. 8А-8D показана сердечная фракция выброса у крыс, обработанных антителом к IL-6 ("Ab к IL-6"), стандартным средством профилактической терапии, т.е. ингибитором АСЕ (периндоприлом или "Peri"), относительно обработанной контролем ("изотипом") группы и животных с имитацией операции в модели кардиоренального синдрома, которая кратко описана на фиг. 7 и подробно описана в примере 4.

На фиг. 8А показан график, на котором изображены исходные уровни фракции выброса для всех групп через две недели после инфаркта миокарда, но до нефрэктомии.

На фиг. 8В показан график, на котором изображены уровни фракции выброса для всех групп через одну неделю после нефрэктомии, спустя 1 неделю обработки.

На фиг. 8С показан график, на котором изображены уровни фракции выброса для всех групп через две недели после нефрэктомии, спустя 2 недели обработки.

На фиг. 8D показан график, на котором изображены уровни фракции выброса для всех групп через четыре недели после нефрэктомии, спустя 4 недели обработки.

Результаты выражены как среднее \pm SEM и свидетельствуют, что терапия антителом к IL-6 обладала терапевтической эффективностью в модели кардиоренального синдрома, эквивалентной стандартному средству профилактической терапии, измеренной по изменениям сердечной фракции выброса.

На фиг. 9 показан график, на котором изображена сердечная сократимость у крыс, обработанных антителом к IL-6 ("Ab к IL-6"), стандартным средством профилактической терапии (периндоприлом или "Peri"), относительно обработанной контролем ("изотипом") группы в модели кардиоренального синдрома, которая кратко описана на фиг. 7 и подробно описана в примере 4. В конце исследования оценивали сердечную сократимость путем измерения dP/dt_{max} (мм. рт. ст/мс), которая является показателем давления внутри сердца. Результаты измерений показаны для всех групп через четыре недели после нефрэктомии, спустя 4 недели обработки. Результаты выражены как среднее \pm SEM и свидетельствуют, что терапия антителом к IL-6 оказывала терапевтический эффект, эквивалентный стандартному средству профилактической терапии, что видно по увеличению сердечной сократимости в группах грызунов, обработанных антителом к IL-6.

На фиг. 10А-10С показано, что терапия антителом к IL-6 оказывала положительный эффект на кардиоренальный синдром, эквивалентный стандартному средству профилактической терапии, измеряемый по уровням фиброза в ткани сердца от групп грызунов, обработанных антителом к IL-6 ("Ab к IL-6"), стандартным средством профилактической терапии (периндоприлом или "Peri") и контролем ("IgG").

На фиг. 10А показана микрофотография, на которой изображен гистологический срез ткани сердца, окрашенной красителем пикросириус красный. Были проанализированы два участка ткани: "нормальный" участок и участок "фиброзного края". Пример "нормального" участка обозначен обведенной контуром частью среза ткани. На вставке на микрофотографии показан увеличенный вид "нормального" участка, на котором видно, что небольшие части "нормального" участка имели фиброзную ткань. Участок "фиброзного края" представлял собой участок ткани в "нормальном" участке, который был периферическим относительно фиброзной ткани.

На фиг. 10В показан график, на котором изображены проценты площади "нормального" участка, обозначенного как фиброзная ткань (т.е. окрашенные/темные участки) в образцах тканей от всех групп.

На фиг. 10С показан график, на котором изображены проценты площади участка "фиброзного края", обозначенного как фиброзная ткань в образцах тканей от всех групп.

Результаты выражены как среднее \pm SEM. Подробности приведены в примере 4.

На фиг. 11А и 11В показаны данные, полученные от модели *in vivo*, в которой инфаркт миокарда индуцировали у мышей, генотипически аналогичных людям, гомозиготным по основному аллелю rs855791 TМPRSS6. Контрольная группа не получала никакой терапии. Экспериментальную группу обрабатывали антителом к IL-6 мыши.

На фиг. 11А видно, что обработка антителом к IL-6 обеспечивала статистически значимое улучшение фракции выброса.

На фиг. 11В видно, что обработка антителом к IL-6 обеспечивала статистически значимое улучшение сократимости, измеренное как укорочение сердечной фракции левого желудочка.

Из данных видно, что терапия антителом к IL-6, полученная сразу после инфаркта миокарда, улучшала функциональное восстановление левого желудочка у грызунов, которые имитируют пациентов-людей, имеющих основной аллель rs855791 TМPRSS6. Подробности приведены в примере 5.

Различные варианты осуществления настоящего изобретения изображены на чертежах лишь в иллюстративных целях. Из приведенного далее обзора специалист в настоящей области техники легко поймет, что можно использовать альтернативные варианты осуществления структур и способов, проиллюстрированных в настоящем документе, без отступления от идей описанного настоящем документе настоящего изобретения.

6. Подробное описание изобретения

6.1. Обзор результатов экспериментов.

Пептидный гормон, гепсидин, играет центральную роль в системном гомеостазе железа. Hentze et al., *Cell*, 142:24-38 (2010). Известно, что экспрессия гепсидина находится под влиянием продукта гена TМPRSS6, матриптазы-2, трансмембранной серин-протеазы II типа. Было показано, что обычные варианты гена TМPRSS6 коррелируют со статусом железа, Benyamin et al., *Nature Genetics*, 41(11):1173-1175 (2009), при этом было показано, что SNP rs855791 (2321G→A; A736V) коррелирует с естественными колебаниями экспрессии гепсидина и уровней гемоглобина в крови. Экспрессия гепсидина вовлечена в развитие нарушений, связанных с метаболизмом железа, у человека, Pietrangelo, J. *Hepatology*, 54:173-181 (2011), и в развитие анемии при хроническом заболевании (ACD) (также известной как анемия при воспалении (AI)). ACD чаще всего встречается у пациентов с хронической инфекцией, аутоиммунным заболеванием, злокачественной опухолью и хронической болезнью почек (CKD). Sun et al., *Am. J. Hematol.* 87(4):392-400 (2012).

Для определения того, может ли генотип SNP rs855791 TМPRSS6 служить прогнозом степени анемии при болезни почек на конечной стадии, данные, ранее собранные в клинических исследованиях пациентов с хронической болезнью почек, были проанализированы в сочетании с недавно определенным генотипированием SNP. Поскольку экспрессия гепсидина также регулируется посредством IL-6, Casanovas et al., *PLOS Computational Biol.* 10(1):e1003421 (2014), данные были дополнительно проанализированы с целью определения, могли ли уровни IL-6 в сыворотке крови служить прогнозом степени

анемии при заболевании почек на конечной стадии.

Как описано в примере 1 и показано на фиг. 1, степень лежащей в основе анемии, измеряемая как клинически подобранная доза ЕРО, коррелировала с уровнями IL-6 только у пациентов, имеющих по меньшей мере одну копию основного аллеля с SNP rs855791 TMPRSS6. У таких пациентов более высокие уровни IL-6 в сыворотке коррелировали с более высокой необходимой дозой ЕРО (фиг. 1B). Напротив, степень анемии у пациентов, имеющих две копии минорного аллеля, не коррелировала с уровнями IL-6 в сыворотке крови (фиг. 1A).

Аналогичным образом, общая выживаемость коррелировала с уровнем IL-6 только у пациентов по меньшей мере с одной копией основного аллеля с SNP rs855791 TMPRSS6. У субъектов, имеющих по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMPRSS6, выживаемость обратно коррелировала с уровнем IL-6 в сыворотке крови, причем пациенты в наивысшем тертиле уровней IL-6 в сыворотке крови имели статистически достоверно худшую выживаемость, чем в наинизшем тертиле уровня IL-6 (фиг. 2B). Напротив, общая выживаемость пациентов, гомозиготных по минорному аллелю в rs855791, не зависела от уровней IL-6 (фиг. 2A).

Не желая связывать себя какой-либо теорией, у пациентов, имеющих по меньшей мере одну копию основного аллеля TMPRSS6, увеличение IL-6 в сыворотке крови может приводить к увеличению экспрессии гепсидина, тем самым повышая анемию. Повышенный риск смертности является следствием нарушенного метаболизма железа, развившегося в результате анемии и/или увеличенной дозы стимулирующего эритропоз средства, такого как ЕРО, вводимого для лечения. Эти корреляции повышают вероятность того, что снижение уровней IL-6 или передачи сигнала IL-6 может снизить анемию, уменьшить необходимую дозу ЕРО и увеличить выживаемость у пациентов с хронической болезнью почек, но только у тех пациентов, у которых есть по меньшей мере одна копия основного аллеля rs855791 TMPRSS6, и с наибольшим эффектом у пациентов с повышенными уровнями IL-6 в сыворотке крови.

Для определения, влияет ли генотип TMPRSS6 rs855791 на чувствительность к IL-6 у пациентов с острым, но не хроническим заболеванием, в примере 2 были проанализированы данные, ранее собранные в клинических исследованиях пациентов, госпитализированных с острым коронарным синдромом, в сочетании с недавно определенным генотипированием SNP.

Смертность субъектов, гомозиготных по минорному аллелю (A) SNP rs855791 TMPRSS6, не коррелировала с колебаниями IL-6 (фиг. 4A). Тем не менее одна или две копии основного аллеля (G) давали более высокую общую смертность в ответ на повышенные уровни IL-6 у субъектов после инфаркта миокарда (фиг. 4B). Таким образом, TMPRSS6 модулировал опосредованный IL-6 риск смертельного исхода после инфаркта миокарда.

Также оценивали влияние генотипа TMPRSS6 на опосредованный IL-6 риск сердечной недостаточности. Сердечная недостаточность у субъектов, гомозиготных по минорному аллелю (A), не коррелировала с колебаниями IL-6 (фиг. 5A). Тем не менее аллель G TMPRSS6 давал более высокую частоту сердечной недостаточности в ответ на повышенные уровни IL-6 у субъектов после инфаркта миокарда (фиг. 5B). Таким образом, TMPRSS6 модулировал опосредованный IL-6 риск сердечной недостаточности после инфаркта миокарда.

Из данных из примера 2 видно, что корреляция между генотипом TMPRSS6, уровнями IL-6 и неблагоприятными клиническими результатами не ограничена пациентами с хронической болезнью почек. Не желая связывать себя какой-либо теорией, у пациентов, имеющих по меньшей мере одну копию основного аллеля TMPRSS6, увеличение IL-6 в сыворотке может приводить к увеличению экспрессии гепсидина с последующим увеличением секвестрации железа в кардиомиоцитах и с последующей опосредованной железом клеточной токсичностью. Такие корреляции повышают вероятность того, что снижение уровней IL-6 или передачи сигнала IL-6 может снизить сердечную недостаточность и смертность у пациентов с острым коронарным синдромом, но только у тех пациентов, у которых есть по меньшей мере одна копия основного аллеля rs855791 TMPRSS6, и с наибольшим эффектом у пациентов с повышенными уровнями IL-6 в сыворотке крови.

Несмотря на то, что корреляции, наблюдаемые в примерах 1 и 2, дают веские основания предполагать, что снижение опосредованной IL-6 передачи сигнала должно давать клинический положительный эффект у пациентов, имеющих по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMPRSS6, повышенные уровни IL-6 и либо анемию, либо опосредованную гепсидином клеточную токсичность, наблюдаемые корреляции не подтверждали причинно-следственную взаимосвязь. Соответственно, в примере 3 были сконструированы и протестированы *in vitro* полученные из индуцированных плюрипотентных клеток человека кардиомиоциты (iPS) для экспрессии только основного аллеля или минорного аллеля rs855791 TMPRSS6.

Экспрессия гепсидина регулируется обоими сигнальными путями: BMP6/SMAD и IL-6/STAT, причем BMP и IL-6 действуют через их соответствующие рецепторы и управляют экспрессией гепсидина. Casanovas et al., PLOS Comp. Biol. 10(1):e1003421 (2014). Кардиомиоциты iPS с основным и минорным аллелем обрабатывали *in vitro* агонистами обоих сигнальных путей: рекомбинантным BMP2 и IL-6, или только BMP2 для моделирования клинических вмешательств, при которых уровни IL-6 (или передача сигнала) снижаются. Контрольные клетки iPS не обрабатывали вообще никаким агонистом. Клеточную

смертность измеряли при нормальном давлении кислорода (нормальные кислородные условия), а также в условиях, которые имитируют гипоксию с последующей реоксигенацией (реперфузией).

На фиг. 6А показаны результаты, когда клетки были обработаны при нормальных уровнях кислорода. На кардиомиоциты iPS, экспрессирующие только минорный аллель rs855791 TMPRSS6 ("минорный аллель 736V"), не оказывалось существенного влияния ("n.s.") при устранении передачи сигнала IL-6: смертность клеток, измеренная как процент положительных по трипановому синему клеток, снижалась не значимо при обработке клеток только BMP2 по сравнению с обработкой BMP2+IL-6. Напротив, у кардиомиоцитов iPS, экспрессирующих основной аллель rs855791 TMPRSS6, наблюдали статистически значимую более низкую клеточную гибель при устранении передачи сигнала IL-6.

На фиг. 6В показаны результаты, когда клетки были подвергнуты гипоксии с последующей реоксигенацией. По сравнению с условиями с нормальным содержанием кислорода гипоксия/реоксигенация является токсичной для кардиомиоцитов iPS, при этом погибает приблизительно 40% контрольных клеток с основным и минорным аллелем по сравнению приблизительно с 20% контрольными клетками, погибшими в условиях с нормальным содержанием кислорода (ср. фиг. 6А). Относительно такой повышенной фоновой токсичности на кардиомиоциты iPS с минорным аллелем не оказывалось существенного влияния при устранении передачи сигнала IL-6: смертность клеток уменьшалась не значимо, если клетки были обработаны только BMP2 по сравнению с обработкой посредством BMP2 + IL-6. Напротив, у кардиомиоцитов iPS, экспрессирующих основной аллель rs855791 TMPRSS6, наблюдали статистически значимую более низкую клеточную гибель при устранении передачи сигнала IL-6.

Эти данные дают веское подтверждение выводам, сделанным по результатам апостериорного анализа данных клинических испытаний в примерах 1 и 2: снижение передачи сигнала IL-6 является эффективным для снижения опосредованной IL-6 токсичности у кардиомиоцитов, экспрессирующих основной аллель rs855791 TMPRSS6, но не у кардиомиоцитов, экспрессирующих только минорный аллель. Без привязки к какой-либо теории, управляемое IL-6 повышение токсичности у кардиомиоцитов iPS с основным аллелем может быть результатом опосредованного IL6 увеличения экспрессии гепсидина с последующим увеличением секвестрации железа в клетках и с последующей опосредованной железом клеточной токсичностью.

У пациентов с хронической болезнью почек, таких как те, которые участвовали в исследованиях MIMICK, проанализированных в примере 1, часто развивается нарушение сердечной функции, что является основным фактором, оказывающим влияние на общую смертность. Такое вторичное повреждение миокарда после первичной хронической болезни почек называется кардиоренальным синдромом 4-го типа (CRS 4-го типа). Для непосредственной проверки, эффективна ли терапия антителом к IL-6 в качестве лечения у пациентов с CRS4, имеющих по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMPRSS6, как это было предположено по данным в примерах 1 и 3, авторы настоящего изобретения использовали модель CRS4 у крыс, которые генотипически аналогичны людям, гомозиготным по основному аллелю rs855791 TMPRSS6.

После 4 недель обработки у обеих групп обработки, т.е. группы, обработанной антителом к IL-6, и группы, обработанной стандартным средством профилактической терапии, представляющим собой ингибитор ACE под названием периндоприл, наблюдали статистически значимо увеличенные уровни фракции выброса по сравнению с группой изотипического контроля (фиг. 8D) ($p < 0,001$). По аналогичным уровням фракции выброса в группе антитела к IL-6 и группе стандартного средства профилактической терапии, измеренным после 4-й недели лечения, видно, что терапия антителом к IL-6 обладала эффективностью, эквивалентной ингибитору ACE. На фиг. 9 показано, что терапия антителом к IL-6 также была эффективной, эквивалентно ингибитору ACE при сохранении сердечной сократимости. На фиг. 10А-10С показано, что терапия антителом к IL-6 была эквивалентно эффективной при уменьшении фиброза сердца.

Из этих данных видно, что обработка антителом к IL-6 эффективна для снижения повреждения миокарда и восстановления функции в *in vivo* модели кардиоренального синдрома у животных, которые генотипически аналогичны людям, гомозиготным по основному аллелю rs855791 TMPRSS6.

Аналогичным образом, данные в примерах 2 и 3 позволяют предположить, что снижение уровней IL-6 или передачи сигнала IL-6 может снизить сердечную недостаточность и смертность у пациентов с острым коронарным синдромом, но только у тех пациентов, у которых есть по меньшей мере одна копия основного аллеля rs855791 TMPRSS6, и с наибольшим эффектом у пациентов с повышенными уровнями IL-6 в сыворотке крови.

Было проведено исследование для определения влияния терапии антителом к IL-6 после острого инфаркта миокарда у мышей, которые генотипически аналогичны людям, гомозиготным по основному аллелю rs855791 TMPRSS6.

На фиг. 11А и 11В показаны данные, полученные от модели *in vivo*, в которой инфаркт миокарда индуцировали у мышей, генотипически аналогичных людям, гомозиготным по основному аллелю rs855791 TMPRSS6. Контрольная группа не получала никакой терапии. Экспериментальную группу обрабатывали антителом к IL-6 мыши. На фиг. 11А показано, что обработка антителом к IL-6 обеспечивала статистически значимое улучшение фракции выброса по сравнению с контролями. На фиг. 11В показано,

что обработка антителом к IL-6 обеспечивала статистически значимое улучшение сократимости, измеренное как укорочение сердечной фракции по сравнению с контролями. Из этих данных видно, что терапия антителом к IL-6, полученная сразу после инфаркта миокарда, улучшала функциональное восстановление левого желудочка у грызунов, которые генетически аналогичны пациентам-людям, имеющим основную аллель rs855791 Tmprss6.

В совокупности, из экспериментальных данных видно, что терапевтические воздействия, которые уменьшают передачу сигнала IL-6, дают клинический положительный эффект у пациентов с опосредованным гепсидином нарушением, таким как анемия или опосредованная гепсидином клеточная токсичность, но только у тех, кто имеет по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 Tmprss6, с наибольшим эффектом у пациентов с повышенными уровнями IL-6.

Следовательно, как дополнительно описано ниже, в соответствии с первым аспектом, настоящее изобретение относится к способам лечения опосредованного гепсидином нарушения. Способы предусматривают введение терапевтически эффективного количества антагониста IL-6 пациенту с опосредованным гепсидином нарушением, который был определен как имеющий по меньшей мере одну копию основного аллеля с SNP rs855791 Tmprss6. В соответствии со вторым аспектом, настоящее изобретение относится к способам улучшения лечения опосредованных гепсидином нарушений, причем способ предусматривает прекращение введения антагониста IL-6 пациенту с опосредованным гепсидином нарушением, причем пациент был определен как гомозиготный по минорному аллелю rs855791 Tmprss6. Лечение улучшают путем прекращения терапии, которая является неэффективной, тем самым уменьшая побочные эффекты и снижая затраты без потери эффективности лечения. В соответствии со следующим аспектом, настоящее изобретение относится к способам лечения опосредованных IL-6 воспалительных нарушений у пациентов без анемии при хроническом воспалении, причем способы предусматривают введение терапевтически эффективного количества антагониста IL-6 пациенту, который имеет опосредуемое IL-6 воспалительное нарушение, не имеет анемии, и этот субъект был определен как имеющий по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 Tmprss6.

6.2. Определения.

Если не определено иное, то все используемые в настоящем документе технические и научные термины имеют значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В контексте настоящего документа приведенные далее термины имеют значения, которые приписаны им ниже.

Под "гепсидином" понимают полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85% или более идентична аминокислотной последовательности, представленной в NCBI под номером доступа NP 066998 ("белок-предшественник гепсидина"), или его биологически активный фрагмент. К иллюстративным биологическим активностям гепсидина относятся связывание и снижение уровней канала экспорта железа под названием ферропортин, что ингибирует транспорт железа, ингибирует всасывание железа в кишечнике и ингибирует выделение железа из макрофагов и печени. Ниже представлена иллюстративная аминокислотная последовательность белка-предшественника гепсидина:

```
1  MALSSQIWAA CLLLLLLLAS LTSGSVFPQQ TGQLAELQPD DRAGARASWM PMFQRRRRRD
61  THFPICIFCC GCCHRSKCGM CCKT (SEQ ID NO:1)
```

Что касается вышеприведенной последовательности, гепсидин существует в различных формах, в том числе в виде препрогормона (аминокислоты 25-84), прогормона (аминокислоты 25-84) и зрелые формы, называемые гепсидином-25 (аминокислоты 60-84), гепсидином-22 (аминокислоты 63-84) и гепсидином-20 (аминокислоты 65-84).

"Опосредованное гепсидином нарушение" является любым нарушением, при котором экспрессия гепсидина вносит вклад в этиологию нарушения или любого из его симптомов. Вклад гепсидина в этиологию может быть известен, может предполагаться или может быть сделан из наблюдения, что введение антагониста IL-6 дает более выраженный терапевтический эффект у пациентов с нарушением, которые имеют по меньшей мере одну копию основного аллеля SNP rs855791 Tmprss6, по сравнению с пациентами с нарушением, которые гомозиготны по минорному аллелю rs855791 Tmprss6. Опосредованные гепсидином нарушения дополнительно описаны в разделе 6.2.1.

Под фразой "полипептид трансмембранной сериновой протеазы 6 (Tmprss6)" понимают полипептид или его фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85% или более идентична аминокислотной последовательности, представленной в NCBI под номером доступа NP 001275929, и обладающий серин-протеазной активностью. Полипептид Tmprss6, также известный как матриптаза-2 (MT2), расщепляет гемоювелин и ингибирует передачу сигнала с участием костного морфогенетического белка. Ниже представлена иллюстративная аминокислотная последовательность Tmprss6, имеющая аланин в положении 736 (736A):

```

1  MPVAEAPQVA  GGQGDGGDGE  EAEPEGMFKA  CEDSKRKARG  YLRLVPLFVL  LALLVLASAG
61  VLLWYFLGYK  AEMVVSQVYS  GSLRVLNRHF  SQDLTRRESS  AFRSETAKAQ  KMLKELITST
121  RLGTYYNSSS  VYSFGEGLPT  CFFWFILQIP  EHRRLMSLPE  VVQALLVEEL  LSTVNSSAAV
181  PYRAEYEVDP  EGLVILEASV  KDIAALNSTL  GCYRYSYVGQ  GQVLRKGPD  HLAASSCLWHL
241  QGPKDMLKL  RLEWTLAECR  DRLAMYDVAG  PLEKRLITSV  YGCSRQEPVV  EVLASGAIMA
301  VVWKKGLHSY  YDPFVLSVQP  VVFQACEVNL  TLDNRDLSQG  VLSTPYFPSY  YSPQTHCSWH
361  LTVPSLDYGL  ALWFDAYALR  RQKYDLPCTQ  GQWTIQNRRL  CGLRILQPYA  ERI PVVATAG
421  ITINFTSQIS  LTGPGVRVHY  GLYNQSDPCP  GEFLCSVNGL  CVPACDGVKD  CPNGLDERNC
481  VCRATFQCKE  DSTCISLPKV  CDGQPDCLNG  SDEEQCEGV  PCGTFTFQCE  DRSCVKKPNP
541  QCDGRPD CRD  GSDEEHDCDG  LQGPSSRIVG  GAVSSEGEWP  WQASLQVRGR  HICGGALIAD
601  RWVITAAHCF  QEDSMAS TVL  WTVFLGKVWQ  NSRWPGEVSF  KVSRLLLHPY  HEEDSHDYDV
661  ALLQLDHPVV  RSAAVRPVCL  PARSHFFEPG  LHCWITGWGA  LREGALRADA  VALFYGWRNQ
721  GSETCCCPIS  NALQKADVQL  IPQDLCSEVY  RYQVTPRMLC  AGYRKGKKA  CQGDSSGGPLV
781  CKALSGRWFL  AGLVSWGLGC  GRPNYFGVYT  RITGVISWIQ  QVVT (SEQ ID NO:2)

```

Ниже представлена иллюстративная аминокислотная последовательность TMPRSS6, имеющая ва-
лин в положении 736 (736V):

```

1  MPVAEAPQVA  GGQGDGGDGE  EAEPEGMFKA  CEDSKRKARG  YLRLVPLFVL  LALLVLASAG
61  VLLWYFLGYK  AEMVVSQVYS  GSLRVLNRHF  SQDLTRRESS  AFRSETAKAQ  KMLKELITST
121  RLGTYYNSSS  VYSFGEGLPT  CFFWFILQIP  EHRRLMSLPE  VVQALLVEEL  LSTVNSSAAV
181  PYRAEYEVDP  EGLVILEASV  KDIAALNSTL  GCYRYSYVGQ  GQVLRKGPD  HLAASSCLWHL
24  QGPKDMLKL  RLEWTLAECR  DRLAMYDVAG  PLEKRLITSV  YGCSRQEPVV  EVLASGAIMA
30  VVWKKGLHSY  YDPFVLSVQP  VVFQACEVNL  TLDNRDLSQG  VLSTPYFPSY  YSPQTHCSWH
36  LTVPSLDYGL  ALWFDAYALR  RQKYDLPCTQ  GQWTIQNRRL  CGLRILQPYA  ERI PVVATAG
42  ITINFTSQIS  LTGPGVRVHY  GLYNQSDPCP  GEFLCSVNGL  CVPACDGVKD  CPNGLDERNC
48  VCRATFQCKE  DSTCISLPKV  CDGQPDCLNG  SDEEQCEGV  PCGTFTFQCE  DRSCVKKPNP
54  QCDGRPD CRD  GSDEEHDCDG  LQGPSSRIVG  GAVSSEGEWP  WQASLQVRGR  HICGGALIAD
60  RWVITAAHCF  QEDSMAS TVL  WTVFLGKVWQ  NSRWPGEVSF  KVSRLLLHPY  HEEDSHDYDV
66  ALLQLDHPVV  RSAAVRPVCL  PARSHFFEPG  LHCWITGWGA  LREGALRADA  VALFYGWRNQ
72  GSETCCCPIS  NALQKADVQL  IPQDLCSEVY  RYQVTPRMLC  AGYRKGKKA  CQGDSSGGPLV
78  CKALSGRWFL  AGLVSWGLGC  GRPNYFGVYT  RITGVISWIQ  QVVT (SEQ ID NO:3)

```

Под фразой "молекула нуклеиновой кислоты TMPRSS6" понимают полинуклеотид, кодирующий
полипептид TMPRSS6 (матриптазу-2; MT2). Иллюстративная последовательность молекулы нуклеино-
вой кислоты TMPRSS6 представлена в NCBI под номером доступа NM 001289000. Ниже представлена
последовательность нуклеиновой кислоты TMPRSS6, имеющая G в нуклеотидном положении 2321 ("ал-
лель G"; "основной аллель"):

```

1  GGACAAACAG  AGGCTCCTGA  GGCCTGTGTG  CAGGCCCGGC  ACCTATCTGC  CGCTCCCAA
61  GGATGCCCGT  GGCCGAGGCC  CCCAGGTGG  CTGGCGGGCA  GGGGACGGA  GGTGATGGCG
121  AGGAAGCGGA  GCCGAGGGG  ATGTTCAAGG  CCTGTGAGGA  CTCCAAGAGA  AAAGCCGGG
181  GCTACCTCCG  CTTGGTGCC  CTGTTTGTGC  TGCTGGCCCT  GCTCGTGCTG  GCTTCGGCGG
241  GGGTGCTACT  CTGGTATTTC  CTAGGGTACA  AGGCGGAGGT  GATGGTCAGC  CAGGTGCTACT

```

301 CAGGCAGTCT GCGTGTACTC AATCGCCACT TCTCCCAGGA TCTTACCCGC CGGGAATCTA
 361 GTGCCTTCCG CAGTGAAACC GCCAAAGCCC AGAAGATGCT CAAGGAGCTC ATCACCAGCA
 421 CCCGCCTGGG AACTTACTAC AACTCCAGCT CCGTCTATTG CTTTGGGGAG GGACCCCTCA
 481 CCTGCTTCTT CTGGTTCATT CTCCAATCC CCGAGCACCG CCGGCTGATG CTGAGCCCCG
 541 AGGTGGTGCA GGCACCTGCTG GTGGAGGAGC TGCTGTCCAC AGTCAACAGC TCGGCTGCCG
 601 TCCCCTACAG GGCCGAGTAC GAAGTGGACC CCGAGGGCCT AGTGATCCTG GAAGCCAGTG
 661 TGAAAGACAT AGCTGCATTG AATTCACGC TGGGTGTGTA CCGCTACAGC TACGTGGGCC
 721 AGGGCCAGGT CCTCCGGCTG AAGGGGCCTG ACCACCTGGC CTCCAGCTGC CTGTGGCACC
 781 TGCAGGGCCC CAAGGACCTC ATGCTCAAAC TCCGGCTGGA GTGGACGCTG GCAGAGTGCC
 841 GGGACCGACT GGCCATGTAT GACGTGGCCG GGCCCTGGA GAAGAGGCTC ATCACCTCGG
 901 TGTACGGCTG CAGCCGCCAG GAGCCCGTGG TGGAGTTCT GCGCTCGGGG GCCATCATGG
 961 CGGTCTGCTG GAAGAAGGGC CTGCACAGCT ACTACGACCC CTTCTGTGTC TCCGTGCAGC
 1021 CCGTGGTCTT CCAGGCCTGT GAAGTGAACC TGACGCTGGA CAACAGGCTC GACTCCCAGG
 1081 GCGTCCCTCAG CACCCCGTAC TTCCCAGCT ACTACTCGCC CCAAACCCAC TGCTCCTGGC
 1141 ACCTCACGGT GCCCTCTCTG GACTACGGCT TGGCCCTCTG GTTTGATGCC TATGCACTGA
 1201 GGGAGCAGAA GTATGATTTG CCGTGCACCC AGGGCCAGTG GACGATCCAG AACAGGAGGC
 1261 TGTGTGGCTT GCGCATCCTG CAGCCCTACG CCGAGAGGAT CCCCCTGGTG GCCACGGCCG
 1321 GGATCACCAT CAACTTCACC TCCCAGATCT CCCTCACCGG GCCCGTGTG CGGGTGCACT
 1381 ATGGCTTGTG CAACCAGTCG GACCCCTGCC CTGGAGAGTT CCTCTGTTCT GTGAATGGAC
 1441 TCTGTGTCCC TGCCCTGTGAT GGGGTCAAGG ACTGCCCAA CCGCCTGGAT GAGAGAAACT
 1501 GCGTTTGCAG AGCCACATTC CAGTGCAAAG AGGACAGCAC ATGCATCTCA CTGCCAAGG
 1561 TCTGTGATGG GCAGCCTGAT TGTCTCAACG GCAGCGACGA AGAGCAGTGC CAGGAAGGGG
 1621 TGCCATGTGG GACATTCACC TTCCAGTGTG AGGACCGGAG CTGCGTGAAG AAGCCCAACC
 1681 CGCAGTGTGA TGGGCGGCC GACTGCAGGG ACGGCTCGGA TGAGGAGCAC TGTGACTGTG
 1741 GCCTCCAGGG CCCCTCCAGC CGCATTGTTG GTGGAGCTGT GTCCTCCGAG GGTGAGTGGC
 1801 CATGGCAGGC CAGCCTCCAG GTTCGGGGTC GACACATCTG TGGGGGGGCC CTCATCGCTG
 1861 ACCGCTGGGT GATAACAGCT GCCCACTGCT TCCAGGAGGA CAGCATGGCC TCCACGGTGC
 1921 TGTGGACCGT GTTCTGGGG AAGGTGTGGC AGAACTCGCG CTGGCCTGGA GAGGTGTCTT
 1981 TCAAGGTGAG CCGCCTGCTC CTGCACCCGT ACCACGAAGA GGACAGCCAT GACTACGACG
 2041 TGGCGCTGCT GCAGCTCGAC CACCCGGTGG TGGCTCGGC CGCCGTGCGC CCCGTCTGCC
 2101 TGCCCGCGCG CTCCCCTTC TTCCAGCCCG GCCTGCACTG CTGGATTACG GGCTGGGGCG
 2161 CCTTGC CGGA GGGCGCCCTA CGGGCGGATG CTGTGGCCCT ATTTTATGGA TGGAGAAACC
 2221 AAGGCTCAGA GACATGTTGC TGCCCCATCA GCAACGCTCT GCAGAAAGTG GATGTGCAGT
 2281 TGATCCCACA GGACCTGTGC AGCGAGGTCT ATCGCTACCA GGTGACGCCA CGCATGCTGT
 2341 GTGCCGGCTA CCGCAAGGGC AAGAAGGATG CCTGTCAGGG TGACTCAGGT GGTCCGCTGG
 2401 TGTGCAAGGC ACTCAGTGGC CGCTGGTTCC TGGCGGGGCT GGTGAGCTGG GGCCTGGGCT
 2461 GTGGCCGGCC TAACTACTTC GCGCTCTACA CCCGCATCAC AGGTGTGATC AGCTGGATCC
 2521 AGCAAGTGGT GACCTGAGGA ACTGCCCCCC TGCAAAGCAG GGCCACCTC CTGGACTCAG
 2581 AGAGCCCAGG GCAACTGCCA AGCAGGGGGA CAAGTATTCT GGCGGGGGGT GGGGGAGAGA
 2641 GCAGGCCCTG TGGTGGCAGG AGGTGGCATC TTGTCTCGTC CCTGATGTCT GCTCCAGTGA
 2701 TGGCAGGAGG ATGGAGAAGT GCCAGCAGCT GGGGTCAAG ACGTCCCCTG AGGACCCAGG
 2761 CCCACACCCA GCCCTTCTGC CTCCAATTC TCTCTCTCC GTCCCCTTC TCCACTGCTG
 2821 CCTAATGCAA GGCAGTGGCT CAGCAGCAAG AATGCTGGTT CTACATCCCG AGGAGTGTCT
 2881 GAGGTGCGCC CCACTCTGTA CAGAGGCTGT TTGGGAGCC TTGCCTCCAG AGAGCAGATT
 2941 CCAGCTTCGG AAGCCCTGG TCTAACTTGG GATCTGGGAA TGGGAAGGTGC TCCATCGGA
 3001 GGGGACCTC AGAGCCCTGG AGACTGCCAG GTGGGCTGC TGCCACTGTA AGCCAAAAGG
 3061 TGGGGAAGTC CTGACTCCAG GGTCTTGCC CCACCCCTGC CTGCCACCTG GGCCCTCACA
 3121 GCCCAGACCC TCACTGGGAG GTGAGCTCAG CTGCCCTTG GAATAAAGCT GCCTGATCCA
 3181 AAAAAAAAAA AAAAAA (SEQ ID NO:4)

Ниже представлена последовательность нуклеиновой кислоты TMPRSS6, имеющая А в нуклеотидном положении 2321:

1 GGACAAACAG AGGCTCCTGA GGCCTGTGTG CAGGCCCGGC ACCTATCTGC CGCTCCCAAA
 61 GGATGCCCGT GGCCGAGGCC CCCCAGGTGG CTGGCGGGCA GGGGGACGGA GGTGATGGCG
 121 AGGAAGCGGA GCCGGAGGGG ATGTTCAAGG CCTGTGAGGA CTCCAAGAGA AAAGCCCGGG
 181 GCTACCTCCG CCTGGTGCCC CTGTTTGTGC TGCTGGCCCT GCTCGTGCTG GCTTCGGCGG
 241 GGGTGCTACT CTGGTATTTT CTAGGGTACA AGGCGGAGGT GATGGTCAGC CAGGTGTA
 301 CAGGCAGTCT GCGTGACTC AATCGCCACT TCTCCCAGGA TCTTACCCGC CGGGAATCTA
 361 GTGCCTTCCG CAGTGAAACC GCCAAAGCCC AGAAGATGCT CAAGGAGCTC ATCACCAGCA
 421 CCCGCCTGGG AACTTACTAC AACTCCAGCT CCGTCTATTC CTTTGGGGAG GGACCCCTCA
 481 CCTGCTTCTT CTGGTTCATT CTCCAAATCC CCGAGACCG CCGGCTGATG CTGAGCCCCG
 541 AGGTGGTGCA GGCACGCTG GTGGAGGAGC TGCTGTCCAC AGTCAACAGC TCGGCTGCCG
 601 TCCCCTACAG GGCCGAGTAC GAAGTGGACC CCGAGGCCCT AGTGATCCTG GAAGCCAGTG
 661 TGAAAGACAT AGCTGCATTG AATTCACGC TGGTTGTTA CCGCTACAGC TACGTGGGCC
 721 AGGGCCAGGT CCTCCGGCTG AAGGGGCCCTG ACCACCTGGC CTCCAGCTGC CTGTGGCACC
 781 TGCAGGGCCC CAAGGACCTC ATGCTCAAAC TCCGGCTGGA GTGGACGCTG GCAGAGTGCC
 841 GGGACCGACT GGCCATGTAT GACGTGGCCG GGCCCTGGA GAAGAGGCTC ATCACCTCGG
 901 TGTACGGCTG CAGCCGCCAG GAGCCCGTGG TGGAGTTCT GGCCTCGGGG GCCATCATGG
 961 CGGTCGTCTG GAAGAAGGGC CTGCACAGCT ACTACGACCC CTTCGTGCTC TCCGTGCAGC
 1021 CGGTGGTCTT CCAGGCCTGT GAAGTGAACC TGACGCTGGA CAACAGGCTC GACTCCCAGG
 1081 GCGTCCTCAG CACCCCGTAC TTCCCAGCT ACTACTCGCC CCAAACCCAC TGCTCCTGGC
 1141 ACCTCACGGT GCCCTCTCTG GACTACGGCT TGGCCCTCTG GTTTGATGCC TATGACTGA
 1201 GGAGGCAGAA GTATGATTTG CCGTGCACCC AGGGCCAGTG GACGATCCAG AACAGGAGGC
 1261 TGTGTGGCTT GCGCATCCTG CAGCCCTACG CCGAGAGGAT CCCCCTGGTG GCCACGGCCC
 1321 GGATCACCAT CAACTTCACC TCCCAGATCT CCCTCACCGG GCCCGGTGTG CGGGTGCACT
 1381 ATGGCTTGTA CAACCAGTCG GACCCCTGCC CTGGAGAGTT CCTCTGTTCT GTGAATGGAC
 1441 TCTGTGTCCC TGCCTGTGAT GGGGTCAAGG ACTGCCCAA CGGCCTGGAT GAGAGAACT
 1501 GCGTTTGCAG AGCCACATTC CAGTGCAAAG AGGACAGCAC ATGCATCTCA CTGCCAAGG
 1561 TCTGTGATGG GCAGCCTGAT TGTCTCAACG GCAGCGACGA AGAGCAGTGC CAGGAAGGGG
 1621 TGCCATGTGG GACATTCACC TTCCAGTGTG AGGACCGGAG CTGCGTGAAG AAGCCCAACC

```

1681 CGCAGTGTGA TGGGCGGCC GACTGCAGGG ACGGCTCGGA TGAGGAGCAC TGTGACTGTG
1741 GCCTCCAGGG CCCCTCCAGC CGCATGTGTTG GTGGAGCTGT GTCCTCCGAG GGTGAGTGGC
1801 CATGGCAGGC CAGCCTCCAG GTTCGGGGTC GACACATCTG TGGGGGGGCC CTCATCGCTG
1861 ACCGCTGGGT GATAACAGCT GCCCACTGCT TCCAGGAGGA CAGCATGGCC TCCACGGTGC
1921 TGTGGACCGT GTTCCTGGGC AAGGTGTGGC AGAACTCGCG CTGGCCTGGA GAGGTGTCTT
1981 TCAAGGTGAG CCGCCTGCTC CTGCACCCGT ACCACGAAGA GGACAGCCAT GACTACGACG
2041 TGGCGCTGCT GCAGCTCGAC CACCCGGTGG TGGCTCGGC CGCCGTGCGC CCCGTCTGCC
2101 TGCCCGCGCG CTCCTCACTT CTTGAGCCCG GCCTGCACTG CTGGATTACG GGCTGGGGCG
2161 CCTTGC CGCA GGGCGCCCTA CGGGCGGATG CTGTGGCCCT ATTTTATGGA TGGAGAAACC
2221 AAGGCTCAGA GACATGTTGC TGCCCCATCA GCAACGCTCT GCAGAAAGTG GATGTGCAGT
2281 TGATCCACA GGACCTGTGC AGCGAGGTCT ATCGCTACCA AGTGACGCCA CGCATGCTGT
2341 GTGCCGGCTA CCGCAAGGGC AAGAAGGATG CCTGTCAGGG TGA CT CAGGT GGTCCGCTGG
2401 TGTGCAAGGC ACTCAGTGGC CGCTGGTTCC TGGCGGGGCT GGTGAGCTGG GGCCTGGGCT
2461 GTGGCCGCC TAACTACTTC GCGCTTACA CCCGCATCAC AGGTGTGATC AGCTGGATCC
2521 AGCAAGTGGT GACCTGAGGA ACTGCCCCCT TGCAAAGCAG GGCCACCTC CTGGACTCAG
2581 AGAGCCAGG GCAACTGCCA AGCAGGGGGA CAAGTATTCT GGGGGGGGT GGGGGAGAGA
2641 GCAGGCCCTG TGGTGGCAGG AGGTGGCATC TTGTCTCGTC CCTGATGTCT GCTCCAGTGA
2701 TGGCAGGAGG ATGGAGAAGT GCCAGCAGCT GGGGGTCAAG ACGTCCCTG AGGACCCAGG
2761 CCCACACCCA GCCCTTCTGC CTCCCAATTC TCTCTCTCC GTCCCTTCC TCCACTGCTG
2821 CCTAATGCAA GGCAGTGGCT CAGCAGCAAG AATGCTGGT CTACATCCCG AGGAGTGTCT
2881 GAGGTGCGCC CCACTCTGTA CAGAGGCTGT TTGGGCAGCC TTGCCTCCAG AGAGCAGATT
2941 CCAGCTTCGG AAGCCCCTGG TCTAACTTGG GATCTGGGAA TGGAAGGTGC TCCCATCGGA
3001 GGGGACCTC AGAGCCCTGG AGACTGCCAG GTGGGCTGC TGCCACTGTA AGCCAAAAGG
3061 TGGGGAAGTC CTGACTCCAG GGTCTTGCC CCACCCCTGC CTGCCACCTG GGCCTCACA
3121 GCCCAGACCC TCACTGGGAG GTGAGCTCAG CTGCCCTTG GAATAAAGCT GCCTGATCCA
3181 AAAAAAAAAA AAAAAA (SEQ ID NO:5)

```

Под "вариантом" понимают полинуклеотидную или полипептидную последовательность, которая отличается от эталонной последовательности по одному или нескольким нуклеотидам или по одной или нескольким аминокислотам. Иллюстративным вариантом TMPRSS6 является TMPRSS6 (A736V), полученный в результате SNP rs855791 (G→A).

Под "однонуклеотидным полиморфизмом" или "SNP" понимают встречающийся в природе вариант последовательности ДНК, в котором один нуклеотид в геноме отличается среди представителей биологических видов или спаренных хромосом у индивидуума. SNP можно применять в качестве генетических маркеров для вариантных аллелей. В соответствии с одним вариантом осуществления, SNP TMPRSS6 представляет собой rs855791.

Под "rs855791" понимают однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в гене TMPRSS6 человека, 2321G→A, приводящий к замене аланина на валин (A736V) в каталитическом домене матриптазы-2 (MT2), которая кодируется геном TMPRSS6. Аллелем с наивысшей частотой в популяции человека (основным аллелем) является 2321G, кодирующий 736A. Аллелем с наименьшей частотой в популяции человека (минорным аллелем) является 2321A, кодирующий 736V.

Под "гетерозиготным" понимают, что хромосомный локус имеет два различных аллеля. В соответствии с одним вариантом осуществления описанных в настоящем документе способов, гетерозиготный обозначает генотип, в котором один аллель имеет последовательность нуклеиновой кислоты TMPRSS6, кодирующую полипептид TMPRSS6, имеющий аланин в аминокислотном положении 736 (например, имеющую G или C в нуклеотидном положении 2321 молекулы нуклеиновой кислоты TMPRSS6) (основной аллель rs855791), а другой аллель имеет вариантную последовательность нуклеиновой кислоты TMPRSS6, кодирующую полипептид TMPRSS6, содержащий валин в аминокислотном положении 736 (например, имеющую A или T в нуклеотидном положении 2321 молекулы нуклеиновой кислоты TMPRSS6) (минорный аллель rs855791).

Под "гомозиготным" понимают, что хромосомный локус имеет два идентичных аллеля. В соответствии с конкретными вариантами осуществления описанных в настоящем документе способов, гомозиготный обозначает генотип, в котором оба аллеля имеют последовательность нуклеиновой кислоты TMPRSS6, кодирующую полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736 (например, имеющую G или C в нуклеотидном положении 2321 молекулы нуклеиновой кислоты TMPRSS6) (гомозиготный основной аллель rs855791). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, гомозиготный обозначает генотип, в котором оба аллеля имеют последовательность нуклеиновой кислоты TMPRSS6, кодирующую полипептид TMPRSS6, содержащий валин в аминокислотном по-

ложении 736 (например, имеющую А или Т в нуклеотидном положении 2321 молекулы нуклеиновой кислоты TMRSS6) (гомозиготный минорный аллель rs855791).

"Определение того, что пациент имеет по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMRSS6", включает, без ограничения, осуществление анализа для определения того, что пациент имеет по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMRSS6; заказ анализа для определения того, что пациент имеет по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMRSS6; предписание анализа для определения того, что пациент имеет по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMRSS6; иным способом направление или контроль того, что осуществлен анализ для определения того, что пациент имеет по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMRSS6; и изучение данных анализа генотипа TMRSS6 или данных о последовательности белка или нуклеиновой кислоты для определения того, что пациент имеет по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMRSS6.

Под термином "интерлейкин 6 (IL-6)" или "полипептид IL-6" понимают полипептид или его фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85% или более идентична аминокислотной последовательности, представленной в NCBI под номером доступа NP_000591, и обладающий биологической активностью IL-6. IL-6 является плеотропным цитокином с множеством биологических функций. К иллюстративным биологическим активностям IL-6 относятся иммуностимулирующая и провоспалительная активности. Ниже представлена иллюстративная аминокислотная последовательность IL-6:

```

1 MCVGARRLGR GPCAALLLLG LGLSTVTGLH CVGDTYPSND RCCHECRPGN GMVSRCSRSQ
61 NTVCRPCGPG FYNDVVSKEP CKPWTWCNLR SGSEKQLCT ATQDTVCRCR AGTQPLDSYK
121 PGVDCAPCPP GHFSPGDNQA CKPWTNCTLA GKHTLQPASN SSDAICEDRD PPATQPQETQ
181 GPPARPITVQ PTEAWPRTSQ GPSTRPVEVP GGRAVAAILG LGLVLGLLGP LAILLALYLL
241 RRDQRLPPDA HKPPGGGSFR TPIQEQQADA HSTLAKI (SEQ ID NO:6)

```

Под термином "нуклеиновая кислота интерлейкина 6 (IL-6)" понимают полинуклеотид, кодирующий полипептид интерлейкина 6 (IL-6). Иллюстративная последовательность нуклеиновой кислоты интерлейкина 6 (IL-6) представлена в NCBI под номером доступа NM 000600. Ниже представлена иллюстративная последовательность в NCBI под номером доступа NM 000600:

```

1 AATATTAGAG TCTCAACCCC CAATAAATAT AGGACTGGAG ATGCTCTGAGG CTCATTCTGC
61 CCTCGAGCCC ACCGGGAACG AAAGAGAAGC TCTATCTCCC CTCCAGGAGC CCAGSTATGA
121 ACTCCTTCTC CACAAGCGCC TTCGGTCCAG TTGCCTTCTC CCTGGGGCTG CTCCTGGTGT
181 TGCCTGCTGC CTTCCCTGCC CCAGTACCCC CAGGAGAAGA TTCCAAGAT GTAGCCGCCC
241 CACACAGACA GCCACTCACC TCTTCAGAAC GAATTGACAA ACAAATTCGG TACATCCTCG
301 ACGGCATCTC AGCCCTGAGA AAGGAGACAT GTAACAAGAG TAACATGTGT GAAAGCAGCA
361 AAGAGGCACT GGCAGAAAAC AACCTGAACC TTCCAAGAT GGCTGAAAAA GATGGATGCT
421 TCCAATCTGG ATTCAATGAG GAGACTTGCC TGGTGAAAAT CATCACTGGT STTTTGGAGT
481 TTGAGGTATA CBTAGAGTAC CTCCAGAACA GATTTGAGAG TAGTGAGGAA CAAGCCAGAG
541 CTGTGCAGAT GAGTACAAAA GTCTGTATCC AGTTCTCTGCA GAAAAAGGCA AAGAATCTAG
601 ATGCAATAAC CACCCCTGAC CCAACCACAA ATGCCAGCCT GCTGACGAAG CTGCAGGCAC
661 AGAACCAGTG GCTGCAGGAC ATGACAATC ATCTCATCTT GCGCAGCTTT AAGGAGTTCC
721 TGCAGTCCAG CCTGAGGGCT STTCGGCAA TGTAGCATGG GCACCTCAGA TTGTTGTTGT
781 TAATGGGCAT TCSTTCTTCT GGTCAGAAAC CTGTCCACTG GGCACAGAAC TTAATGTTGT
841 CTCTATGGAG AACTAAAAGT ATGAGCGTTA GGACACTAT TTAATTATTT TTAATTTATT
901 AATATTAAA TATGTGAAGC TGAGTTAATT TATGTAAGTC ATATTTATAT TTTAAGAAG
961 TACCACTTGA AACATTTTAT GTATAGTTT TGAATAATA ATGGAAAGTG GCTATGCAGT
1021 TTGAATATCC TTTGTTTCAG AGCCAGATCA TTTCTTGAA AGTGTAGGCT TACSTCAAA
1081 AAATGGCTAA CTTATACATA TTTTAAAGA AATATTTATA TTGATTTAT ATAATGTATA
1141 AATGGTTTTT ATACCAATAA ATGGCATTTT AAAAAATTC AAAAAAATAA AAAAAAATAA
1201 A (SEQ ID NO:7)

```

Под "рецепторным комплексом интерлейкина 6 (IL-6R)" понимают белковый комплекс, содержащий альфа-субъединицу рецептора IL-6 (IL-6R α) и переносчик сигнала интерлейкина 6 гликопротеин 130, также называемый Р-субъединицей рецептора интерлейкина 6 (IL-6R β).

Под "полипептидом α -субъединицы рецептора интерлейкина 6 (IL-6R α)" понимают полипептид или его фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85% или более идентична аминокислотной последовательности, представленной в NCBI под номером доступа NP 000556 или NP 852004, и обладающий биологической активностью рецептора IL-6. К иллюстративным биологическим активностям относятся связывание с IL-6, связывание с гликопротеи-

ном 130 (gp130) и регуляция клеточного роста и дифференцировки. Ниже представлена иллюстративная последовательность IL-6R:

```

1 MLAVGCALLA ALLAAPGAAL APRRCPAQEV ARGVLTSLPG DSVTLTCEPGV EPEDNATVHW
61 VLRKPAAGSH PSRWAGMGR LLLRSVQLHD SGNYSYRAG RPAGTVHLLV DVPPEEPQLS
121 CFRKSPLSNV VCEWGPSTP SLTTKAVLLV RKFQNSPAED FQEPQYSQE SQKFSCQLAV
181 PEGDSSFYIV SMCVASSVGS KFSKTQTFQG CGILQPDPPA NITVTAVARN PRWLSVTWQD
241 PHSWNSSFYR LRFELRYRAE RSKTFTTWMV KDLQNHCVIH DAWSGLRHVV QLRAQEEFGQ
301 GEWSEWSPEA MGTPTWESRS PPAENEVSTP MQALTTNKDD DNILFRDSAN ATSLPVDSS
361 SVPLPTFLVA GGSALFGLL CIAIVLRFKK TWKLRALKEG KTSMHPPYSL GQLVPERPRP
421 TPVLVPLISP PVSSSLGSD NTSSHNRPDA RDRSPYDIS NTDYFFPR (SEQ ID NO:8)

```

Под "полипептидом β -субъединицы рецептора интерлейкина 6 (IL-6R β)" понимают полипептид или его фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85% или более идентична аминокислотной последовательности, представленной в NCBI под номером доступа NP 002175, NP 786943 или NP 001177910, и обладающий биологической активностью рецептора IL-6. К иллюстративным биологическим активностям IL-6R β относятся связывание с IL-6R α , сигнальная активность рецептора IL-6 и регуляция клеточного роста, клеточной дифференцировки, экспрессии гепсидина и т.д. Ниже представлена иллюстративная последовательность IL-6R β :

```

1 MLTLQTLVQ ALFIFLTES TGEELDPCGY ISPESPVVQL HSNFTAVCVL KEKCMDYFHV
61 NANYIVWKTN HFTIPKEQYT IINRTASSVT FTDIASLNIQ LTCNLTFTGQ LEQNVYGITI
121 ISGLPPEKPK NLSCIVNEGK KMRCEWDGGR ETHLETNFTL KSEWATHKFA DCAKARDTPT
181 SCTVDYSTVY FVNIEVWVEA ENALGKVTSD HINFDPVYKV KPNPPHNSLV INSEELSSIL
241 KLTWTNPSIK SVIILKYNIQ YRTKDASTWS QIPPEDTAST RSSFTVQDLK PFTEYVFRIR
301 CMKEDGKGYW SDWSEEASGI TYEDRPSKAP SFWYKIDPSH TQGYRTVQLV WKTLPPEFAN
361 GKILDYEVTL TRWKSHLQNY TVNATKLTVN LTNDRYLATL TVRNLVGKSD AAVLTIPACD
421 FQATHPVM DL KAFPKDNMLW VEWTTPRESV KKYILEWCVL SDKAPCITDW QQEDGTVHRT
481 YLRGNLAESK CYLITVTPVY ADGPGSPESI KAYLKQAPPS KGPTVRTKKV GKNEAVLEWD
541 QLPVDVQNGF IRNYTIFYRT IIGNETAVNV DSSHTEYTLS SLTSDTLYMV RMAAYTDEGG
601 KDGPEFTFTT PKFAQGEIEA IVVPVCLAF LTTLLGVLFK FNKRDLIKKH IWPVNPDPK
661 SHIAQWSPHT PPRHNFNSKD QMYSNGNFTD VSVVEIEAND KKPFPEDLKS LDLFKKKEIN
721 TEGHSSGIGG SSCMSSSRPS ISSSDENESS QNTSSTVQYS TVVHSGYRHQ VPSVQVFSRS
781 ESTQPLDSE ERPEDLQLVD HVDGGDILP RQYFKQNC QHESPDISH FERSKQVSSV
841 NEEFDVRLKQ QISDNISQSC GSGQMKMFQE VSAADAFGPG TEGQVERFET VGMEATDEG
901 MPKSYLPQTV RQGGYMPQ (SEQ ID NO:9)

```

Под "антагонистом IL-6" понимают средство, которое способно понизить биологическую активность IL-6. К антагонистам IL-6 относятся средства, которые понижают уровень полипептида IL-6 в сыворотке крови, в том числе средства, которые понижают экспрессию полипептида или нуклеиновой кислоты IL-6, средства, которые понижают способность IL-6 связываться с IL-6R, средства, которые понижают экспрессию IL-6R, и средства, которые понижают передачу сигнала с помощью рецептора IL-6R при связывании с IL-6. В соответствии с предпочтительными вариантами осуществления, антагонист IL-6 понижает биологическую активность IL-6 по меньшей мере приблизительно на 10, 20, 30, 50, 70, 80, 90, 95 или даже на 100%. В представленном ниже разделе 6.7 дополнительно описано, что к антагонистам IL-6 относятся связывающие IL-6 полипептиды, такие как антитела к IL-6 и их антигенсвязывающие фрагменты или производные; связывающие IL-6R полипептиды, такие как антитела к IL-6R и их антигенсвязывающие фрагменты или производные; и синтетические химические молекулы, такие как ингибиторы JAK1 и JAK3.

Под "IL-6 антителом" или "антителом к IL-6" понимают антитело, которое специфически связывает IL-6. К антителам к IL-6 относятся моноклональные и поликлональные антитела, которые являются специфическими к IL-6, и их антигенсвязывающие фрагменты или производные. IL-6 антитела описаны более подробно в представленном ниже разделе 6.7.1.

Под "опосредованным IL-6 воспалительным нарушением" понимают любое нарушение, для которого известно или предполагают, что IL-6 вносит вклад в этиологию заболевания или любого из его симптомов.

Под "эритропоэтином (ЕРО)" понимают полипептид или его фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85% или более идентична аминокислотной последовательности, представленной в NCBI под номером доступа NP 000790, и обладающий биологической активностью ЕРО. К иллюстративным биологическим активностям ЕРО относятся связывание с рецептором эритропоэтина и происходящая в результате пролиферация и конечная дифференци-

ровка эритроидных клеток-предшественников и/или повышение эритропоэза (выработки эритроцитов). Ниже представлена иллюстративная аминокислотная последовательность ЕРО:

```

1  MGVNECPAWL WLLLSLLSLP LGLPVLGAPP RLICDSRVLE RYLLEAKEAE NITTGCAEHC
61  SLNENITVPD TKVNFYAWKR MEVGQQAVEV WQGLALLSEA VLRGQALLVN SSQPWEPLQL
121 HVDKAVSGLR SLTTLRALG AQKEAISPPD AASAAPLRTI TADTFRKLFR VYSNFLRGKL
181 KLYTGEACRT GDR (SEQ ID NO:10)

```

Под "стимулирующим эритропоэз средством (ESA)" понимают средство, которое стимулирует эритропоэз. К ESA относятся, без ограничения, ЕРО, дарбэпоэтин (Aranesp), эпоэтин бета (NeoRecormon), эпоэтин дельта (Дуперо), эпоэтин омега (Еромах), эпоэтин зета.

Под "эритропоэтическим фактором" понимают средство, которое увеличивает рост или пролиферацию эритроцита или его клетки-предшественника (например, гемопоэтической стволовой клетки) и/или понижает клеточную гибель эритроцита или его клетки-предшественника. В соответствии с различными вариантами осуществления, к эритропоэтическим факторам относятся стимулирующие эритропоэз средства, стабилизаторы HIF и дополнительное железо.

Под "полипептидом С-реактивного белка (CRP)" понимают полипептид или его фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере приблизительно на 85% или более идентична аминокислотной последовательности, представленной в NCBI под номером доступа NP 000558, и обладающий комплемент-активирующей активностью. Уровни CRP повышаются в ответ на воспаление. Ниже представлена иллюстративная последовательность CRP:

```

1  MEKLLCFLVL TSLSHAFGQT DMSRKAFVFP KESDTSYVSL KAPLTKPLKA FTVCLHFYTE
61  LSSTRGYSIF SYATKRQDNE ILIFWSKDIG YSFTVGGSEI LFEVFEVTVV PVHICTSWES
121 ASGIVEFWVD GKPRVRKSLK KGYTVGAEAS IILGQEQDSF GGNFEQSLSL VGDIGNVNMW
181 DFVLSPEIN TIYLGPFSP NVLNRALKY EVQGEVFTKP QLWP (SEQ ID NO:11)

```

Под "средством" понимают любое соединение или композицию, подходящую для введения при терапии, и к нему определенно относятся химические соединения, белки, в том числе антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, пептиды и молекулы нуклеиновой кислоты.

Под "субъектом" понимают человека или отличного от человека млекопитающего, включая, без ограничения, бычьих, лошадиных, собачьих, овечьих, кошачьих и грызунов, в том числе мышинных и крысиных субъектов. "Пациентом" является субъект-человек.

Применяемые в контексте настоящего описания термины "лечить", "подвергать лечению", "лечение" и т.п. относятся к уменьшению или ослаблению нарушения и/или ассоциированных с ним признаков или симптомов или замедлению или остановке их прогрессирования. Понятно, хотя это и не исключено, что лечение нарушения или состояния не требует полного устранения нарушения, состояния или ассоциированных с ним симптомов.

"Перед началом лечения" означает до первого введения антагониста II-6 в соответствии с описанными в настоящем документе способами. Перед началом лечения не исключает, а зачастую и включает, предварительное введение средств лечения, отличных от антагониста II-6.

В настоящем раскрытии "содержит", "содержащий", "входящий в состав", "имеющий", "включает", "включающий" и их лингвистические варианты имеют значение, приписываемое им в патентном праве США, допускающее наличие дополнительных компонентов, помимо тех, которые явно указаны.

Под "биологическим образцом" понимают любую ткань, клетку, жидкость или другой материал, полученный из организма (например, субъекта-человека). В соответствии с определенными вариантами осуществления, биологическим образцом является сыворотка крови или кровь.

Под "ингибитором ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ)" понимают средство, которое ингибирует у ангиотензин-превращающего фермента биологическую функцию превращения ангиотензина I в ангиотензин II. К ингибиторам АСЕ относятся без ограничения хинаприл, периндоприл, рамиприл, каптоприл, беназеприл, трандолаприл, фозиноприл, лизиноприл, мозексиприл и эналаприл. В соответствии с различными вариантами осуществления, ингибитором АСЕ является периндоприл.

6.3. Другие правила интерпретации.

Если не указано иное, нумерация остатков константного участка антитела соответствует системе нумерации EU по Kabat.

Приведенные ниже в настоящем документе диапазоны понимают как сокращенные для всех значений в пределах такого диапазона, включая указанные конечные точки. Например, в диапазоне от 1 до 50 понимают любое число, комбинацию чисел или поддиапазон из группы, состоящей из 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 и 50.

Если не указано конкретно или не очевидно из контекста, применяемый в контексте настоящего документа термин "или" понимают как включающий. Если не указано конкретно или не очевидно из контекста, применяемые в настоящем документе термины в форме единственного числа понимают в единственном или во множественном числе.

Если не указано конкретно или иным образом не очевидно из контекста, применяемый в настоящем документе термин "приблизительно" понимают как в пределах диапазона нормальной погрешности в настоящей области техники, например в пределах двух стандартных отклонений от среднего значения. Приблизительно можно понимать как в пределах 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, 0,5, 0,1, 0,05 или 0,01% от указанного значения. Если иное не ясно из контекста, все числовые значения, представленные в настоящем документе, модифицированы термином приблизительно.

6.4. Способы лечения опосредованных гепсидином нарушений.

В соответствии с первым аспектом, настоящее изобретение относится к способам лечения опосредованного гепсидином нарушения.

Способы предусматривают введение терапевтически эффективного количества антагониста IL-6 субъекту, обычно пациенту-человеку, который имеет опосредованное гепсидином нарушение, причем субъект был определен как имеющий меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMPRSS6. В соответствии с первой серией вариантов осуществления, субъект ранее был определен как имеющий по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMPRSS6. В соответствии с другой серией вариантов осуществления, способ дополнительно предусматривает более ранний этап определения того, что субъект имеет по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMPRSS6. Как правило, способы предусматривают исключение лечения субъектов, если был получен положительный результат, что они являются гомозиготными по минорному аллелю rs855791 TMPRSS6. Обычно пациент имеет повышенные уровни IL6 в сыворотке крови перед началом лечения.

6.4.1. Опосредованные гепсидином нарушения.

6.4.1.1. Анемия при хроническом заболевании/хроническом воспалении.

В соответствии с различными вариантами осуществления, опосредованное гепсидином нарушение, которое лечат с помощью описанных в настоящем документе способов, представляет собой анемию при хроническом заболевании, также известную как анемия при хроническом воспалении.

В соответствии с различными вариантами осуществления, пациент представляет собой пациента мужского пола и имеет содержание гемоглобина (Hb) перед началом лечения менее 14 г/дл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент мужского пола имеет уровень Hb перед началом лечения 13,0-13,9, 12,0-12,9, 11,0-11,9, 10,0-10,9 или менее 10 г/дл. В соответствии с различными вариантами осуществления, пациент представляет собой пациента женского пола и имеет содержание Hb перед началом лечения менее 12 г/дл. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент женского пола имеет уровень Hb перед началом лечения 11,0-11,9, 10,0-10,9, 9,0-9,9, 8,0-8,9 или менее 8 г/дл. В соответствии с некоторыми такими вариантами осуществления, перед этим пациент был подвергнут лечению с помощью ESA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью железосодержащей добавки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью переливания крови или эритроцитарной массы.

В соответствии с различными вариантами осуществления, пациент представляет собой пациента мужского пола и имеет гематокрит перед началом лечения менее 40%. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент мужского пола имеет гематокрит перед началом лечения менее 39%, менее 38%, менее 37%, менее 36% или менее 35%. В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент мужского пола имеет гематокрит перед началом лечения 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31 или 30%. В соответствии с различными вариантами осуществления, пациент представляет собой пациента женского пола и имеет гематокрит перед началом лечения менее 36%. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент женского пола имеет гематокрит перед началом лечения менее 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27 или 26%. В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент женского пола имеет гематокрит перед началом лечения 35, 34, 33, 32, 31, 30, 29, 28, 27 или 26%. В соответствии с некоторыми такими вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью ESA. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью железосодержащей добавки. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью переливания крови или эритроцитарной массы.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью ESA и имеет нормальное содержание Hb перед началом лечения и/или нормальный гематокрит перед началом лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент представляет собой пациента мужского пола и имеет содержание гемоглобина (Hb) перед началом лечения по меньшей мере 14 г/дл и/или гематокрит перед началом лечения по меньшей мере 40%. В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент представляет собой пациента женского пола и имеет содержание Hb перед началом лечения по меньшей мере 12 г/дл и/или гематокрит по меньшей мере 36%. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, ESA представляет собой EPO. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, ESA представляет собой дарбэпоэтин альфа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью железосодержащей добавки и имеет нормальное содержание Hb перед началом лечения и/или нормальный гематокрит перед началом лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществ-

ления, пациент представляет собой пациента мужского пола и имеет содержание гемоглобина (Hb) перед началом лечения по меньшей мере 14 г/дл и/или гематокрит перед началом лечения по меньшей мере 40%. В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент представляет собой пациента женского пола и имеет содержание Hb перед началом лечения по меньшей мере 12 г/дл и/или гематокрит по меньшей мере 36%.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью переливания цельной крови или эритроцитной массы и имеет нормальное содержание Hb перед началом лечения и/или нормальный гематокрит перед началом лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент представляет собой пациента мужского пола и имеет содержание гемоглобина (Hb) перед началом лечения по меньшей мере 14 г/дл и/или гематокрит перед началом лечения по меньшей мере 40%. В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент представляет собой пациента женского пола и имеет содержание Hb перед началом лечения по меньшей мере 12 г/дл и/или гематокрит по меньшей мере 36%.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для увеличения Hb у пациента выше уровней перед началом лечения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для увеличения гематокрита у пациента выше уровней перед началом лечения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для увеличения как уровней Hb, так и гематокрита выше уровней перед началом лечения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного, чтобы позволить уменьшить у пациента дозу ESA без уменьшения у пациента уровней Hb ниже уровней перед началом лечения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного, чтобы позволить уменьшить у пациента дозу ESA без уменьшения у пациента гематокрита ниже уровней перед началом лечения. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного, чтобы позволить уменьшить у пациента дозу ESA без уменьшения у пациента уровней Hb и гематокрита.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного, чтобы позволить по меньшей мере на 10% уменьшить у пациента дозу ESA по сравнению с дозой ESA перед началом лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного, чтобы позволить по меньшей мере на 20, 30, 40 или 50% уменьшить у пациента дозу ESA по сравнению с дозой ESA перед началом лечения. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного, чтобы позволить по меньшей мере на 60% или даже по меньшей мере на 75% уменьшить дозу ESA у пациента по сравнению с дозой ESA перед началом лечения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для обращения функциональной железодефицитной анемии.

6.4.1.1.1. Хроническая болезнь почек.

В соответствии с различными вариантами осуществления, хроническое заболевание представляет собой хроническую болезнь почек (CKD).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент имеет 1-ю стадию хронической болезни почек KDOQI. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, пациент имеет 2-ю стадию хронической болезни почек KDOQI, 3-ю стадию хронической болезни почек KDOQI, 4-ю стадию хронической болезни почек KDOQI или 5-ю стадию хронической болезни почек KDOQI.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент имеет кардиоренальный синдром (CRS). В соответствии с конкретными вариантами осуществления, пациент имеет CRS 4-го типа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью диализа.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для уменьшения смертности, связанной с сердечно-сосудистым заболеванием (CV), по сравнению с совпадающими по возрасту и по заболеванию историческими когортами.

6.4.1.1.2. Хронические воспалительные заболевания.

В соответствии с различными вариантами осуществления, хроническое заболевание представляет собой хроническое воспалительное заболевание.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, хроническое воспалительное заболевание представляет собой ревматоидный артрит (RA).

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, пациент перед началом лечения имеет показатель DAS28 более 5,1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент перед началом лечения имеет показатель DAS28, составляющий от 3,2 до 5,1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент перед началом лечения имеет показатель DAS28 менее 2,6. В соот-

ветствии с различными вариантами осуществления, RA у пациента перед началом лечения имеет высокую степень активности. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, RA у пациента перед началом лечения имеет среднюю степень активности.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью метотрексата. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, метотрексат прерывают при начале лечения антагонистом IL-6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, лечение с помощью метотрексата продолжают при начале лечения антагонистом IL-6.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью средства против TNF α . В соответствии с отдельными вариантами осуществления, средство против TNF α выбрано из этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, цертолизумаба и голимумаба. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, средство против TNF α прерывают при начале лечения антагонистом IL-6.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью антагониста рецептора IL-1. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антагонистом рецептора IL-1 является анакинра. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, антагонист рецептора IL-1 прерывают при начале лечения антагонистом IL-6.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью абатацепта. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, абатацепт прерывают при начале лечения антагонистом IL-6.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью антагониста IL-6, и способ дополнительно предусматривает продолжение введения антагониста IL-6 только тем пациентам, которые вновь были определены как имеющие по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMPRSS6. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антагонистом IL-6 является тоцилизумаб. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антагонистом IL-6 является тофацитиниб.

В соответствии с различными вариантами осуществления, хроническое воспалительное заболевание выбрано из группы, состоящей из ювенильного идиопатического артрита, анкилозирующего спондилоартрита, бляшечного псориаза, псориатического артрита, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона и язвенного колита.

6.4.1.1.3. Злокачественная опухоль.

В соответствии с различными вариантами осуществления, хроническое заболевание представляет собой злокачественную опухоль.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из солидных опухолей, мелкоклеточной злокачественной опухоли легких, немелкоклеточной злокачественной опухоли легких, гематологической злокачественной опухоли, множественной миеломы, различных форм лейкоза, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелоидного лейкоза (CML), различных форм лимфомы и лимфомы Ходжкина.

6.4.1.1.4. Хроническая инфекция.

В соответствии с различными вариантами осуществления, хроническое заболевание представляет собой хроническую инфекцию.

6.4.1.1.5. Хроническая сердечная недостаточность.

В соответствии с различными вариантами осуществления, хроническое заболевание представляет собой хроническую сердечную недостаточность (CHF).

6.4.1.2. Железорефрактерная и железодефицитная анемия (IRIDA).

В соответствии с различными вариантами осуществления, опосредованное гепсидином нарушение представляет собой железорефрактерную и железодефицитную анемию (IRIDA).

6.4.1.3. Анемия, ассоциированная с вырабатывающими гепсидин формами аденомы печени.

В соответствии с различными вариантами осуществления, опосредованное гепсидином нарушение представляет собой анемию, ассоциированную с вырабатывающей гепсидин аденомой печени.

6.4.1.4. Острый коронарный синдром.

Из данных, представленных в приведенных ниже примерах 2, 3 и 5, видно, что антагонисты IL-6 являются эффективными при уменьшении риска сердечной недостаточности и смертельного исхода и при увеличении сердечной функции и уменьшении фиброза после острого инфаркта миокарда. Соответственно, в соответствии с различными вариантами осуществления, опосредованное гепсидином нарушение представляет собой острый коронарный синдром.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент перенес инфаркт миокарда в течение 60 дней, предшествующих первому введению антагониста IL-6. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, пациент перенес инфаркт миокарда в течение 30 дней, 14 дней, 7 дней, 48 ч или 24 ч, предшествующих первому введению антагониста IL-6.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для улучшения сократимости миокарда по сравнению с уровнями перед

началом лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для улучшения сердечной фракции выброса по сравнению с уровнями перед началом лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для уменьшения фиброза сердца по сравнению с уровнями перед началом лечения.

6.4.1.5. Болезнь Кастлемана.

В соответствии с различными вариантами осуществления, опосредованное гепсидином нарушение представляет собой болезнь Кастлемана.

6.5. Способы улучшения лечения опосредованных гепсидином нарушений.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способам улучшения лечения опосредованного гепсидином нарушения путем прекращения терапии, которая является неэффективной, таким образом уменьшая побочные эффекты и уменьшая затраты без потери эффективности лечения. Способы предусматривают прекращение введения антагониста IL-6 пациенту с опосредованным гепсидином нарушением, причем пациент был определен как гомозиготный по минорному аллелю rs855791 TMRSS6. В соответствии с серией вариантов осуществления, пациент был ранее определен как гомозиготный по минорному аллелю rs855791 TMRSS6. В соответствии с другой серией вариантов осуществления, способ дополнительно предусматривает более ранний этап определения того, что пациент является гомозиготным по минорному аллелю rs855791 TMRSS6. В соответствии с типичными вариантами осуществления, пациент имеет повышенные уровни IL-6 в сыворотке крови перед началом лечения. В соответствии с различными вариантами осуществления, пациент имеет повышенные уровни CRP в сыворотке крови перед началом лечения.

В соответствии с различными вариантами осуществления, пациент имеет опосредованное гепсидином нарушение, выбранное из нарушений, описанных выше в разделе 5.2.1. В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент имеет анемию при хроническом заболевании.

6.6. Способы лечения опосредованных IL-6 воспалительных нарушений.

Из данных, представленных в приведенных ниже примерах 2, 3 и 5, видно, что антагонисты IL-6 дают положительный эффект у субъектов, имеющих повышенные уровни IL-6 перед началом лечения и по меньшей мере одну копию основного аллеля TMRSS6, даже при отсутствии анемии. Следовательно, в соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способам лечения опосредованных IL-6 воспалительных нарушений у пациентов без анемии при хроническом воспалении.

Способы предусматривают введение терапевтически эффективного количества антагониста IL-6 субъекту, обычно пациенту-человеку, который имеет опосредованное IL-6 воспалительное заболевание, причем у пациента отсутствует анемия, и субъект был определен как имеющий по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMRSS6. В соответствии с первой серией вариантов осуществления, субъект ранее был определен как имеющий по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMRSS6. В соответствии с другой серией вариантов осуществления, способ дополнительно предусматривает более ранний этап определения того, что субъект имеет по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMRSS6. Как правило, способы предусматривают исключение субъектов, если был получен положительный результат, что они являются гомозиготными по минорному аллелю rs855791 TMRSS6. Обычно пациент имеет повышенные уровни IL6 в сыворотке крови перед началом лечения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, опосредованное IL-6 нарушение представляет собой ревматоидный артрит (RA).

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, пациент перед началом лечения имеет показатель DAS28 более 5,1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент перед началом лечения имеет показатель DAS28, составляющий от 3,2 до 5,1. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент перед началом лечения имеет показатель DAS28 менее 2,6. В соответствии с различными вариантами осуществления, RA у пациента перед началом лечения имеет высокую степень активности. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, RA у пациента перед началом лечения имеет среднюю степень активности.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью метотрексата. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, метотрексат прерывают при начале лечения антагонистом IL-6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, метотрексат продолжают при начале лечения антагонистом IL-6.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью средства против TNF α . В соответствии с отдельными вариантами осуществления, средство против TNF α выбрано из этанерцепта, адалимумаба, инфликсимаба, цертолизумаба и голимумаба. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, средство против TNF α прерывают при начале лечения антагонистом IL-6.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью антагониста рецептора IL-1. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, анта-

гонистом рецептора IL-1 является анакинра. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, антагонист рецептора IL-1 прерывают при начале лечения антагонистом IL-6.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, пациент был подвергнут лечению с помощью абатацепта. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, абатацепт прерывают при начале лечения антагонистом IL-6.

В соответствии с различными вариантами осуществления, опосредованное IL-6 нарушение выбрано из группы, состоящей из ювенильного идиопатического артрита, анкилозирующего спондилоартрита, бляшечного псориаза, псориатического артрита, воспалительного заболевания кишечника, болезни Крона и язвенного колита.

6.7. Уровни IL-6 и CRP в сыворотке крови перед началом лечения.

В соответствии с типичными вариантами осуществления описанных в настоящем документе способов, пациент имеет повышенные уровни IL-6 в сыворотке крови перед началом лечения.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент имеет уровень IL-6 в сыворотке крови перед началом лечения более 2,5 пг/мл. В соответствии с различными вариантами осуществления, пациент имеет уровень IL-6 в сыворотке крови перед началом лечения более 5 пг/мл, более 7,5 пг/мл, более 10 пг/мл, более 12,5 пг/мл или более 15 пг/мл.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для уменьшения уровней IL-6 в сыворотке крови у пациента ниже уровней перед началом лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой по схеме и в течение периода, достаточного для уменьшения уровней IL-6 в сыворотке крови у пациента по меньшей мере на 10, 20, 30, 40 или 50% по сравнению с уровнями перед началом лечения.

В соответствии с различными вариантами осуществления, пациент перед началом лечения имеет повышенные уровни С-реактивного белка (CRP). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент перед началом лечения имеет уровень С-реактивного белка более 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мг/л. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, пациент имеет уровни CRP перед началом лечения более 7,5, 10, 12,5 или 15 мг/л.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для уменьшения уровней CRP у пациента ниже уровней перед началом лечения. В соответствии с определенными вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят дозой, по схеме и в течение периода, достаточного для уменьшения уровней CRP у пациента по меньшей мере на 10, 20, 30, 40 или 50% по сравнению с уровнями перед началом лечения.

6.8. Генотипирование rs855791 Tmprss6.

Описанные в настоящем документе способы предусматривают введение терапевтически эффективного количества антагониста IL-6 субъекту, который был определен как имеющий по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 Tmprss6. Предпочтительно выявляют оба аллеля, которые соответствуют представляющему интерес гену, что таким образом позволяет выявить и дифференцировать пациентов, которые являются гомозиготными по основному аллелю rs855791 Tmprss6, гетерозиготными по основному и минорному аллелям rs855791 Tmprss6 и гомозиготными по минорному аллелю rs855791 Tmprss6.

Отсутствие (основной аллель) или наличие (минорный аллель) SNP rs855791 (2321G→A) в гене Tmprss6 определяют с помощью стандартных методик.

Как правило, для амплификации полученного от пациента биологического образца применяют ПЦР.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, отсутствие или наличие полиморфизма детектируют одновременно с амплификацией с помощью ПЦР в режиме реального времени (RT-PCR). В соответствии с определенными вариантами осуществления, в RT-PCR-анализе используют 5'-нуклеазу (зонды TaqMan®), молекулярные маяки и/или гибридационные зонды FRET. Обзор см. в работе Espy et al., Clin. Microbiol. Rev. 2006 January; 19(1):165-256, включенной в настоящий документ посредством ссылки в полном ее объеме. В соответствии с типичными вариантами осуществления, применяют коммерчески доступный аналитический набор. В соответствии с выбранными вариантами осуществления, коммерчески доступный аналитический набор выбирают из группы, состоящей из аналитических наборов для генотипирования TaqMan™ SNP Genotyping Assays (ThermoFisher), аналитического набора для генотипирования PCR SNP Genotyping Assay (Qiagen), аналитических наборов для генотипирования Novallele Genotyping Assays (Canon) и аналитических наборов SNP Type™ assays (ранее SNPtype) (Fluidigm).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, отсутствие или наличие полиморфизма детектируют после амплификации с помощью гибридизации с зондом, специфическим к SNP rs855791, расщепления рестрикционными эндонуклеазами, секвенирования нуклеиновой кислоты, достройки праймера, анализа на микрочипе или на геномном чипе, масс-спектрометрии и/или анализа методом защиты от ДНКазы. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, аллельные варианты опреде-

ляют с помощью секвенирования. В соответствии с определенными вариантами осуществления, применяют секвенирование по Сенгеру. В соответствии с определенными вариантами осуществления, применяют одну из ряда методик секвенирования следующего поколения, включая, например, методику секвенирования, выбранную из группы, состоящей из секвенирования на микрочипе, секвенирования Solexa (Illumina), Ion Torrent (Life Technologies), SOLiD (Applied Biosystems), пиросеквенирования, секвенирования отдельных молекул в режиме реального времени (Pacific Bio), нанопорового секвенирования и секвенирования с помощью туннельных токов.

6.9. Антагонисты IL-6.

Антагонист IL-6 применяют в описанных в настоящем документе способах, с помощью которых можно понижать биологическую активность IL-6.

6.9.1. Антитела к IL-6.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой антитело к IL-6 или его антигенсвязывающий фрагмент или производное.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой полноразмерное моноклональное антитело к IL-6. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, полноразмерное моноклональное антитело представляет собой антитело IgG. В соответствии с определенными вариантами осуществления, полноразмерное моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой поликлональную композицию, содержащую множество видов полноразмерных антител к IL-6, причем каждое антитело из такого множества имеет уникальные CDR. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой фрагмент антитела, выбранный из фрагментов Fab, Fab' и F(ab')₂. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой scFv, связанный дисульфидным мостиком Fv(dsFv) или однодоменное антитело, такое как верблюжье V_{HH} однодоменное нанотело. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой иммуноконъюгат или гибрид, содержащий антигенсвязывающий фрагмент IL-6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело является биспецифическим или мультиспецифическим, причем по меньшей мере одна из антигенсвязывающих частей обладает специфичностью к IL-6.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело является полностью человеческим. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело является гуманизированным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело является химерным и имеет отличные от человеческих V участки и домены человеческих C участков. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело является мышинным.

В соответствии с типичными вариантами осуществления, антитело к IL-6 имеет K_D в отношении связывания IL-6 человека менее 100 нМ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к IL-6 имеет K_D в отношении связывания IL-6 человека менее 75, 50, 25, 20, 15 или 10 нМ. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, антитело к IL-6 имеет K_D в отношении связывания IL-6 человека менее 5, 4, 3 или 2 нМ. В соответствии с выбранными вариантами осуществления, антитело к IL-6 имеет K_D в отношении связывания IL-6 человека менее 1 нМ, 750 или 500 пМ. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитело к IL-6 имеет K_D в отношении связывания IL-6 человека не более 500, 400, 300, 200 или 100 пМ.

В соответствии с типичными вариантами осуществления, антитело к IL-6 нейтрализует биологическую активность IL-6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, нейтрализующее антитело предупреждает связывание IL-6 с рецептором IL-6.

В соответствии с типичными вариантами осуществления, антитело к IL-6 имеет период полувыведения после внутривенного введения, составляющий по меньшей мере 7 дней. В соответствии с определенными вариантами осуществления, антитело к IL-6 имеет период полувыведения, составляющий по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 21 день или по меньшей мере 30 дней.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к IL-6 имеет константный участок человеческого IgG по меньшей мере с одной аминокислотной заменой, которая удлиняет период полувыведения в сыворотке крови по сравнению с константным доменом человеческого IgG без замены.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, константный домен IgG содержит замены в остатках 252, 254 и 256, причем аминокислотная замена в аминокислотном остатке 252 представляет собой замену на тирозин, аминокислотная замена в аминокислотном остатке 254 представляет собой замену на треонин, а аминокислотная замена в аминокислотном остатке 256 представляет собой замену на глутаминовую кислоту ("YTE"). См. патент США № 7083784, включенный в настоящий документ посредством ссылки в полном его объеме. В соответствии с конкретными относящимися к удлиненному периоду полувыведения вариантами осуществления, константный домен IgG содержит замены, выбранные из T250Q/M428L (Hinton et al., J. Immunology, 176:346-356 (2006)); N434A (Yeung et al., J. Immunology, 182:7663-7671 (2009)) или T307A/E380A/N434A (Petkova et al., International Immunology, 18:1759-1769 (2006)).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, период полувыведения антитела к IL-6

увеличивают с помощью FcRN-связывающих свойств сывороточного альбумина человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления, антитело конъюгировано с альбумином (Smith et al., *Bioconjug. Chem.*, 12:750-756 (2001)). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к IL-6 гибридизировано с бактериальными альбумин-связывающими доменами (Stork et al., *Prot. Eng. Design Science*, 20:569-76 (2007)). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к IL-6 гибридизировано с альбумин-связывающим пептидом (Nguugen et al., *Prot. Eng. Design Sel.* 19:291-297 (2006)). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к IL является биспецифическим, причем одна специфичность направлена к IL-6, а другая специфичность направлена к сывороточному альбумину человека (Ablynx, WO 2006/122825 (биспецифическое нанотело)).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, период полувыведения антитела к IL-6 увеличивают с помощью ПЭГилирования (Melmed et al., *Nature Reviews Drug Discovery*, 7:641-642 (2008)); с помощью конъюгации с HPMA-сополимером (Lu et al., *Nature Biotechnology*, 17:1101-1104 (1999)); конъюгации с декстраном (*Nuclear Medicine Communications*, 16:362-369 (1995)); конъюгации с гомоаминокислотными полимерами (НАР; ГАПилирование) (Schlappschy et al., *Prot Eng Design Sel.* 20:273-284 (2007)); или полисиалирования (Constantinou et al., *Bioconjug. Chem.* 20:924-931 (2009)).

6.9.1.1. MEDI5117 и производные.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, антитело к IL-6 или его антигенсвязывающая часть содержит все шесть CDR из MEDI5117. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, антитело или его антигенсвязывающая часть содержит V участок тяжелой цепи и V участок легкой цепи из MEDI5117. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитело представляет собой полноразмерное антитело MEDI5117. Антитело MEDI5117 описано в WO 2010/088444 и US 2012/0034212, раскрытия которых включены в настоящий документ посредством ссылки в полном их объеме. Антитело MEDI5117 имеет следующие последовательности CDR и тяжелой и легкой цепей:

MEDI5117 VH CDR1

SNYMI (SEQ ID NO:12)

MEDI5117 VH CDR2

DLYYYAGDTYYADSVKG (SEQ ID NO:13)

MEDI5117 VH CDR3

WADDHPPWIDL (SEQ ID NO:14)

MEDI5117 VL CDR1

RASQGISSWLA (SEQ ID NO:15)

MEDI5117 VL CDR2

KASTLES (SEQ ID NO:16)

MEDI5117 VL CDR3

QQSWLGGG (SEQ ID NO:17)

MEDI5117 Heavy chain

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSNYMIWVRQAPGKGLEWVSDLYYYAGDTYY
ADSVKGRFTMSRDISKNTVYVYLMNSLRAEDTAVYYCARWADDHPPWIDLWGRGTLVTVSS
ASTKGPSVFLPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSS
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHTCPPELGG
PSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYVTLPPSREE
MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:18)

MEDI5117 Light chain

DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPKGKAPKVLIIYKASTLESGVPS
RFSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQSWLGGGFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
DEQLKSGTASVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSTLT
SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:19)

В соответствии с различными вариантами осуществления, антитело к IL-6 представляет собой производное MED5117.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, производное MED5117 включает одну или несколько аминокислотных замен в V участках тяжелой и/или легкой цепи MED5117.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, производное содержит менее 25 аминокислотных замен, менее 20 аминокислотных замен, менее 15 аминокислотных замен, менее 10 аминокислотных замен, менее 5 аминокислотных замен, менее 4 аминокислотных замен, менее 3 аминокислотных замен, менее 2 аминокислотных замен или 1 аминокислотную замену относительно исходного V_H и/или V_L антитела к IL-6 MEDI5117 при сохранении специфичности к IL-6 человека.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, производное MED5117 содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности домена V_H и V_L из MEDI5117. Процент идентичности последовательностей определяют с помощью алгоритмов BLAST с применением параметров по умолчанию.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, производное MED5117 содержит аминокислотную последовательность, в которой CDR содержат аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 45%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 55%, по меньшей мере на 60%, по меньшей мере на 65%, по меньшей мере на 70%, по меньшей мере на 75%, по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности соответствующих CDR из MEDI5117. Процент идентичности последовательностей определяют с помощью алгоритмов BLAST с применением параметров по умолчанию. В соответствии с определенными вариантами осуществления, производные V_H и/или V_L CDR содержат консервативные аминокислотные замены по одному или нескольким спрогнозированным заменимым аминокислотным остаткам (т.е. аминокислотным остаткам, которые не являются крайне необходимыми для антитела для специфического связывания с IL6 человека).

6.4.1.2. Другие антитела к IL-6.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антитело к IL-6 содержит шесть CDR из антитела, выбранного из группы, состоящей из силтуксимаба, герилимзумаба, сирукумаба, клазакизумаба, олокизумаба, эсилимомаба, VX30 (VOP-R003; Vaccinex), EB-007 (EBI-029; Eleven Bio), ARGX-109 (ArGEN-X), FM101 (Femta Pharmaceuticals, Lonza) и ALD518/BMS-945429 (Alder Biopharmaceuticals, Bristol-Myers Squibb). В соответствии с определенными вариантами осуществления, антитело к IL-6 содержит V участок тяжелой цепи и V участок легкой цепи из антитела, выбранного из группы, состоящей из силтуксимаба, герилимзумаба, сирукумаба, клазакизумаба, олокизумаба, VX30 (VOP-R003; Vaccinex), EB-007 (EBI-029; Eleven Bio), ARGX-109 (ArGEN-X), FM101 (Femta Pharmaceuticals, Lonza) и ALD518/BMS-945429 (Alder Biopharmaceuticals, Bristol-Myers Squibb). В соответствии с отдельными вариантами осуществления, антитело к IL-6 является антителом, выбранным из группы, состоящей из силтуксимаба, герилимзумаба, сирукумаба, клазакизумаба, олокизумаба, VX30 (VOP-R003; Vaccinex), EB-007 (EBI-029; Eleven Bio), ARGX-109 (ArGEN-X), FM101 (Femta Pharmaceuticals, Lonza) и ALD518/BMS-945429 (Alder Biopharmaceuticals, Bristol-Myers Squibb).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к IL-6 содержит шесть CDR из антитела, выбранного из описанных в US 2016/0168243, US 2016/0130340, US 2015/0337036, US 2015/0203574, US 2015/0140011, US 2015/0125468, US 2014/0302058, US 2014/0141013, US 2013/0280266, US 2013/0017575, US 2010/0215654, US 2008/0075726, патентов США № 5856135, US 2006/0240012, US 2006/0257407 или патента США № 7291721, раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном их объеме.

6.9.2. Антитела к рецептору IL-6.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой антитело к рецептору IL-6 или его антигенсвязывающий фрагмент или производное.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой полноразмерное моноклональное антитело к рецептору IL-6. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, полноразмерное моноклональное антитело представляет собой антитело IgG. В соответствии с определенными вариантами осуществления, полноразмерное моноклональное антитело представляет собой антитело IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой поликлональную композицию, содержащую множество видов полноразмерных антител к рецептору IL-6, причем каждое антитело из такого множества имеет уникальные CDR. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой фрагмент антитела, выбранный из фрагментов Fab, Fab'. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой scFv, однодоменное антитело, в том числе верблужье V_{HH} однодоменное нанотело. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело является биспецифическим или мультиспецифическим, причем по меньшей мере одна из антигенсвязываю-

ших частей обладает специфичностью к IL-6R.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело является полностью человеческим. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело является гуманизированным. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело является химерным и имеет отличные от человеческих V участки и домены человеческих C участков. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело является мышинным.

В соответствии с типичными вариантами осуществления, антитело к рецептору IL-6 имеет K_D в отношении связывания IL-6R человека менее 100 нМ. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к IL-6R имеет K_D в отношении связывания IL-6R человека менее 75, 50, 25, 20, 15 или 10 нМ. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, антитело к рецептору IL-6 имеет K_D в отношении связывания IL-6R человека менее 5, 4, 3 или 2 нМ. В соответствии с выбранными вариантами осуществления, антитело к рецептору IL-6 имеет K_D в отношении связывания IL-6R человека менее 1 нМ, 750 или 500 пМ. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитело к рецептору IL-6 имеет K_D в отношении связывания IL-6R человека не более 500, 400, 300, 200 или 100 пМ.

В соответствии с типичными вариантами осуществления, антитело к IL-6R уменьшает биологическую активность IL-6.

В соответствии с типичными вариантами осуществления, антитело к IL-6R имеет период полувыведения после внутривенного введения, составляющий по меньшей мере 7 дней. В соответствии с определенными вариантами осуществления, антитело к IL-6R имеет период полувыведения, составляющий по меньшей мере 14 дней, по меньшей мере 21 день или по меньшей мере 30 дней.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к IL-6R имеет константный участок человеческого IgG по меньшей мере с одной аминокислотной заменой, которая удлиняет период полувыведения в сыворотке крови по сравнению с константным доменом человеческого IgG без замены.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, константный домен IgG содержит замены в остатках 252, 254 и 256, причем аминокислотная замена в аминокислотном остатке 252 представляет собой замену на тирозин, аминокислотная замена в аминокислотном остатке 254 представляет собой замену на треонин, а аминокислотная замена в аминокислотном остатке 256 представляет собой замену на глутаминовую кислоту ("YTE"). См. патент США № 7083784, включенный в настоящий документ посредством ссылки в полном его объеме. В соответствии с конкретными относящимися к удлиненному периоду полувыведения вариантами осуществления, константный домен IgG содержит замены, выбранные из T250Q/M428L (Hinton et al., *J. Immunology*, 176:346-356 (2006)); N434A (Yeung et al., *J. Immunology*, 182:7663-7671 (2009)) или T307A/E380A/N434A (Petkova et al., *International Immunology*, 18:1759-1769 (2006)).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, период полувыведения антитела к IL-6R увеличивают с помощью FcRN-связывающих свойств сывороточного альбумина человека. В соответствии с определенными вариантами осуществления, антитело конъюгировано с альбумином (Smith et al., *Bioconjug. Chem.*, 12:750-756 (2001)). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к IL-6R гибридизировано с бактериальными альбумин-связывающими доменами (Stork et al., *Prot. Eng. Design Science*, 20:569-76 (2007)). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к IL-6 гибридизировано с альбумин-связывающим пептидом (Nguyen et al., *Prot. Eng. Design Sel.* 19:291-297 (2006)). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к IL является биспецифическим, причем одна специфичность направлена к IL-6R, а другая специфичность направлена к сывороточному альбумину человека (Ablynx, WO 2006/122825 (биспецифическое нанотело)).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, период полувыведения антитела к IL-6R увеличивают с помощью пэггилирования (Melmed et al., *Nature Reviews Drug Discovery*, 7:641-642 (2008)); с помощью конъюгации с HPMA-сополимером (Lu et al., *Nature Biotechnology*, 17:1101-1104 (1999)); конъюгации с декстраном (*Nuclear Medicine Communications*, 16:362-369 (1995)); конъюгации с гомоаминокислотными полимерами (НАР; ГАПилирование) (Schlapschy et al., *Prot. Eng. Design Sel.* 20:273-284 (2007)); или полисиалирования (Constantinou et al., *Bioconjug. Chem.* 20:924-931 (2009)).

В соответствии с определенными вариантами осуществления, антитело к IL-6R или его антигенсвязывающая часть содержит все шесть CDR из тоцилизумаба. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, антитело или его антигенсвязывающая часть содержит V участок тяжелой цепи и V участок легкой цепи из тоцилизумаба. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитело представляет собой полноразмерное антитело тоцилизумаба.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, антитело к IL-6R или его антигенсвязывающая часть содержит все шесть CDR из сарилумаба. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, антитело или его антигенсвязывающая часть содержит V участок тяжелой цепи и V участок легкой цепи из сарилумаба. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитело представляет собой полноразмерное антитело сарилумаба.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к IL-6R или его антигенсвязывающая часть содержит все шесть CDR из VX30 (Vaccinex), ARGX-109 (arGEN-X), FM101 (Formatech), SA237 (Roche), NI-1201 (NovImmune) или антитела, описанного в US 2012/0225060.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело к IL-6R или его антигенсвязывающая часть представляет собой однодоменное антитело. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, однодоменное антитело является верблужьим VHH однодоменным антителом. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, таким антителом является вобарилизумаб (ALX-0061) (Ablynx NV).

6.9.3. Антитела к комплексу IL-6:IL-6R.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой антитело, специфическое к комплексу из IL-6 и IL-6R. В соответствии с определенными вариантами осуществления, антитело имеет шесть CDR из антитела, выбранного из описанных в US 2011/0002936, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей ее полноте.

6.9.4. Ингибиторы JAK и STAT.

Известно, что IL-6 передает свой сигнал по сигнальному пути JAK-STAT.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антагонист IL6 представляет собой ингибитор сигнального пути JAK. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, JAK-ингибитор представляет собой JAK1-специфический ингибитор. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, JAK-ингибитор представляет собой JAK3-специфический ингибитор. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, JAK-ингибитор представляет собой пан-JAK-ингибитор.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, JAK-ингибитор выбран из группы, состоящей из тофацитиниба (Xeljanz), децрнотиниба, руксолитиниба, упадацитиниба, барицитиниба, филготиниба, лестауртиниба, пакритиниба, пефицитиниба, INCB-039110, АВТ-494, INCB-047986 и АС-410.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой ингибитор STAT3. В соответствии с конкретным вариантом осуществления, ингибитор представляет собой AZD9150 (AstraZeneca, Isis Pharmaceuticals), антисмысловую молекулу STAT3.

6.9.5. Дополнительные антагонисты IL-6.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой антагонистический пептид.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой С326 (ингибитор IL-6 от Avidia, также известный как AMG220) или FE301, рекомбинантный белок, являющийся ингибитором IL-6 (Ferring International Center S.A., Conaris Research Institute AG). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонистическое антитело к IL-6 содержит растворимый gp130, FE301 (Conaris/Ferring).

6.10. Режимы дозирования.

6.10.1. Антитела, антигенсвязывающие фрагменты, пептиды.

В соответствии с типичными вариантами осуществления, антитело, антигенсвязывающие фрагменты и пептидные антагонисты IL-6 вводят парентерально.

В соответствии с некоторыми, связанными с парентеральным введением вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят внутривенно. В соответствии с некоторыми, связанными с внутривенным введением вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят в виде разовой дозы. В соответствии с некоторыми, связанными с внутривенным введением вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят в виде инфузии. В соответствии с некоторыми, связанными с внутривенным введением вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят в виде болюса с последующим введением инфузией. В соответствии с некоторыми, связанными с парентеральным введением вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят подкожно.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антитело, антигенсвязывающий фрагмент и пептидный антагонист IL-6 вводят дозой, которая не зависит от массы или площади поверхности пациента (фиксированной дозой).

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, внутривенная фиксированная доза составляет 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, внутривенная фиксированная доза составляет 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, внутривенная фиксированная доза составляет 25, 30, 40 или 50 мг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, внутривенная фиксированная доза составляет 60, 70, 80, 90 или 100 мг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, внутривенная фиксированная доза составляет 1-10, 10-15, 15-20, 20-30, 30-40 или 40-50 мг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, внутривенная фиксированная доза составляет 1-40 или 50-100 мг.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, подкожная фиксированная доза составляет 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 мг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, подкожная фиксированная доза составляет 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200 мг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, подкожная фиксированная доза составляет 210, 220, 230, 240 или 250 мг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, подкожная фиксированная доза составляет 10-100, 100-200 или 200-250 мг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, подкожная фиксированная доза составляет 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90

или 90-100 мг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, подкожная фиксированная доза составляет 100-125, 125-150, 150-175, 175-200 или 200-250 мг.

В соответствии с различными вариантами осуществления, антитело, антигенсвязывающий фрагмент и пептидный антагонист IL-6 вводят в виде зависящей от массы пациента дозы.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист вводят внутривенной дозой 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 мг/кг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист вводят дозой 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мг/кг.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, подкожная зависящая от массы доза составляет 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 или 1,0 мг/кг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонист вводят дозой 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5 или 5 мг/кг.

В соответствии с различными, связанными с внутривенным введением вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят раз в 7 дней, раз в 14 дней, раз в 21 день, раз в 28 дней или раз в месяц. В соответствии с различными, связанными с подкожным введением вариантами осуществления, антагонист IL-6 вводят раз в 14 дней, раз в 28 дней, раз в месяц, раз в два месяца (каждый второй месяц) или раз в три месяца.

В соответствии с определенными предпочтительными вариантами осуществления, антагонист IL-6 представляет собой антитело MEDI5117. В соответствии с различными вариантами осуществления, MEDI5117 вводят фиксированной дозой 1-30 мг внутривенно раз в неделю. В соответствии с определенными вариантами осуществления, антитело MEDI5117 вводят фиксированной дозой 1, 2, 3, 4, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25 или 30 мг внутривенно раз в неделю. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антитело MEDI5117 вводят фиксированной дозой 25-250 мг подкожно с частотой раз в месяц - в три месяца. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, MEDI5117 вводят дозой 30, 45, 60, 75, 100, 120, 125, 150, 175, 200, 225, 240 или 250 мг подкожно раз в месяц, раз в два месяца или раз в 3 месяца.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, антагонистом IL-6 является тоцилизумаб. В соответствии с различными вариантами осуществления, тоцилизумаб вводят подкожно пациентам ≤ 100 кг начальной дозой 162 мг раз в неделю. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, тоцилизумаб вводят внутривенно дозой 4 мг/кг раз в 4 недели с последующим повышением до 8 мг/кг раз в 4 недели, исходя из клинического ответа.

6.10.2. Ингибиторы JAK и STAT.

В соответствии с типичными вариантами осуществления, низкомолекулярные ингибиторы JAK и ингибиторы STAT вводят перорально.

В соответствии с различными вариантами осуществления, ингибитор вводят один или два раза в день пероральной дозой 1-10, 10-20, 20-30, 30-40 или 40-50 мг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, ингибитор вводят один или два раза в день дозой 50-60, 60-70, 70-80, 80-90 или 90-100 мг. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, ингибитор вводят дозой 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50 мг перорально один или два раза в день. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, ингибитор вводят дозой 75 мг перорально раз в день или два раза в день, 100 мг перорально раз в день или два раза в день.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, JAK-ингибитор представляет собой тофацитиниб, и его вводят дозой 5 мг перорально два раза в день или 11 мг перорально каждый день,

В соответствии с определенными вариантами осуществления, JAK-ингибитор представляет собой децернотиниб, и его вводят дозой 25, 50, 100 или 150 мг перорально два раза в день.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, ингибитор представляет собой руксолитиниб, и его вводят дозой 25 мг перорально два раза в день, 20 мг перорально два раза в день, 15 мг перорально два раза в день, 10 мг перорально два раза в день или 5 мг перорально два раза в день.

6.11. Дополнительные терапевтические средства.

В соответствии с различными вариантами осуществления описываемых в настоящем документе способов, способ дополнительно предусматривает введение терапевтического средства в дополнение к антагонисту IL-6, причем второе терапевтическое средство также способно снижать экспрессию гепсидина.

В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой антагонист BMP. В соответствии с определенными вариантами осуществления, антагонист BMP представляет собой антитело к BMP6. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, антитело к BMP6 имеет шесть CDR из антитела, описанного в US 2016/0176956 или US 2016/0159896, раскрытие которых включено в настоящий документ посредством ссылки во всей своей полноте.

В соответствии с определенными вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой антагонист гемоювелина. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, антагонист гемоювелина представляет собой антитело к гемоювелину. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитело к гемоювелину имеет шесть CDR из антител, раскрытых в работе Kovacs et al., *Haematologica* (2016), doi:10.3324/haematol.2015.140772 [ePub ahead of print].

В соответствии с определенными вариантами осуществления, второе терапевтическое средство представляет собой антагонист гепсидина. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, антагонист гепсидина представляет собой антитело к гепсидину. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитело имеет шесть CDR из антитела, описанного в US 2016/0017032, раскрытие которой включено в настоящий документ посредством ссылки во всей ее полноте.

6.12. Наборы.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к наборам.

В соответствии с типичными вариантами осуществления, в наборах представлены реагенты для определения из биологического образца, полученного от пациента, генотипа пациента по местоположению SNP rs855791 Tmprss6.

6.13. Дополнительные аспекты и варианты осуществления.

6.13.1. Способы лечения воспаления при хронической болезни почек или сердечно-сосудистом заболевании.

В соответствии с другими аспектами и вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к композициям и способам для характеристики и лечения воспаления при хронической болезни почек или сердечно-сосудистом заболевании антагонистом IL-6, а также к способам характеристики восприимчивости пациента к лечению.

Эти аспекты и варианты осуществления основаны, по меньшей мере отчасти, на обнаружении того факта, что воспаление у пациентов с хронической болезнью почек и у пациентов с сердечно-сосудистым заболеванием, имеющих один или несколько аллелей Tmprss6, содержащих G или C в нуклеотидном положении 2321 (кодирующих полипептид Tmprss6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736) повышало у этих пациентов риск смертельного исхода, и что таких субъектов можно лечить антагонистом IL-6 для уменьшения такого риска. Как рассмотрено более подробно ниже, пациентов с хронической болезнью почек подвергали генотипированию, и анализировали у них уровни IL-6 и CRP в сыворотке крови, и эти диагностические данные сравнивали с вводимой дозировкой EPO и риском смертельного исхода. Пациенты, имеющие один или несколько аллелей Tmprss6, содержащие G или C в нуклеотидном положении 2321 (кодирующих полипептид Tmprss6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736), и повышенные уровни IL-6 и/или CRP, нуждались в более высоких дозах EPO для терапии и имели более высокую смертность. Было показано, что нуклеотид в этом положении имеет важное значение при выявлении пациентов с железодефицитной анемией (см. работу Finberg et al., Nat. Genet. 2008; 40(5): 569-571, которая включена в настоящий документ посредством ссылки во всей ее полноте в отношении всех раскрытых в ней идей и последовательностей, вариантов, номенклатуры и т. д.). Эти данные всецело подтверждают выявление подгруппы пациентов на основе генотипа Tmprss6, которые нуждаются в более высокой дозе EPO и/или имеют более высокий риск смертельного исхода и вероятно будут отвечать на ингибирование IL-6 при стандартной терапии или без нее во время лечения анемии (например, ассоциированной с хронической болезнью почек). При ингибировании воспаления можно снизить дозу EPO, тем самым избегая неблагоприятных побочных эффектов от EPO (например, риска развития сердечно-сосудистых нарушений).

Эти аспекты и варианты осуществления дополнительно основаны на обнаружении того факта, что пациенты с одним или несколькими аллелями Tmprss6, содержащими G или C в нуклеотидном положении 2321 (кодирующими полипептид Tmprss6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736), имеют более высокий риск смертельного исхода, ассоциированного с инфарктом миокарда или сердечно-сосудистым заболеванием. У этих пациентов также вероятно будет положительный эффект от ингибирования IL-6, что уменьшит воспаление и снизит риск.

Соответственно, настоящее изобретение относится к терапевтическим способам лечения воспаления, ассоциированного с сердечно-сосудистым заболеванием или хронической болезнью почек, включая анемию при хронической болезни почек, и/или уменьшения риска смертельного исхода, ассоциированного с такими состояниями, путем ингибирования биологической активности IL-6, например, у пациентов, отобранных посредством генотипирования Tmprss6 по SNP rs855791, путем блокирования либо связывания IL-6 или его рецептора (gp80) друг с другом, либо передачи его сигнала или экспрессии (например, при помощи антитела к IL-6 или антитела к IL-6R или путем ингибирования JAK1/STAT3). В соответствии с одним вариантом осуществления, лечение хронической болезни почек проводят совместно со стандартным лечением анемии или без него, а также со способами характеристики чувствительности пациента, страдающего хронической болезнью почек, на лечение анемии, например, путем генотипирования Tmprss6 по SNP rs855791 и детекции уровней воспалительных маркеров (например, увеличенных уровней IL-6 и/или CRP в сыворотке крови).

Настоящее изобретение относится к способам лечения сердечно-сосудистого заболевания или анемии при хронической болезни почек и/или уменьшения вероятности смертельного исхода, ассоциированного с хроническим воспалением у таких пациентов, путем введения средства, которое ингибирует биологическую активность или экспрессию IL-6.

В соответствии с некоторыми аспектами и вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения хронического воспаления, которое увеличивает смертность у

субъектов с хронической болезнью почек или сердечно-сосудистым заболеванием, и характеристики восприимчивости пациентов к таким видам терапии. В соответствии с отдельными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к способам характеристики и лечения анемии при хроническом воспалении и смертности (например, при хронической болезни почек), а также характеристики восприимчивости пациента к лечению анемии (например, к введению эритропоэтина или стимулирующих эритропоэз средств). В соответствии с одним аспектом, настоящее изобретение относится к способам лечения хронического воспаления у отобранного субъекта, при этом такой способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6, причем субъект отобран для лечения по наличию одного или нескольких аллелей, кодирующих полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способам лечения воспаления или хронического воспаления у отобранного субъекта с сердечно-сосудистым заболеванием или хронической болезнью почек, при этом способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6 (например, антитела к IL-6), причем субъект отобран для лечения по наличию одного или нескольких аллелей, кодирующих полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736. В соответствии с одним вариантом осуществления, при помощи способа уменьшают риск смертности у субъекта. В соответствии с одним вариантом осуществления, субъект имеет в истории болезни инфаркт миокарда или сердечную недостаточность.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способам уменьшения воспаления и риска смертности у отобранного субъекта с сердечно-сосудистым заболеванием или болезнью почек, при этом способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6 (например, антитела к IL-6), причем субъект отобран для лечения по наличию одного или нескольких аллелей, кодирующих полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736, и повышенному воспалению относительно эталона. В соответствии с одним вариантом осуществления, субъект имеет в истории болезни инфаркт миокарда или сердечную недостаточность.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способам уменьшения риска смертности у субъекта с хронической болезнью почек или сердечной недостаточностью, при этом способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6, причем субъект выявлен как имеющий один или несколько аллелей, кодирующих полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736, и повышенное воспаление относительно эталона.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способам лечения анемии у субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6 отдельно или в комбинации с терапией анемии, причем субъект выявлен как имеющий один или несколько аллелей, кодирующих полипептид TMPRSS6 (также называемый матриптазой-2; MT2), содержащий аланин в аминокислотном положении 736 (например, имеющий G или C в нуклеотидном положении 2321 молекулы нуклеиновой кислоты TMPRSS6), и повышенное воспаление относительно эталона.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способам лечения анемии у субъекта с повышенным воспалением, при этом способ предусматривает введение антагониста IL-6 (например, антитела к IL-6) отдельно или в комбинации с эритропоэтическим фактором в количестве, эффективном для нейтрализации воспаления у субъекта с одним или несколькими аллелями, кодирующими полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736 (например, с G или C в нуклеотидном положении 2321 молекулы нуклеиновой кислоты TMPRSS6).

В соответствии с еще одним аспектом, настоящее изобретение относится к способам усиления восприимчивости к EPO у субъекта, который выявлен как нуждающийся в этом, при этом способ предусматривает введение антагониста IL-6 (например, антитела к IL-6) в количестве, эффективном для нейтрализации воспаления у субъекта с одним или несколькими аллелями, кодирующими полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736 (например, с G или C в нуклеотидном положении 2321 молекулы нуклеиновой кислоты TMPRSS6), таким образом снижая дозу EPO.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способам снижения смертности у субъекта с повышенным воспалением, при этом способ предусматривает введение антагониста IL-6 в количестве, эффективном для нейтрализации воспаления у субъекта с одним или несколькими аллелями, кодирующими полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736 (например, с G или C в нуклеотидном положении 2321 молекулы нуклеиновой кислоты TMPRSS6).

В соответствии с еще одним аспектом, настоящее изобретение относится к способам подбора терапии для субъекта, который выявлен как нуждающийся в этом, при этом способ предусматривает получение характеристики субъекта с одним или несколькими аллелями, кодирующими полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736 (например, с G или C в нуклеотидном положении 2321 молекулы нуклеиновой кислоты TMPRSS6); и детекцию уровня одного или нескольких маркеров воспаления IL-6 или CRP, причем такая характеристика свидетельствует, что необходимо вводить антагонист IL-6 отдельно или в комбинации с терапией анемии.

В соответствии с еще одним аспектом, настоящее изобретение относится к способам увеличения пролиферации или выживаемости эритроцита или его предшественника (например, гематопоэтической

стволовой клетки, проэритробласта, эритробласта или ретикулоцита) у субъекта, который выявлен как нуждающийся в этом, при этом способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6 или эритропоэтического фактора, причем субъект выявлен как имеющий один или несколько аллелей, кодирующих полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736 (например, имеющий G или C в нуклеотидном положении 2321 молекулы нуклеиновой кислоты TMPRSS6), и повышенное воспаление относительно эталона.

В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, субъект имеет или выявлен как имеющий анемию, включая анемию при злокачественной опухоли, анемию при хронических аутоиммунных заболеваниях, анемию при хронических воспалительных заболеваниях, анемию при сердечно-сосудистых заболеваниях, анемию при метаболических синдромах и т. п. В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, субъект имеет или выявлен как имеющий хроническую болезнь почек. В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, субъект имеет или выявлен как имеющий воспаление. В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, субъект имеет или выявлен как имеющий повышенный риск смертельного исхода, ассоциированный с хроническим воспалением, хронической болезнью почек или сердечно-сосудистым заболеванием. В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, субъект выявлен как нуждающийся в лечении. В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, субъект имеет или выявлен как имеющий повышенное воспаление. В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, субъект имеет или выявлен как имеющий один или несколько аллелей, кодирующих полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736 (например, имеющий G или C в нуклеотидном положении 2321 молекулы нуклеиновой кислоты TMPRSS6), и повышенное воспаление относительно эталона. В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6. В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6 и назначение терапии анемии. В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, субъектом является человек.

В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, терапия анемии предусматривает введение эритропоэтического фактора. В соответствии с различными вариантами осуществления, эритропоэтический фактор представляет собой один или несколько эритропоэтина, стимулирующего эритропоэз средства, стабилизатора HIF и дополнительного железа.

В соответствии с различными вариантами осуществления, повышенное воспаление характеризуется повышенными уровнями IL-6 и/или CRP относительно эталона (например, измеренными с помощью традиционных CRP-анализов или высокочувствительных анализов (hsCRP), при этом с помощью обоих можно обнаружить CRP, но они отличаются аналитическими характеристиками). В соответствии с различными вариантами осуществления, повышенное воспаление характеризуется IL-6, превышающим приблизительно 5 пг/мл. В соответствии с различными вариантами осуществления, повышенное воспаление характеризуется CRP, превышающим приблизительно 2 мг/л.

В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, антагонист IL-6 вводят в количестве, эффективном для нейтрализации воспаления. В соответствии с различными вариантами осуществления, количество, эффективное для нейтрализации воспаления, снижает IL-6 до уровня менее чем приблизительно 15 пг/мл, менее чем приблизительно 10 пг/мл или менее чем приблизительно 5 пг/мл. В соответствии с различными вариантами осуществления, количество, эффективное для нейтрализации воспаления, снижает CRP до уровня менее чем приблизительно 2 мг/л или менее чем приблизительно 0,2 мг/л.

В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, введение антагониста IL-6 или антитела к IL-6 снижает дозу EPO. В соответствии с определенными вариантами осуществления, дозу EPO снижают приблизительно на 40 МЕ/кг/неделя, приблизительно на 50 МЕ/кг/неделя, приблизительно на 80 МЕ/кг/неделя, приблизительно на 100 МЕ/кг/неделя или более. В соответствии с различными вариантами осуществления, введение антагониста IL-6 или антитела к IL-6 уменьшает побочный эффект увеличенной дозы EPO.

В соответствии с одним вариантом осуществления, пациентов с хронической болезнью почек лечат со стандартным лечением анемии или без него. В частности, средство, которое ингибирует биологическую активность или экспрессию IL-6, вводят субъекту с анемией, ассоциированной с хронической болезнью почек с лечением анемии (например, с введением EPO, ESA, стабилизаторов HIF, дополнительного железа или с трансфузией эритроцитов) или без него. Различные виды лечения анемии включают стимуляцию эритропоэза или выработки эритроцитов. Таким образом, это средства, которые увеличивают рост или пролиферацию и/или уменьшают гибель эритроцита или его предшественника. К числу

предшественников эритроцитов относятся, например, гематопоэтические стволовые клетки, общие миелоидные предшественники, проэритробласты, эритробласты, ретикулоциты или любая клетка, способная дифференцироваться или созревать в эритроцит.

Средство, которое ингибирует биологическую активность IL-6 путем блокировки либо связывания IL-6, или его рецептора (gp80) друг с другом, либо передачи его сигнала или экспрессии, можно ввести субъекту с анемией, ассоциированной с хронической болезнью почек, в фармацевтической композиции, при этом фармацевтическая композиция содержит эффективное количество указанного средства, средства для лечения анемии (например, EPO, ESA, ингибиторов пролил-гидроксилазы HIF, дополнительного железа) и подходящее вспомогательное вещество. В соответствии с одним вариантом осуществления, средство представляет собой антагонист IL-6 или антитело к IL-6, которое уменьшает уровень или активность полипептида или молекулы нуклеиновой кислоты IL-6 у субъекта или ингибирует внутриклеточную передачу сигнала, запускаемую активацией рецептора IL-6. Антитело к IL-6 (например, MEDI5117) можно вводить в комбинации с лечением анемии (например, введением EPO, ESA, стабилизатора HIF, дополнительного железа). Методы лечения анемии варьируют в зависимости от генотипа TMPRSS6 у пациента и воспалительного процесса у пациента. Пациентам, гомозиготным или гетерозиготным по основному аллелю TMPRSS6, содержащему G или C в нуклеотидном положении 2321 (кодирующему полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736), и имеющим повышенные уровни маркеров воспаления (например, IL-6 и/или CRP), вводят антагонист IL-6 или антитело к IL-6, что уменьшает уровень или активность полипептида IL-6 в контексте лечения анемии (например, введения EPO, ESA, стабилизатора HIF, дополнительного железа). Пациенты, гомозиготные по минорному аллелю TMPRSS6, содержащему A или T в нуклеотидном положении 2321 (кодирующему полипептид TMPRSS6, содержащий валин в аминокислотном положении 736), не нуждаются в терапии антителом к IL-6, дополняющей лечение анемии. Способы лечения анемии могут варьировать в зависимости от стадии хронической болезни почек, возраста пациента, состояния здоровья и физического состояния.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к анализам, которые пригодны для получения характеристики субъекта с анемией, ассоциированной с хроническим воспалением (например, при хронической болезни почек). Маркеры воспаления IL-6 и CRP можно детектировать любым подходящим способом. Описываемые в настоящем документе способы можно применять отдельно или в комбинации для детекции биомаркера IL-6 или CRP и/или воспалительного состояния. В соответствии с одним вариантом осуществления, воспаление характеризуется детекцией уровня полипептида IL-6 и/или CRP в биологическом образце (например, сыворотке крови) от субъекта относительно экспрессии у эталона (например, сыворотки крови от здорового контрольного субъекта), при этом увеличение экспрессии IL-6 и/или CRP свидетельствует о воспалении. В соответствии с другим вариантом осуществления, увеличение экспрессии IL-6 и/или CRP свидетельствует, что субъект с анемией, ассоциированной с хронической болезнью почек, не будет чувствителен к лечению анемии и/или будет чувствителен к лечению анемии при введении в комбинации с антагонистом IL-6 (например, антителом к IL-6).

В соответствии с одним вариантом осуществления, уровень полипептида IL-6 и/или CRP измеряют с помощью иммуноанализа. Иммуноанализ обычно предусматривает использование антитела (или другого средства, которое специфически связывает маркер) для детекции наличия или уровня биомаркера в образце. Антитела можно получить способами, хорошо известными из уровня техники, например путем иммунизации животных биомаркером или его фрагментами. Биомаркеры можно выделить из образцов на основе их характеристик связывания. Альтернативно, если известна аминокислотная последовательность полипептидного биомаркера, можно синтезировать полипептид и применять его для создания антител с помощью способов, которые хорошо известны из уровня техники.

В соответствии с различными вариантами осуществления, применяют традиционные иммуноанализы, включая, например, вестерн-блоттинг, иммуноанализы "сэндвич"-типа, в том числе ИФА, и другие ферментативные иммуноанализы, флуоресцентные иммуноанализы и хемилуминесценцию. Нефелометрия представляет собой проводимый в жидкой фазе анализ, при котором антитела находятся в растворе. Связывание антигена с антителом приводит к изменениям поглощающей способности, которую и измеряют. К другим формам иммуноанализа относятся магнитный иммуноанализ, радиоиммунологический анализ и иммуноколичественная ПЦР в режиме реального времени (iqPCR). К другим способам детекции относятся жидкостная хроматография и масс-спектрометрия.

Иммуноанализы можно проводить на твердых субстратах (например, чипах, гранулах, микроструйных платформах, мембранах) или на любых других формах, которые поддерживают связывание антитела с маркером и последующую детекцию. За раз можно детектировать один маркер или можно применять мультиплексный формат. Мультиплексный иммуноанализ может предусматривать использование плоских микрочипов (белковых чипов) или гранульных микрочипов (суспензионные анализы).

Имеющих анемию пациентов с хронической болезнью почек, которые выявлены как имеющие повышенные уровни полипептидов IL-6 и/или CRP, отбирают для лечения средством, которое уменьшает экспрессию или активность IL-6 (например, антителом к IL-6), в комбинации с лечением анемии. Пациентов, которых лечат с помощью способа по настоящему изобретению, можно отслеживать путем детек-

ции изменений гемоглобина, гематокрита, дозы эритропоэтина, экспрессии IL-6 и/или CRP после лечения. Пациентов, у которых наблюдают уменьшение экспрессии IL-6 и/или CRP и/или уменьшение воспаления, выявляют как чувствительных к ингибированию IL-6.

Другие аспекты и варианты осуществления представлены в приведенных далее пронумерованных пунктах.

1. Способ лечения хронического воспаления у отобранного субъекта, при этом способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6, причем субъект отобран для лечения по наличию одного или нескольких аллелей, кодирующих полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736.

2. Способ лечения воспаления у отобранного субъекта с сердечно-сосудистым заболеванием, сердечной недостаточностью или хронической болезнью почек, при этом способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6, причем субъект отобран для лечения по наличию одного или нескольких аллелей, кодирующих полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736.

3. Способ уменьшения воспаления и риска смертности у отобранного субъекта с сердечно-сосудистым заболеванием, сердечной недостаточностью и/или хронической болезнью почек, при этом способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6, причем субъект отобран для лечения по наличию одного или нескольких аллелей, кодирующих полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736, и повышенному воспалению относительно эталона.

4. Способ лечения анемии у субъекта с хронической болезнью почек, при этом способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6, причем субъект выявлен как имеющий один или несколько аллелей, кодирующих полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736, и повышенное воспаление относительно эталона.

5. Способ по любому из пп.1-4, предусматривающий, что антагонист IL-6 вводят в количестве, эффективном для нейтрализации воспаления.

6. Способ по любому из пп.1-4, предусматривающий, что антагонист IL-6 представляет собой анти-тело к IL-6.

7. Способ по п.5, причем способ дополнительно предусматривает введение субъекту эритропоэтического фактора.

8. Способ по любому из пп.1-4, предусматривающий, что при помощи способа уменьшают риск смертности у субъекта.

9. Способ уменьшения риска смертности у субъекта с хронической болезнью почек или сердечной недостаточностью, при этом способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6, причем субъект выявлен как имеющий один или несколько аллелей, кодирующих полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736, и повышенное воспаление относительно эталона.

10. Способ лечения анемии у субъекта с повышенным воспалением, при этом способ предусматривает: введение эритропоэтического фактора и антитела к IL-6 в количестве, эффективном для нейтрализации воспаления у субъекта с одним или несколькими аллелями, кодирующими полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736.

11. Способ по любому из пп.1-10, предусматривающий, что повышенное воспаление характеризуется повышенными уровнями IL-6 и/или CRP относительно эталона.

12. Способ по п.11, предусматривающий, что повышенное воспаление характеризуется IL-6, превышающим приблизительно 5 пг/мл, приблизительно 10 пг/мл или приблизительно 15 пг/мл.

13. Способ по п.10, предусматривающий, что повышенное воспаление характеризуется CRP, превышающим приблизительно 2 мг/л.

14. Способ по п.10, предусматривающий, что эритропоэтический фактор представляет собой один или несколько эритропоэтина, стимулирующего эритропоэз средства, стабилизатора HIF и дополнительного железа.

15. Способ усиления восприимчивости к EPO у субъекта, который выявлен как нуждающийся в этом, при этом способ предусматривает введение антагониста IL-6 или антитела к IL-6 в количестве, эффективном для нейтрализации воспаления у субъекта с одним или несколькими аллелями, кодирующими полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736, таким образом усиливая восприимчивость к EPO у субъекта.

16. Способ по п.15, предусматривающий, что количество антитела к IL-6, эффективное для нейтрализации воспаления, снижает IL-6 до менее чем приблизительно 15 пг/мл, менее чем приблизительно 10 пг/мл или менее чем приблизительно 5 пг/мл.

17. Способ по п.16, предусматривающий, что количество антагониста IL-6 или антитела к IL-6, эффективное для нейтрализации воспаления, снижает CRP до менее чем приблизительно 2 мг/л.

18. Способ по п.15, предусматривающий, что введение антагониста IL-6 или антитела к IL-6 снижает дозу EPO.

19. Способ по п.17, предусматривающий, что дозу EPO снижают приблизительно на 40 МЕ/кг/неделя, приблизительно на 50 МЕ/кг/неделя, приблизительно на 80 МЕ/кг/неделя, приблизительно на 100 МЕ/кг/неделя или более.

20. Способ по п.15, предусматривающий, что введение антагониста IL-6 или антитела к IL-6 уменьшает побочный эффект увеличенной дозы ЕРО.

21. Способ подбора терапии для субъекта, который выявлен как нуждающийся в этом, при этом способ предусматривает:

а) получение характеристики субъекта как имеющего один или несколько аллелей, кодирующих полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736; и

б) детекцию уровня одного или нескольких маркеров воспаления IL-6 и CRP, причем такая характеристика свидетельствует, что необходимо вводить антагонист IL-6 в комбинации с терапией анемии.

22. Способ по п.21, причем способ дополнительно предусматривает введение субъекту антагониста IL-6 и назначение терапии анемии.

23. Способ по п.21, предусматривающий, что терапия анемии предусматривает введение эритропоэтического фактора.

24. Способ увеличения пролиферации или выживаемости эритроцита или его предшественника у субъекта, который выявлен как нуждающийся в этом, при этом способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6 и эритропоэтического фактора, причем субъект выявлен как имеющий один или несколько аллелей, кодирующих полипептид TMPRSS6, содержащий аланин в аминокислотном положении 736, и причем субъект имеет повышенное воспаление относительно эталона.

25. Способ по п.24, предусматривающий, что при помощи способа снижают гибель эритроцита или его предшественника.

26. Способ по п.24, предусматривающий, что предшественник представляет собой гематопозитическую стволовую клетку, проэритробласт, эритробласт или ретикулоцит.

27. Способ по любому из пп.15-24, предусматривающий, что субъект имеет хроническую болезнь почек.

28. Способ по любому из пп.15-24, предусматривающий, что субъект имеет анемию.

29. Способ по п.28, предусматривающий, что анемия представляет собой анемию при злокачественной опухоли, анемию при хронических аутоиммунных заболеваниях, анемию при хронических воспалительных заболеваниях или анемию при метаболическом синдроме.

30. Способ по любому из пп.15-24, предусматривающий, что антагонист IL-6 вводят в количестве, эффективном для нейтрализации воспаления.

31. Способ по любому из пп.15-24, предусматривающий, что антагонист IL-6 представляет собой антитело к IL-6.

32. Способ по любому из пп.15-24, предусматривающий, что повышенное воспаление характеризуется повышенными уровнями IL-6 и/или CRP относительно эталона.

33. Способ по любому из пп.15-24, предусматривающий, что повышенное воспаление характеризуется IL-6, превышающим приблизительно 5 пг/мл, приблизительно 10 пг/мл или приблизительно 15 пг/мл.

34. Способ по любому из пп.15-24, предусматривающий, что повышенное воспаление характеризуется CRP, превышающим приблизительно 2 мг/л.

35. Способ по любому из пп.15-24, предусматривающий, что количество, эффективное для нейтрализации воспаления, снижает IL-6 до менее чем приблизительно 10 пг/мл или менее чем приблизительно 5 пг/мл.

36. Способ по любому из пп.15-24, предусматривающий, что количество, эффективное для нейтрализации воспаления, снижает CRP до менее чем приблизительно 2 мг/л.

37. Способ по любому из пп.15-24, предусматривающий, что эритропоэтический фактор представляет собой один или несколько эритропоэтина, стимулирующего эритропоэз средства, стабилизатора HIF и дополнительного железа.

38. Способ по п.24, предусматривающий, что введение антагониста IL-6 снижает дозу ЕРО.

39. Способ по п.38, предусматривающий, что антагонист IL-6 представляет собой антитело к IL-6.

40. Способ по п.38, предусматривающий, что дозу ЕРО снижают приблизительно на 40 МЕ/кг/неделя, приблизительно на 50 МЕ/кг/неделя, приблизительно на 80 МЕ/кг/неделя, приблизительно на 100 МЕ/кг/неделя или более.

41. Способ по п.23, предусматривающий, что введение антагониста IL-6 уменьшает побочный эффект увеличенной дозы ЕРО.

42. Способ по любому из пп.1-40, предусматривающий, что аллель содержит G в положении 2321 полинуклеотида TMPRSS6.

43. Способ по любому из пп.1-42, предусматривающий, что антагонист IL-6 представляет собой антитело к IL-6, которое имеет один или несколько CDR, выбранных из последовательностей нуклеиновых кислот:

SNYMI (SEQ ID NO: 12);
 DLYYYAGDTYYADSVKG (SEQ ID NO: 13);
 WADDHPPWIDL (SEQ ID NO: 14);
 RASQGISSWLA (SEQ ID NO: 15);
 KASTLES (SEQ ID NO: 16); и
 QQSWLGGS (SEQ ID NO: 17).

44. Способ по п.42, предусматривающий, что антитело к IL-6 имеет CDR1 тяжелой цепи, содержащий последовательность SNYMI (SEQ ID NO: 12); CDR2 тяжелой цепи, содержащий последовательность DLYYYAGDTYYADSVKG (SEQ ID NO: 13); CDR3 тяжелой цепи, содержащий последовательность WADDHPPWIDL (SEQ ID NO: 14); CDR1 легкой цепи, содержащий последовательность RASQGISSWLA (SEQ ID NO: 15); CDR2 легкой цепи, содержащий последовательность KASTLES (SEQ ID NO: 16); и CDR3 легкой цепи, содержащий последовательность QQSWLGGS (SEQ ID NO: 17).

45. Способ по п.42, предусматривающий, что антитело к IL-6 имеет тяжелую цепь, содержащую последовательность:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTISSNYMIWVRQAPGKGLEWVSDLYYYAGDTYY
 ADSVKGRFTMSRDISKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCARWADDHPPWIDLWGRGTLVTVSS
 ASTKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS
 GLYSLSSVTVFPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVKDRVEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGG
 PSVFLFPPKPKDTLYITREPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
 STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE
 MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
 QQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 18).

46. Способ по п.42, предусматривающий, что антитело к IL-6 имеет легкую цепь, содержащую последовательность:

DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKVLIIYKASTLESQVPS
 RFGSGSGTEFTLTISSLQPDFATYYCQQSWLGGSFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSTLTLL
 SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 19).

47. Способ по п.42, предусматривающий, что антитело к IL-6 представляет собой MEDI5117.

48. Способ по любому из пп.1-47, предусматривающий, что субъектом является человек.

6.13.2. Способы лечения кардиоренального синдрома/

В соответствии с другими аспектами и вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к композициям и способам лечения кардиоренального синдрома.

Эти аспекты и варианты осуществления основаны, по меньшей мере частично, на обнаружении того факта, что лечение антителом к IL-6 повреждения сердца у модельного грызуна с кардиоренальным синдромом имело эквивалентный эффект в качестве стандартного средства профилактического лечения. Как сообщается более подробно ниже, модельных грызунов с кардиоренальным синдромом обрабатывали антителом к IL-6 или стандартным средством профилактической терапии (ингибитором АСЕ, периндоприлом) после инфаркта миокарда. После обработки измеряли фракцию выброса, силу сердечной сократимости и процент фиброзной ткани в ткани сердца. Уровни фракции выброса в обеих группах субъектов, которые были обработаны антителом к IL-6, и группах субъектов, которые были обработаны стандартным средством профилактической терапии, были увеличены по сравнению с уровнями в группе субъектов, которая была обработана контрольным средством лечения. Сердечная сократимость в обеих группах, которая была обработана антителом к IL-6 и которая была обработана стандартным средством профилактической терапии, была увеличена по сравнению с уровнями в группе субъектов, которая была обработана контрольным средством лечения. Количество фиброзной ткани в обеих группах, которая была обработана антителом к IL-6 и которая была обработана стандартным средством профилактической терапии, уменьшалось по сравнению с количеством в группе субъектов, которая была обработана контрольным средством лечения. Кроме того, уровни фракции выброса и количество фиброзной ткани были схожими в группе субъектов, которая была обработана антителом к IL-6, и группе субъектов, которая была обработана стандартным средством профилактической терапии. Из этих результатов видно, что терапия антителом к IL-6 имела эквивалентную эффективность в качестве стандартного средства профилактической терапии при лечении кардиоренального синдрома у модельного грызуна.

Эти аспекты и варианты осуществления дополнительно основаны, по меньшей мере частично, на обнаружении того факта, что пациенты, которые были выявлены как имеющие кардиоренальный синдром после инфаркта миокарда и имеющие повышенные уровни IL-6, имели особенно повышенный риск

смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой, в том числе сердечной недостаточности. Без ограничения теорией, IL-6 может играть каузальную роль в развитии и/или прогрессировании кардиоренального синдрома. Таким образом, у пациентов, имеющих повышенные уровни IL-6 после инфаркта миокарда, или пациентов с кардиоренальным синдромом и повышенными уровнями IL-6 вероятно будет положительный эффект от ингибирования IL-6.

Соответственно, настоящее изобретение относится к терапевтическим способам лечения повреждения сердца и/или почки у субъекта, имеющего кардиоренальный синдром, предусматривающим введение субъекту антагониста IL-6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, лечение повреждения сердца и/или почки у субъекта, имеющего кардиоренальный синдром, проводят со стандартным лечением кардиоренального синдрома или без него. Также настоящее изобретение относится к способам характеристики риска смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой, у пациента после инфаркта миокарда, причем способ предусматривает детекцию повышенного уровня IL-6 в биологическом образце, полученном от пациента.

В соответствии с одним аспектом, настоящее изобретение относится к способам лечения повреждения сердца и/или почки у субъекта с кардиоренальным синдромом, причем способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способам повышения сердечной функции у субъекта с кардиоренальным синдромом, причем способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6.

В соответствии с еще одним аспектом, настоящее изобретение относится к способам уменьшения фиброза у субъекта с кардиоренальным синдромом, причем способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6.

В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, способ дополнительно предусматривает введение стандартного средства профилактической терапии субъекту. В соответствии с различными вариантами осуществления, стандартное средство профилактической терапии представляет собой ингибитор ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ).

В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, повышение сердечной функции характеризуется увеличением у субъекта фракции выброса и/или силы сердечной сократимости относительно эталона. В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, уменьшение фиброза характеризуется снижением процента фиброзной ткани в образце ткани от субъекта относительно эталона. В соответствии с различными вариантами осуществления, фиброз находится в ткани сердца.

В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, субъект имеет повреждение сердца и/или почки. В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, субъект имеет повреждение сердца, после которого имело место повреждение почки.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способу выявления повышенного риска смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой (например, сердечной недостаточности), у субъекта после инфаркта миокарда, причем способ предусматривает измерение уровня одного или нескольких из полинуклеотида или полипептида IL-6 в образце от субъекта относительно эталона, причем повышенный уровень одного или нескольких из полинуклеотида или полипептида IL-6 свидетельствует о повышенном риске смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способу характеристики риска смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой (например, сердечной недостаточности), у субъекта после инфаркта миокарда, причем способ предусматривает измерение уровня одного или нескольких из полинуклеотида или полипептида IL-6 в образце от субъекта относительно эталона, причем повышенный уровень одного или нескольких из полинуклеотида или полипептида IL-6 свидетельствует о повышенном риске смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой.

В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, субъект имеет кардиоренальный синдром, сердечную недостаточность, хроническую болезнь почек или не имеет кардиоренальной патологии. В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, субъект выявлен как имеющий кардиоренальный синдром, сердечную недостаточность, хроническую болезнь почек или как не имеющий кардиоренальной патологии спустя приблизительно один месяц после инфаркта миокарда.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способу лечения повреждения сердца и/или почки у отобранного субъекта с кардиоренальным синдромом, причем способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6, при этом субъект отобран для лечения по детекции повышенного уровня одного или нескольких из полинуклеотида или полипептида IL-6 в биологическом образце от субъекта относительно эталона.

В соответствии с еще одним аспектом, настоящее изобретение относится к способу снижения риска

смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой (например, сердечной недостаточности), у отобранного субъекта с кардиоренальным синдромом, причем способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6, при этом субъект отобран по детекции повышенного уровня одного или нескольких из полинуклеотида или полипептида IL-6 в биологическом образце от субъекта относительно эталона. В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, субъект уже перенес инфаркт миокарда.

В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, антагонист IL-6 представляет собой антитело к IL-6. В соответствии с различными вариантами осуществления, антитело к IL-6 представляет собой MEDI5117.

В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, биологический образец представляет собой образец плазмы или образец сыворотки крови. В соответствии с различными вариантами осуществления любого из описанных в настоящем документе аспектов, субъектом является человек.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способам лечения кардиоренального синдрома у пациентов и/или снижения риска смертельного исхода или сердечной недостаточности у таких пациентов путем введения средства, которое ингибирует биологическую активность или экспрессию IL-6. В соответствии с одним вариантом осуществления, пациентов с кардиоренальным синдромом лечат со стандартным лечением кардиоренального синдрома (например, ингибиторами ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ)) или без него. В частности, субъекту с сердечно-сосудистым синдромом вводят средство, которое ингибирует биологическую активность или экспрессию IL-6 (например, введение антитела к IL-6).

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к способам повышения сердечной функции и способам уменьшения фиброза у субъектов с кардиоренальным синдромом. Способы предусматривают введение субъекту средства, которое ингибирует биологическую активность или экспрессию IL-6. В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, повышение сердечной функции характеризуется повышением фракции выброса у субъекта относительно эталона (например, фракция выброса у здорового контрольного субъекта) или сердечной сократимости (например, dP/dt_{max}) относительно эталона (например, сердечной сократимости у здорового контрольного субъекта). В соответствии с некоторыми вариантами осуществления, уменьшение фиброза характеризуется снижением процента фиброзной ткани в образце ткани от субъекта относительно эталона (например, в образце ткани, полученном от здорового контрольного субъекта). В соответствии с одним вариантом осуществления, фиброз находится в ткани сердца.

Средство, которое ингибирует биологическую активность IL-6 путем блокировки либо связывания IL-6, или его рецептора (gp80) друг с другом, либо передачи его сигнала или экспрессии, можно ввести субъекту с кардиоренальным синдромом, в фармацевтической композиции, при этом фармацевтическая композиция содержит эффективное количество указанного средства и подходящее вспомогательное вещество. В соответствии с одним вариантом осуществления, средство представляет собой антагонист IL-6 или антитело к IL-6, которое уменьшает уровень или активность полипептида или полинуклеотида IL-6 у субъекта или ингибирует внутриклеточную передачу сигнала, запускаемую активацией рецептора IL-6. Можно ввести антитело к IL-6 (например, MEDI5117). Способы лечения кардиоренального синдрома могут варьировать в зависимости от стадии кардиоренального синдрома, возраста пациента, состояния здоровья и физического состояния.

В соответствии с различными вариантами осуществления, субъектов с кардиоренальным синдромом лечат антагонистом IL-6. Кроме того, субъектов с повышенным риском смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой, и/или сердечной недостаточности после инфаркта миокарда можно выявить путем получения характеристики уровня IL-6 в плазме крови у субъекта. Субъекты с повышенными уровнями IL-6 имеют повышенный риск смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой, и/или сердечной недостаточности. Таких субъектов можно отобрать для лечения антагонистом IL-6. Дополнительно, для лечения могут быть отобраны субъекты, имеющие сердечно-сосудистый синдром и повышенные уровни IL-6, в том числе такие субъекты, которые перенесли инфаркт миокарда. После отбора для лечения таким субъектам можно вводить по сути любой известный из уровня техники антагонист IL-6. К подходящим антагонистам IL-6 относятся, например, известные антагонисты IL-6, коммерчески доступные антагонисты IL-6, антагонисты IL-6, разработанные с помощью хорошо известных из уровня техники способов, и антагонисты внутриклеточных сигнальных систем, ассоциированных с IL-6R.

В соответствии с другим аспектом, настоящее изобретение относится к анализам для характеристики риска смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой, сердечной недостаточности и/или смертности у субъекта после инфаркта миокарда. С помощью анализов производят детекцию IL-6 в биологическом образце, полученном от субъекта. IL-6 можно детектировать любым подходящим способом. В соответствии с одним вариантом осуществления, риск смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой, или сердечной недостаточности характеризуют посредством детекции уровня полипептида IL-6 в биологическом образце (например, сыворотке или плазме крови) субъекта относи-

тельно экспрессии у эталона (например, сыворотки или плазмы крови от здорового контрольного субъекта или от контрольного субъекта, у которого нет кардиоренальной патологии), при этом повышение IL-6 свидетельствует о повышенном риске смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой, или сердечной недостаточности. Субъектов, которые были выявлены как имеющие повышенный риск смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой, сердечной недостаточности или смертности, можно отбирать для лечения. В соответствии с другим вариантом осуществления, субъекта с кардиоренальным синдромом и повышенными уровнями IL-6 отбирают для лечения антагонистом IL-6 (например, антителом к IL-6).

В соответствии с одним вариантом осуществления, измеряют уровень полинуклеотида IL-6. Уровни полинуклеотидов IL-6 можно измерить стандартными способами, такими как количественная ПЦР, нозерн-блоттинг, микрочип, масс-спектрометрия и гибридизация *in situ*.

В соответствии с одним вариантом осуществления, измеряют уровень полипептида IL-6. Уровни полипептидов IL-6 можно измерить стандартными способами, такими как иммуноанализ. Иммуноанализ обычно предусматривает использование антитела (или другого средства, которое специфически связывает маркер) для детекции наличия или уровня биомаркера в образце. Антитела можно получить способами, хорошо известными из уровня техники, например, путем иммунизации животных биомаркером или его фрагментами. Биомаркеры можно выделить из образцов на основе их характеристик связывания. Альтернативно, если известна аминокислотная последовательность полипептидного биомаркера, можно синтезировать полипептид и применять его для создания антител с помощью способов, которые хорошо известны из уровня техники.

В соответствии с различными вариантами осуществления, анализы предусматривают использование традиционных иммуноанализов, включая, например, вестерн-блоттинг, иммуноанализы "сэндвич"-типа, в том числе ИФА, и другие ферментативные иммуноанализы, флуоресцентные иммуноанализы и хемилюминесценцию. Нефелометрия представляет собой проводимый в жидкой фазе анализ, при котором антитела находятся в растворе. Связывание антигена с антителом приводит к изменениям поглощающей способности, которую и измеряют. К другим формам иммуноанализа относятся магнитный иммуноанализ, радиоиммунологический анализ и иммуноколичественная ПЦР в режиме реального времени (iqPCR). К другим способам детекции относятся жидкостная хроматография и масс-спектрометрия.

Иммуноанализы можно проводить на твердых субстратах (например, чипах, гранулах, микроструйных платформах, мембранах) или на любых других формах, которые поддерживают связывание антитела с маркером и последующую детекцию. За раз можно детектировать один маркер или можно применять мультиплексный формат. Мультиплексный иммуноанализ может предусматривать использование плоских микрочипов (белковых чипов) или гранульных микрочипов (суспензионные анализы).

Пациентов с кардиоренальным синдромом, которые выявлены как имеющие повышенные уровни полипептидов IL-6, отбирают для лечения средством, которое уменьшает экспрессию или активность IL-6 (например, антителом к IL-6). Лечение можно производить в комбинации со стандартным лечением кардиоренального синдрома (например, ингибитором АСЕ). Пациентов, которых лечат с помощью способа по настоящему изобретению, можно отслеживать путем детекции изменений IL-6 после лечения.

Другие аспекты и варианты осуществления представлены в приведенных далее пронумерованных пунктах.

1. Способ лечения повреждения сердца и/или почки у субъекта с кардиоренальным синдромом, причем способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6.

2. Способ повышения сердечной функции у субъекта с кардиоренальным синдромом, причем способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6.

3. Способ уменьшения фиброза у субъекта с кардиоренальным синдромом, причем способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6.

4. Способ по п.2, предусматривающий, что повышение сердечной функции характеризуется увеличением у субъекта фракции выброса относительно эталона.

5. Способ по п.3, предусматривающий, что фиброз находится в ткани сердца.

6. Способ по пп.3 или 5, предусматривающий, что уменьшение фиброза характеризуется снижением процента фиброзной ткани в образце ткани от субъекта относительно эталона.

7. Способ по любому из пп.1-6, предусматривающий, что субъект имеет повреждение сердца и/или почки.

8. Способ по любому из пп.1-7, предусматривающий, что субъект имеет повреждение сердца, после которого имело место повреждение почки.

9. Способ по любому из пп.1-8, дополнительно предусматривающий введение субъекту стандартного средства профилактической терапии.

10. Способ по п.1-9, предусматривающий, что стандартное средство профилактической терапии представляет собой ингибитор ангиотензин-превращающего фермента (АСЕ).

11. Способ выявления повышенного риска смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой, у субъекта после инфаркта миокарда, причем способ предусматривает измерение уровня одного или нескольких из полинуклеотида или полипептида IL-6 в образце от субъекта относительно эталона,

причем повышенный уровень одного или нескольких из полинуклеотида или полипептида IL-6 свидетельствует о повышенном риске смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой.

12. Способ характеристики риска смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой, у субъекта после инфаркта миокарда, причем способ предусматривает измерение уровня одного или нескольких из полинуклеотида или полипептида IL-6 в образце от субъекта относительно эталона, причем повышенный уровень одного или нескольких из полинуклеотида или полипептида IL-6 свидетельствует о повышенном риске смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой.

13. Способ по п.11 или 12, предусматривающий, что субъект имеет кардиоренальный синдром, сердечную недостаточность, хроническую болезнь почек или не имеет кардиоренальной патологии.

14. Способ по любому из пп.11-13, предусматривающий, что субъект выявлен как имеющий кардиоренальный синдром, сердечную недостаточность, хроническую болезнь почек или как не имеющий кардиоренальной патологии спустя приблизительно один месяц после инфаркта миокарда.

15. Способ лечения повреждения сердца и/или почки у отобранного субъекта с кардиоренальным синдромом, причем способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6, при этом субъект отобран для лечения по детекции повышенного уровня одного или нескольких из полинуклеотида или полипептида IL-6 в биологическом образце от субъекта относительно эталона.

16. Способ снижения риска смертельного исхода, связанного с сердечно-сосудистой системой, у отобранного субъекта с кардиоренальным синдромом, причем способ предусматривает введение субъекту антагониста IL-6, при этом субъект отобран по детекции повышенного уровня одного или нескольких из полинуклеотида или полипептида IL-6 в биологическом образце от субъекта относительно эталона.

17. Способ по п.15 или 16, предусматривающий, что субъект уже перенес инфаркт миокарда.

18. Способ по любому из пп.1-10 или 15-17, предусматривающий, что антагонист IL-6 представляет собой антитело к IL-6.

19. Способ по п.18, предусматривающий, что антитело к IL-6 представляет собой MEDI5117.

20. Способ по любому из пп.11-19, предусматривающий, что биологический образец представляет собой образец плазмы крови.

21. Способ по любому из пп.1-20, предусматривающий, что субъектом является человек.

6.14. Примеры.

Приведенные далее примеры представлены с целью иллюстрации, а не ограничения.

6.14.1. Пример 1.

Дозировка EPO и общая выживаемость у пациентов с хронической болезнью почек коррелирует с уровнями IL-6 и CRP в сыворотке крови только у пациентов по меньшей мере с одной копией основного аллеля SNP rs855791 TMPRSS6.

Пептидный гормон, гепсидин, играет центральную роль в системном гомеостазе железа. Hentze et al., *Cell*, 142:24-38 (2010). Известно, что экспрессия гепсидина находится под влиянием продукта гена TMPRSS6, матриптазы-2, трансмембранной серин-протеазы II типа. Было показано, что обычные варианты гена TMPRSS6 коррелируют со статусом железа, Benyamin et al., *Nature Genetics*, 41(11):1173-1175 (2009), и было показано, что определенные мутации в гене TMPRSS6 вызывают железорефрактерную и железодефицитную анемию (IRIDA), Finberg et al., *Nature Genetics*, 40(5):569-571 (2008). SNP rs855791 (2321G→A; A736V) является естественным вариантом гена TMPRSS6, который ассоциирован с естественными колебаниями экспрессии гепсидина и уровнями гемоглобина в крови.

Для определения того, мог ли генотип SNP rs855791 TMPRSS6 служить прогнозом степени анемии при болезни почек на конечной стадии, данные, ранее собранные в клинических исследованиях пациентов с хронической болезнью почек, были проанализированы в сочетании с недавно определенным генотипированием SNP. Поскольку экспрессия гепсидина также регулируется посредством IL-6, Casanovas et al., *PLOS Computational Biol.* 10(1):e1003421 (2014), данные были также проанализированы с целью определения, могли ли уровни IL-6 в сыворотке крови служить прогнозом степени анемии при заболевании почек на конечной стадии.

Способы.

Проверяли данные от N=257 пациентов, участвовавших в когортах MIMICK1, MIMICK2 (Mapping of Inflammatory Markers in Chronic Kidney Disease - "Картирование маркеров воспаления при хронической болезни почек") и MIA (недостаточное питание, воспаление и атеросклероз), которые были завербованы за период с октября 2003 г. по сентябрь 2004 г. в шести отделениях для диализа в регионе Стокгольм - Уппсала (Швеция), сведя до N=208 по критериям общеизвестного метода диализа: ферритин >100 нг/мл и Hb>10 мг/дл, для отбора пациентов, которые были стабильны при гемодиализе без железодефицита и без выраженной анемии, таким образом исключив пациентов с факторами, которые могли разделить регуляцию железа и уровни гемоглобина.

Все клинические данные пациентов, в том числе дозу эритропоэтина (EPO) в МЕ/кг/неделя, уровень IL-6 в сыворотке крови в пг/мл, уровень CRP в сыворотке крови в мг/л, выживаемость в месяцах и генотип TMPRSS6 по SNP rs855791, сопоставляли и анализировали с помощью программного обеспечения для статистического анализа (SPSS Statistics Desktop; IBM). Исследованные аллели TMPRSS6 и их нуклеотид и аминокислота указаны в таблице.

Аллели TMPRSS6

Аллель <i>TMPRSS6</i>	Нуклеотид в положении 2321	Аминокислота в положении 736
Основной	G или C	Ala
Минорный	A или T	Val

Когорту разделяли на подгруппы rs855791 (гомозиготная AA, гетерозиготная AG и гомозиготная GG) и каждую группу генотипа разделяли на тертили или квартили по уровню IL-6 в сыворотке крови (например, IL-6 <5 пг/мл относительно >10 пг/мл и IL-6 <5 пг/мл относительно >15 пг/мл) или уровню CRP в сыворотке крови (CRP <2 мг/л относительно >2 мг/л). Проводили сравнения между дозой ЕРО в верхнем и нижнем тертилях и квартилях. Проводили статистический анализ в группах генотипов с помощью Т-критерия Стьюдента и между группами с помощью дисперсионного анализа.

Результаты.

Поскольку доза ЕРО у каждого пациента была подобрана лечащими врачами для достижения нормальных уровней гемоглобина, дозу ЕРО можно было использовать в качестве показателя для лежащей в его основе степени анемии. Было обнаружено, что доза ЕРО у субъектов, гомозиготных по минорному аллелю (A/A), была относительно нечувствительной к колебаниям IL-6 (фиг. 1А; левая секция). Тем не менее доза ЕРО у субъектов по меньшей мере с одной копией основного аллеля, т.е. пациентов, гетерозиготных (A/G) или гомозиготных (G/G) по основному аллелю (G), была чувствительной к их уровню IL-6 (фиг. 1В; правая секция). У этих последних субъектов повышенные уровни IL-6 в сыворотке крови (например, >5 пг/мл) были ассоциированы с увеличенной дозой ЕРО.

Без привязки к определенной теории, гомозиготность по минорному аллелю устраняла влияние IL-6 на регуляцию железа. Таким образом, доза ЕРО у этих пациентов (A/A) была примерно одинаковой, независимо от уровня IL-6.

У субъектов, гомозиготных по минорному аллелю rs855791 TMPRSS6 (A), наблюдали схожую смертность, независимо от уровней IL-6 (фиг. 2А). Тем не менее выживаемость у субъектов по меньшей мере с одной копией основного аллеля, т.е. пациентов, гетерозиготных или гомозиготных по основному аллелю (G), варьировала в зависимости от уровня IL-6 (фиг. 2В). Фактически, аллель G TMPRSS6 давал более высокую общую смертность в ответ на повышенные уровни IL-6 у находящихся на диализе субъектов с хронической болезнью почек 5-й стадии. У субъектов по меньшей мере с одной копией основного аллеля (G) уровни IL-6 <5 пг/мл (т.е. средний и верхний тертиль IL-6) были ассоциированы с повышенной смертностью по сравнению с уровнями IL-6 <5 пг/мл (т.е. нижний тертиль IL-6) (фиг. 2В).

Уровень реагента острой фазы, CRP, маркера воспаления, также коррелировал с повышенной дозировкой ЕРО у субъектов, гетерозиготных или гомозиготных по основному аллелю (G), но не у пациентов, гомозиготных по минорному аллелю (фиг. 3).

Обсуждение.

Как показано на фиг. 1, степень лежащей в основе анемии, измеряемая как клинически подобранная доза ЕРО, коррелировала с уровнями IL-6 только у пациентов, имеющих по меньшей мере одну копию основного аллеля с SNP rs855791 TMPRSS6. У этих пациентов чем выше был уровень IL-6 в сыворотке крови, тем выше была необходимая доза ЕРО (фиг. 1В). Напротив, степень анемии у пациентов, имеющих две копии минорного аллеля, не коррелировала с уровнями IL-6 в сыворотке крови (фиг. 1А).

Аналогичным образом, общая выживаемость коррелировала с уровнем IL-6 только у пациентов по меньшей мере с одной копией основного аллеля с SNP rs855791 TMPRSS6. У субъектов, имеющих по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMPRSS6, выживаемость обратно коррелировала с уровнем IL-6 в сыворотке крови, причем пациенты в наивысшем тертиле уровней IL-6 в сыворотке крови имели статистически достоверно худшую выживаемость, чем в наинизшем тертиле уровня IL-6 (фиг. 2В). Напротив, общая выживаемость пациентов, гомозиготных по минорному аллелю в rs855791, не зависела от уровней IL-6 (фиг. 2А).

Не желая связывать себя какой-либо теорией, у пациентов, имеющих по меньшей мере одну копию основного аллеля TMPRSS6, увеличение IL-6 в сыворотке крови может приводить к увеличению экспрессии гепсидина, тем самым повышая анемию. Повышенный риск смертности является следствием нарушенного метаболизма железа, развившейся в результате анемии и/или увеличенной дозы стимулирующего эритропоз средства, такого как ЕРО. Если эти корреляции отражают причинно-следственную взаимосвязь, они повышают вероятность того, что снижение уровней IL-6 или передачи сигнала IL-6 может снизить анемию, уменьшить необходимую дозу ЕРО и увеличить выживаемость у пациентов с хронической болезнью почек, но только у тех пациентов, у которых есть по меньшей мере одна копия основного аллеля rs855791 TMPRSS6, и с наибольшим эффектом у пациентов с повышенными уровнями IL-6 в сыворотке крови.

6.14.2. Пример 2.

Риск смертельного исхода и риск сердечной недостаточности после острого инфаркта миокарда коррелирует с уровнями IL-6 в сыворотке крови только у пациентов по меньшей мере с одной копией

основного аллеля SNP rs855791 TMPRSS6.

Для определения, влияет ли генотип rs855791 TMPRSS6 на чувствительность к IL-6 у пациентов с острым, но не хроническим заболеванием, анализировали данные, ранее собранные в клинических исследованиях пациентов, госпитализированных с острым коронарным синдромом, в сочетании с недавно определенным генотипированием SNP.

Способы.

Данные анализировали от субъектов, ранее участвовавших в многоцентровом исследовании ингибирования тромбоцитов и результатов лечения пациентов (Platelet Inhibition and Patient Outcomes - PLATO). Пациенты имели право на зачисление в PLATO, если они были госпитализированы по причине острого коронарного синдрома с появлением симптомов в течение предыдущих 24 ч. Смертность и наличие сердечной недостаточности измеряли у этих субъектов, начиная с 30 дней после инфаркта миокарда.

Результаты.

Смертность субъектов, гомозиготных по минорному аллелю (A) SNP rs855791 TMPRSS6, не коррелировала с колебаниями IL-6 (фиг. 4A). Тем не менее одна или две копии основного аллеля (G) давали более высокую общую смертность в ответ на повышенные уровни IL-6 у субъектов после инфаркта миокарда (фиг. 4B). Таким образом, TMPRSS6 модулировал опосредованный IL-6 риск смертельного исхода после инфаркта миокарда.

Влияние генотипа TMPRSS6 на опосредованный IL-6 риск сердечной недостаточности также измеряли у субъектов, участвовавших в PLATO, начиная с 30 дней после инфаркта миокарда. Сердечная недостаточность у субъектов, гомозиготных по минорному аллелю (A), не коррелировала с колебаниями IL-6 (фиг. 5A). Тем не менее, аллель G TMPRSS6 давал более высокую частоту сердечной недостаточности в ответ на повышенные уровни IL-6 у субъектов после инфаркта миокарда (фиг. 5B). Таким образом, TMPRSS6 модулировал опосредованный IL-6 риск сердечной недостаточности после инфаркта миокарда.

Обсуждение.

Из этих данных видно, что корреляция между генотипом TMPRSS6, уровнями IL-6 и неблагоприятными клиническими результатами не ограничена пациентами с хронической болезнью почек. Не желая связывать себя какой-либо теорией, у пациентов, имеющих по меньшей мере одну копию основного аллеля TMPRSS6, увеличение IL-6 в сыворотке крови может приводить к увеличению экспрессии гепсидина с последующим увеличением секвестрации железа в кардиомиоцитах с последующей опосредованной железом клеточной токсичностью. Если такие корреляции отражают причинно-следственную взаимосвязь, они повышают вероятность того, что снижение уровней IL-6 или передачи сигнала IL-6 может снизить сердечную недостаточность и смертность у пациентов с острым коронарным синдромом, но только у тех пациентов, у которых есть по меньшей мере одна копия основного аллеля rs855791 TMPRSS6, и с наибольшим эффектом у пациентов с повышенными уровнями IL-6 в сыворотке крови.

6.14.3. Пример 3.

Исследования *in vitro* на полученных из iPS кардиомиоцитах человека подтверждают причинно-следственную взаимосвязь между генотипом TMPRSS6 и опосредованной IL-6 цитотоксичностью.

Несмотря на то, что корреляции, наблюдаемые в примерах 1 и 2, свидетельствуют, что снижение опосредованной IL-6 передачи сигнала должно давать клинический положительный эффект у пациентов, имеющих по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMPRSS6, повышенные уровни IL-6 и либо анемию, либо опосредованную гепсидином клеточную токсичность, наблюдаемые корреляции не подтверждали причинно-следственную взаимосвязь. Соответственно, проводили эксперименты на полученных из индуцированных плюрипотентных клеток человека кардиомиоцитах (iPS-CM), трансфицированных вариантами TMPRSS6, для проверки влияния BMP и BMP совместно с IL-6 на экспрессию гепсидина и клеточную восприимчивость к ишемическому повреждению.

6.14.3.1. Способы.

Культивирование полученных из iPS человека кардиомиоцитов. Кардиомиоциты iCell (Cellular Dynamics International, CDI Inc.) высевали на 0,1% покрытый желатином 6-луночный или 96-луночный культуральный планшет с пластинчатой средой для кардиомиоцитов iCell (CDI Inc.). Спустя 48 ч после высевания пластинчатую среду заменяли на поддерживающую среду (CDI Inc.). Поддерживающую среду заменяли раз в два дня до дня проведения эксперимента.

Протокол имитированной ишемии/реоксигенации: кардиомиоциты iPS подвергали имитированной ишемии (SI) в течение 90 мин путем замены клеточной среды на "ишемический буфер", который содержал 118 мМ NaCl, 24 мМ NaHCO₃, 1,0 мМ NaH₂PO₄, 2,5 мМ CaCl₂·2H₂O, 1,2 мМ MgCl₂, 20 мМ лактата натрия, 16 мМ KCl, 10 мМ 2-дезоксиглюкозы (pH доведен до 6,2), как сообщалось ранее (Das, A., Xi, L., and Kukreja, K.C. (2005), J. Biol. Chem. 280:12944-12955; Das A., Smolenski A., Lohmann S.M., Kukreja R.C. (2006), J. Biol. Chem. 281(50):38644-52). Клетки инкубировали при 37°C в инкубаторе с контролем содержания трех газов, контролируя 1-2% O₂ и 5% CO₂ в течение всего периода SI. Реоксигенацию (RO) осуществляли путем замены ишемического буфера на нормальную клеточную среду в условиях с нормальным содержанием кислорода. Некроз клеток наблюдали спустя соответственно 2 или 18 ч

реоксигенации. Клетки iCell подвергали 4 ч SI и 24 ч RO, как описано выше.

Оценка жизнеспособности и апоптоза клеток. Анализ исключения трипанового синего проводили для оценки некроза клеток, как описано ранее (Das, A., Xi, L., and Kukreja, K.C. (2005), *J. Biol. Chem.* 280, 12944-12955; Das A., Smolenski A., Lohmann S.M., Kukreja R.C. (2006), *J. Biol. Chem.* 281(50):38644-52).

Трансфекция кардиомиоцитов iCell. На 8-й день после высевания среду заменяли свежей поддерживающей средой и клетки инкубировали в течение 4 ч. Клетки трансфицировали посредством pCMV6-XL5 TMPRSS6 (K523) или pCMV6-XL5 TMPRSS6 (K523) V763A с использованием реагента для трансфекции ViaFect™ в соответствии с инструкцией производителя (Promega Corp., Мэдисон, Висконсин). Спустя 48 ч после трансфекции на клетках ставили дальнейшие эксперименты.

Вестерн-блоттинг. Вестерн-блоттинг проводили, как описано ранее (Das, A., Xi, L., and Kukreja, K.C. (2005), *J. Biol. Chem.* 280, 12944-12955; Das A., Smolenski A., Lohmann S.M., Kukreja R.C. (2006), *J. Biol. Chem.* 281(50):38644-52). Общий растворимый белок экстрагировали из клеток буфером для лизиса (Cell Signaling, Массачусетс). Гомогенат центрифугировали на 10000×g в течение 5 мин при 4°C и выделяли надосадочную жидкость. Белок (50 мкг из каждого образца) отделяли с помощью 12% акриламидных гелей и переносили на нитроцеллюлозную мембрану, а затем блокировали 5% обезжиренным сухим молоком в TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 100 mM NaCl и 0,1% Tween 20) в течение 1 ч. Затем мембрану инкубировали в течение ночи с моноклональным/поликлональным первичным антителом кролика или поликлональным первичным антителом козы в разведении 1:1000 для каждого из соответствующих белков, т.е. mAb кролика фосфо-беклин 1 (Ser93) (D9A5G), беклин-1, SQSTM1/p62, mAb кролика LC3A/B (D3U4C) XP®, mAb кролика фосфо-Akt (Ser473) (D9E) XP®, mAb кролика Akt (пан) (C67E7), mAb кролика к рибосомальному белку фосфо-S6 (Ser240/244) (D68F8) XP®, mAb кролика к рибосомальному белку S6 (5G10) от Cell Signaling, Массачусетс, антителом к матриптазе 2 (TMPRSS6) и антителом к SLC40A1 (ферропортин) от Abcam Company, Массачусетс, и поликлональным антителом козы к актину, конъюгированным с HRP (Santa Cruz Biotechnology, Техас). Затем мембраны инкубировали со вторичным антителом, конъюгированным с пероксидазой хрена, к антителам кролика (разведение 1:2000, Amersham Biosciences) в течение 2 ч. Блоты проявляли с использованием хемиллюминесцентной системы, а бэнды сканировали и количественно оценивали с помощью денситометрического анализа.

Анализ ПЦР в режиме реального времени Taqman. Общую РНК, включая малую РНК, выделяли с использованием мини-набора miRNeasy в соответствии с протоколом производителя (QIAGEN Sciences, Мэриленд, США). Концентрацию и чистоту выделенной РНК измеряли с помощью спектрофотометра Nanodrop ND-1000 (Agilent technologies, Калифорния, США). Вкратце, 1 мкг общей РНК преобразовывали в кДНК со случайным гексамером с использованием набора для высокоэффективного синтеза кДНК (Applied Biosystems, Калифорния, США). Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием следующих условий ПЦР: 25°C в течение 10 мин; 37°C в течение 120 мин и 85°C в течение 5 мин. ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием ампликон-специфических зондов Taqman (Applied Biosystems, Калифорния, США) Hmp (CGGCTCTGCAGCCTTG) (SEQ ID NO: 20) при следующих условиях цикла ПЦР: 95°C в течение 10 мин; 95°C в течение 15 с и 60°C в течение 60 с. Экспрессию Hmp нормализовали к конститутивному гену GAPDH (CTTCCAGGAGCGAGATCCCGCTAA) (SEQ ID NO: 21).

Относительную экспрессию гена анализировали с помощью способа 2-ΔΔCt.

Мутагенез TMPRSS6 и трансфекция клеток iPS. pCMV6-XL5 TMPRSS6 приобретали у Origene Technologies (Роквилл, Мэриленд), каталожный номер SC306623, что соответствует номеру доступа в GenBank NM 153609. Этот клон содержал мутацию, приводящую к аминокислотной замене K253A. Был проведен сайт-направленный мутагенез для превращения аминокислоты в положении 253 в канонический лизин (K). После подтверждения превращения проводили сайт-направленный мутагенез для введения мутации V736A. Все реакции мутагенеза проводили с использованием набора мутагенеза для сайт-направленного мутагенеза Agilent Technologies QuikChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Санта-Клара, Калифорния; каталожный номер 200521). Все векторы секвенировали для подтверждения. Последовательности использованных праймеров были следующими: антисмысловая (as) TMPRSS6 E253K GCATGAGGTCTTGGGGCCCTGCAG (SEQ ID NO: 22); смысловая (s) TMPRSS6 E253K CTGCAGGGCCCAAGGACCTCATGC (SEQ ID NO: 23); антисмысловая (as) TMPRSS6 V736A CCTGGTAGCGATAGGCCTCGCTGCACAGG (SEQ ID NO: 24); смысловая (s) TMPRSS6 V736A CCTGTGCAGCGAGGCCTATCGCTACCAGG (SEQ ID NO: 2).

6.14.3.2. Результаты.

iPS-СМ человека лишь минимально экспрессировали матриптазу-2 в начале исследования. Клетки трансфицировали конструкцией, управляющей конститутивной экспрессией матриптазы-2 736A, кодируемой основным аллелем SNP rs855791 TMPRSS6, или матриптазы-2 736V, кодируемой минорным аллелем, имитируя соответственно кардиомиоциты с гомозиготным основным аллелем и гомозиготным минорным аллелем.

Экспрессия гепсидина регулируется обоими сигнальными путями: BMP6/SMAD и IL-6/STAT, причем BMP и IL-6 действуют через их соответствующие рецепторы и управляют экспрессией гепсидина.

Casanovas et al., PLOS Comp. Biol. 10(1):e1003421 (2014). Кардиомиоциты iPS с основным и минорным аллелем обрабатывали *in vitro* агонистами обоих сигнальных путей: рекомбинантным BMP2 и IL-6 или только BMP2 для моделирования клинических вмешательств, при которых уровни IL-6 (или передача сигнала) снижаются. Контрольные клетки iPS не обрабатывали вообще никаким агонистом. Клеточную смертность измеряли при нормальном давлении кислорода (нормальные кислородные условия), а также в условиях, которые имитируют гипоксию с последующей реоксигенацией (реперфузией).

На фиг. 6A показаны результаты, когда клетки были обработаны при нормальных уровнях кислорода. На кардиомиоциты iPS, экспрессирующие только минорный аллель rs855791 Tmprss6 ("минорный аллель 736V"), не оказывалось существенного влияния ("n.s.") при устранении передачи сигнала IL-6: смертность клеток, измеренная как процент положительных по трипановому синему клеток, незначительно снижалась при обработке клеток только BMP2 по сравнению с обработкой BMP2+IL-6. Напротив, у кардиомиоцитов iPS, экспрессирующих основной аллель rs855791 Tmprss6, наблюдали статистически значимую более низкую клеточную гибель при устранении передачи сигнала IL-6.

На фиг. 6B показаны результаты, когда клетки были подвергнуты гипоксии с последующей реоксигенацией. По сравнению с условиями с нормальным содержанием кислорода гипоксия/реоксигенация является значимо токсичной для кардиомиоцитов iPS, при этом погибает приблизительно 40 процентов контрольных клеток с основным и минорным аллелем по сравнению с приблизительно 20% контрольными клетками в условиях с нормальным содержанием кислорода (ср. фиг. 6B - фиг. 6A). Относительно такой повышенной фоновой токсичности, на кардиомиоциты iPS с минорным аллелем не оказывалось существенного влияния при устранении передачи сигнала IL-6: смертность клеток уменьшалась незначительно, если клетки были обработаны только BMP2 по сравнению с обработкой посредством BMP2 + IL-6. Напротив, у кардиомиоцитов iPS, экспрессирующих основной аллель rs855791 Tmprss6, наблюдали статистически значимую более низкую клеточную гибель при устранении передачи сигнала IL-6.

6.14.3.3. Обсуждение.

Эти данные дают веское подтверждение выводам, сделанным по результатам апостериорного анализа данных клинических испытаний в примерах 1 и 2: снижение передачи сигнала IL-6 может быть эффективным для снижения опосредованной IL-6 токсичности у кардиомиоцитов, экспрессирующих основной аллель rs855791 Tmprss6, но не у кардиомиоцитов, экспрессирующих только минорный аллель. Без привязки к какой-либо теории, управляемое IL-6 повышение токсичности у кардиомиоцитов iPS с основным аллелем может быть результатом опосредованного IL-6 увеличения экспрессии гепсидина с последующим увеличением секвестрации железа в клетках и с последующей опосредованной железом клеточной токсичностью.

6.14.4. Пример 4.

Терапия антителом к IL-6 столь же эффективна, как и стандартное средство профилактической терапии в модели кардиоренального синдрома у крыс, генотипически аналогичных человеческим гомозиготам по основному аллелю rs855791 Tmprss6

У пациентов с хронической болезнью почек, таких как те, которые участвовали в исследованиях MIMICK, проанализированных в примере 1, часто развивается нарушение сердечной функции, что является основным фактором, оказывающим влияние на показатели смертности. Такое вторичное повреждение миокарда после первичной хронической болезни почек называется кардиоренальным синдромом 4-го типа (CRS 4-го типа).

Для проверки, эффективна ли терапия антителом к IL-6 в качестве лечения у пациентов с CRS4, имеющих по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 Tmprss6, как это было предположено по данным в примерах 1 и 3, авторы настоящего изобретения использовали модель CRS4 у крыс, которые генотипически аналогичны людям, гомозиготным по основному аллелю rs855791 Tmprss6. На фиг. 7 изображена схема исследования.

На 0-й неделе индуцировали инфаркт миокарда у животных с CRS. На 2-й неделе проводили нефрэктомии. Контрольной группе вместо этого проводили имитации операций. Перед нефрэктомией проводили различные оценки субъектов. Оценки включали измерения креатинина в сыворотке крови, скорости клубочковой фильтрации, 24-часовых уровней белка в моче, эхокардиографию, артериального давления с хвостовой манжетой и биомаркеров в плазме крови и в моче.

Обработку начинали в 1-й день после нефрэктомии. Животных разделяли на три группы:

- (i) контрольная обработка;
- (ii) терапия антителом к IL-6;
- (iii) стандартное средство профилактической терапии.

В качестве терапии антителом к IL-6 использовали антитело к IL-6, пригодное для применения на грызунах. Стандартное средство профилактической терапии заключалось во введении периндоприла, ингибитора ACE (ангиотензин-превращающего фермента). В начале обработки производили оценки субъектов во всех группах. Оценки включали измерение креатинина в сыворотке крови, скорости клубочковой фильтрации, 24-часовых уровней белка и биомаркеров в плазме крови.

На 3- и 7-й дни после нефрэктомии проводили оценки субъектов во всех группах. Оценки включали

измерение креатинина в сыворотке крови и биомаркеров в плазме крови на 3-й день и измерение креатинина в сыворотке, скорости клубочковой фильтрации, 24-часовых уровней белка, эхокардиографию, артериального давления и биомаркеров в плазме крови на 7-й день.

На 6-й неделе субъектов умерщвляли. Перед умерщвлением проводили различные оценки субъектов во всех группах. Оценки включали измерение уровня креатинина в сыворотке крови, скорости клубочковой фильтрации, 24-часовых уровней белка, артериального давления, биомаркеров в плазме крови, эхокардиографию и анализ петли зависимости давление-объем. После умерщвления у субъектов во всех группах также брали ткани для гистологической оценки (т.е. окрашивания сердечной ткани красителем сириус красный).

На фиг. 8A-8D показана сердечная фракция выброса у крыс без CRS ("холост."), у животных с CRS, обработанных фармакологически нерелевантным антителом изотипического контроля ("изотип"), у животных с CRS, обработанных антителом к IL-6 ("Ab к IL-6"), и у животных с CRS, обработанных стандартным средством профилактической терапии, т.е. ингибитором ACE ("Peri") на модели кардиоренального синдрома, представленной на фиг. 7.

На фиг. 8A показаны исходные уровни фракции выброса для всех групп через две недели после инфаркта миокарда, но до нефрэктомии и до обработки, из которых видно, что экспериментально индуцированный инфаркт миокарда вызывал значительное снижение сердечной фракции выброса. На фиг. 8B показан график, на котором изображены уровни фракции выброса для всех групп через одну неделю после нефрэктомии, спустя 1 неделю обработки. На фиг. 8C показан график, на котором изображены уровни фракции выброса для всех групп через две недели после нефрэктомии, спустя 2 недели обработки. На фиг. 8D показан график, на котором изображены уровни фракции выброса для всех групп через четыре недели после нефрэктомии, спустя 4 недели обработки. Результаты выражены как среднее \pm SEM.

После 4 недель обработки у обеих групп обработки, т.е. группы, обработанной антителом к IL-6, и группы, обработанной стандартным средством профилактической терапии, представляющим собой ингибитор ACE, наблюдали статистически значимо повышенные уровни фракции выброса по сравнению с группой изотипического контроля (фиг. 8D) ($p < 0,001$). Аналогичные уровни фракции выброса в группах антитела к IL-6 и стандартного средства профилактической терапии, измеренные после 4-й недели обработки, свидетельствовали, что терапия антителом к IL-6 обладала эффективностью, эквивалентной таковой у ингибитора ACE периндоприл (стандартное средство профилактической терапии), демонстрируя, что терапия антителом к IL-6 обладала терапевтической эффективностью в отношении сохранения сердечной функции в модели кардиоренального синдрома, эквивалентной стандартному средству профилактической терапии, измеренной по изменениям сердечной фракции выброса.

Из результатов измерения сердечной сократимости (фиг. 9) видно, что терапия антителом к IL-6 также оказывала эффект, эквивалентный стандартному средству профилактической терапии, т.е. ингибитору ACE. Через 4 недели обработки сердечная сократимость в группах, обработанных антителом к IL-6 и стандартным средством профилактической терапии, значимо увеличивалась относительно сердечной сократимости группы изотипического контроля. Схожа сердечная сократимость в группах антитела к IL-6 и стандартного средства профилактической терапии свидетельствовала, что терапия антителом к IL-6 обладала эффективностью в отношении сохранения сердечной функции в модели кардиоренального синдрома, эквивалентной таковой у ингибитора ACE периндоприл (стандартное средство профилактической терапии), измеренной по сократимости.

По результатам измерения фиброза в ткани сердца, взятой у животных во всех группах, также было видно, что терапия антителом к IL-6 оказывала эффект, эквивалентный таковому у стандартного средства профилактической терапии (фиг. 10A-10C). Фиброз в ткани сердца оценивали количественно путем измерения процентной площади фиброзной ткани в двух участках: "нормальном" участке и участке "фиброзного края". Пример "нормального" участка обозначен обведенной контуром частью среза ткани, показанного на микрофотографии на фиг. 10A. На вставке на микрофотографии показан увеличенный вид "нормального" участка, на котором видно, что небольшие части "нормального" участка имели фиброзную ткань. Участок "фиброзного края" представлял собой участок ткани в "нормальном" участке, который был периферическим относительно фиброзной ткани.

На графиках на фиг. 10B и 10C видно, что у ткани сердца от субъектов в группах, обработанных антителом к IL-6 или стандартным средством профилактической терапии, была значимо уменьшенная процентная площадь фиброзной ткани по сравнению с группой изотипического контроля, в обоих случаях измерения проводили в "нормальном" участке (фиг. 10B) или в участке "фиброзного края" (фиг. 10C). Кроме того, процентные площади фиброзной ткани, измеренные в группах антитела к IL-6 и стандартного средства профилактической терапии, были схожими (как в "нормальном" участке, так и в участке "фиброзного края"), что свидетельствовало о том, что антитело к IL-6 оказывало противифиброзный эффект, эквивалентный ингибитору ACE периндоприл (стандартное средство профилактической терапии).

Из этих данных видно, что обработка антителом к IL-6 эффективна для снижения повреждения миокарда и восстановления функции в *in vivo* модели кардиоренального синдрома у животных, которые генотипически аналогичны людям, гомозиготным по основному аллелю rs855791 TMPRSS6.

6.14.5. Пример 5.

Терапия антителом к IL-6 эффективна при сохранении сердечной функции в модели острого инфаркта миокарда у мышей, генотипически аналогичных человеческим гомозиготам по основному аллелю rs855791 TMPRSS6/

Данные в примерах 2 и 3 позволяют предположить, что снижение уровней IL-6 или передачи сигнала IL-6 может снизить сердечную недостаточность и смертность у пациентов с острым коронарным синдромом, но только у тех пациентов, у которых есть по меньшей мере одна копия основного аллеля rs855791 TMPRSS6, и с наибольшим эффектом у пациентов с повышенными уровнями IL-6 в сыворотке крови.

Проводили исследование на грызунах для определения влияния терапии антителом к IL-6 после острого инфаркта миокарда у мышей, генотипически аналогичных людям, гомозиготным по основному аллелю rs855791 TMPRSS6.

На фиг. 11А и 11В показаны данные, полученные от модели *in vivo*, в которой инфаркт миокарда индуцировали у мышей, генотипически аналогичных людям, гомозиготным по основному аллелю rs855791 TMPRSS6. Контрольная группа не получала никакой терапии. Экспериментальную группу обрабатывали антителом к IL-6 мыши. На фиг. 11А показано, что обработка антителом к IL-6 обеспечивала статистически значимое улучшение фракции выброса. На фиг. 11В показано, что обработка антителом к IL-6 обеспечивала статистически значимое улучшение сократимости, измеренное как укорочение сердечной фракции. Из данных видно, что терапия антителом к IL-6, полученная сразу после инфаркта миокарда, улучшала функциональное восстановление левого желудочка у грызунов, которые генетически аналогичны пациентам-людям, имеющим основной аллель rs855791 TMPRSS6.

7. Включение при помощи ссылки.

Все публикации, патенты, патентные заявки и другие документы, приведенные в настоящем документе, настоящим включены посредством ссылки во всей их полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, патентная заявка или другой документ были указаны отдельно как включенные посредством ссылки для всех целей.

8. Эквиваленты.

Несмотря на то, что были проиллюстрированы и описаны различные конкретные варианты осуществления, вышеуказанное описание не является ограничительным. Понятно, что можно внести различные изменения без отклонения от идеи и объема настоящего изобретения(ий). После рассмотрения настоящего описания специалистам в настоящей области техники станут очевидны многие варианты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения сердечно-сосудистого заболевания у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к IL-6, где пациент имеет по меньшей мере одну копию основного аллеля rs855791 TMPRSS6 и где антитело к IL-6 представляет собой MED5117.

2. Способ по п.1, где сердечно-сосудистое заболевание представляет собой атеросклероз.

3. Способ по п.2, где сердечно-сосудистое заболевание представляет собой воспаление.

4. Способ по п.1, где субъект дополнительно имеет хроническую болезнь почек.

5. Способ по п.4, где субъект дополнительно имеет 1-ю стадию хронической болезни почек KDOQI.

6. Способ по п.4, где субъект дополнительно имеет 2-ю стадию хронической болезни почек KDOQI.

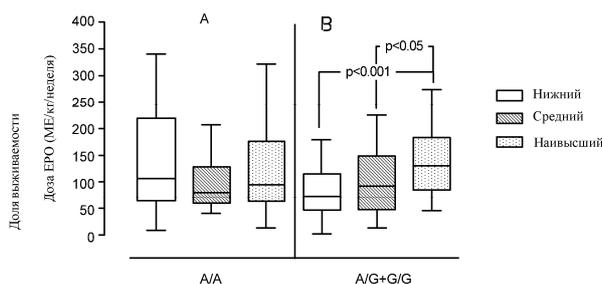
7. Способ по п.4, где субъект дополнительно имеет 3-ю стадию хронической болезни почек KDOQI.

8. Способ по п.4, где субъект дополнительно имеет 4-ю стадию хронической болезни почек KDOQI.

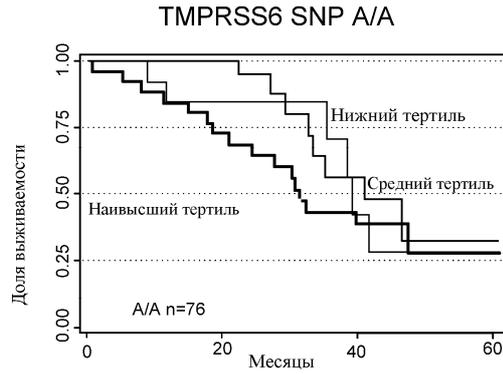
9. Способ по п.4, где субъект дополнительно имеет 5-ю стадию хронической болезни почек KDOQI.

10. Способ по п.3, где антитело к IL-6 вводят в количестве, эффективном для нейтрализации воспаления.

11. Способ по п.3, где субъект перед началом лечения имеет уровень С-реактивного белка более 2 мг/мл.



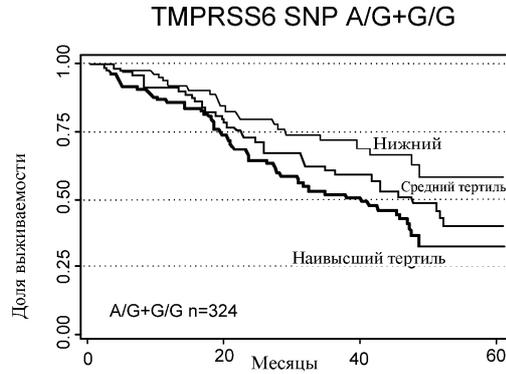
Фиг. 1



Многофакторный анализ Кокса с коррекцией по возрасту, полу, наличию DM и CVD

Тертиль П.б	Отн. рисков	Станд. ошибка	z	P>z	[95% доверит. интервал]	
Нижний						
Средний	4.000791	.2269197	-1.62	0.106	.1316302	1.216008
Наивысший	1.466279	.7326393	0.77	0.444	.5506888	3.904155

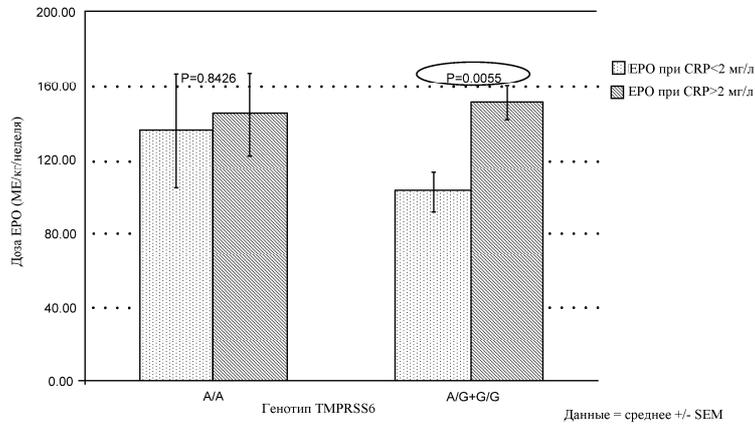
Фиг. 2А



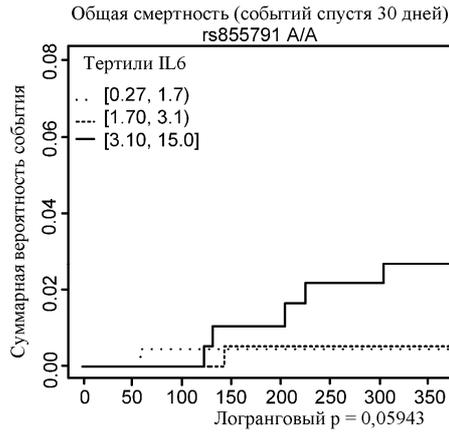
Многофакторный анализ Кокса с коррекцией по возрасту, полу, наличию DM и CVD

Тертиль П.б	Отн. рисков	Станд. ошибка	z	P>z	[95% доверит. интервал]	
Нижний						
Средний	1.457313	.3989344	1.38	0.169	.8521957	2.492105
Наивысший	1.817612	.4667099	2.33	0.020	1.098848	3.006526

Фиг. 2В

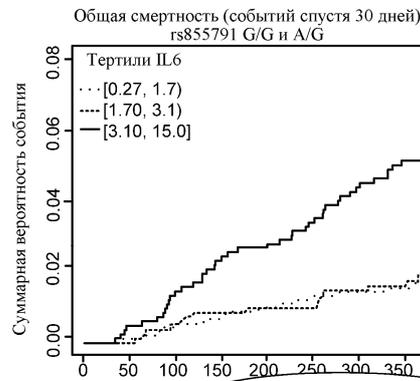


Фиг. 3



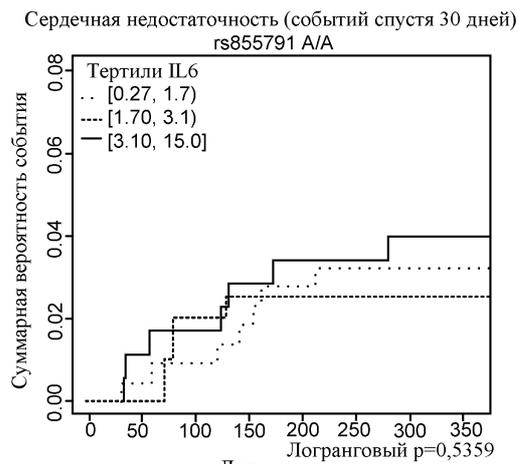
Пациенты с риском	Дни				
[0.27, 1.7)	223	222	222	221	217
[1.70, 3.1)	202	202	201	201	199
[3.10, 15.0]	185	185	183	181	178

Фиг. 4А



Пациенты с риском	Дни				
[0.27, 1.7)	910	904	896	880	863
[1.70, 3.1)	819	814	808	801	785
[3.10, 15.0]	825	808	795	773	761

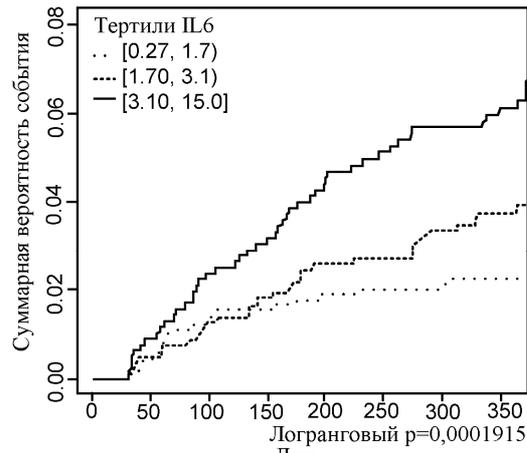
Фиг. 4В



Пациенты с риском	Дни				
[0.27, 1.7)	218	215	211	209	205
[1.70, 3.1)	199	195	193	193	191
[3.10, 15.0]	177	174	169	166	163

Фиг. 5А

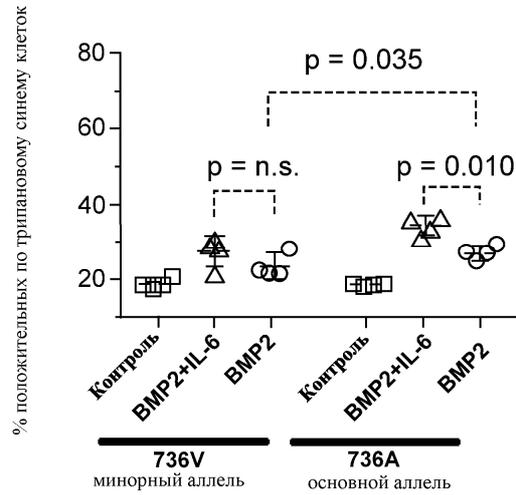
Сердечная недостаточность (событий спустя 30 дней)
rs855791 G/G и A/G



Пациенты с риском

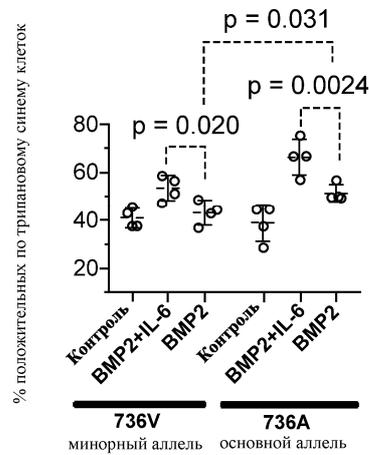
[0.27, 1.7)	897	881	869	853	835
[1.70, 3.1)	783	769	755	743	728
[3.10, 15.0]	760	730	706	682	670

Фиг. 5В

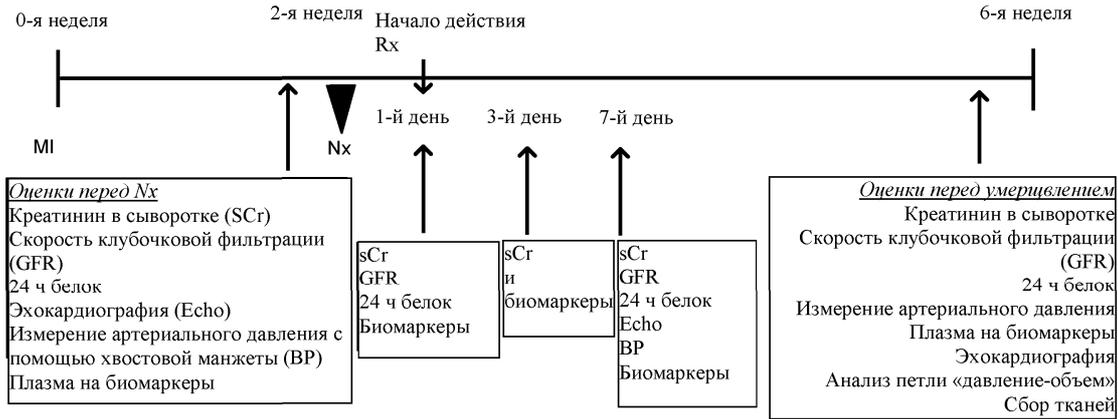


Фиг. 6А

Имитированная гипоксия-реоксигенация/реперфузия

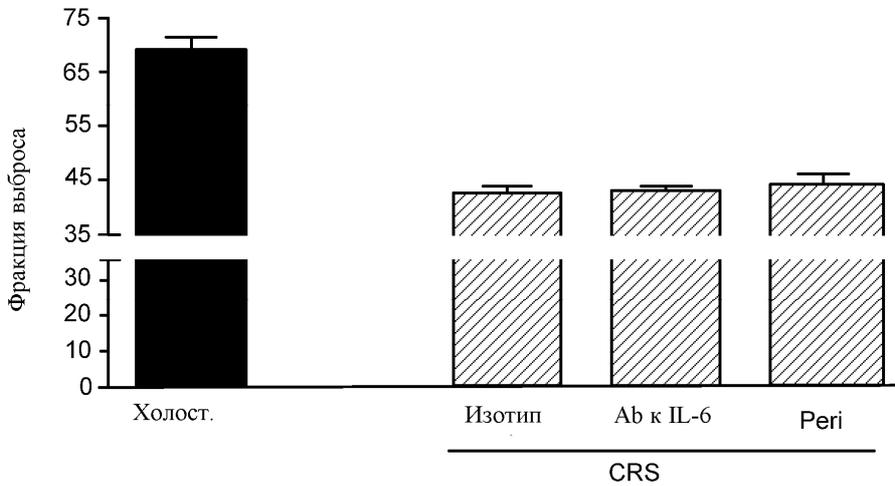


Фиг. 6В



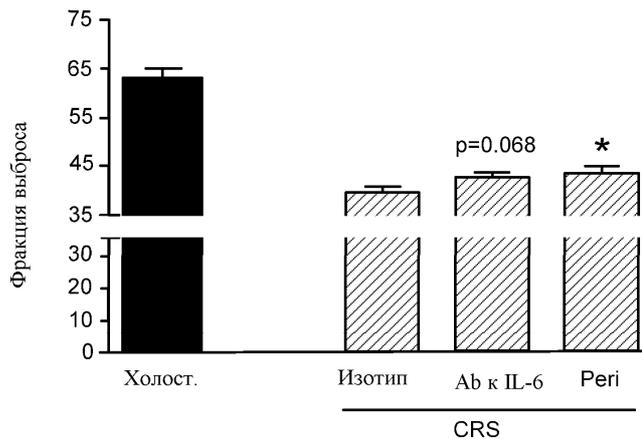
Фиг. 7

Исходный уровень для всех групп после MI, до нефрэктомии (без лекарственного средства)



Фиг. 8А

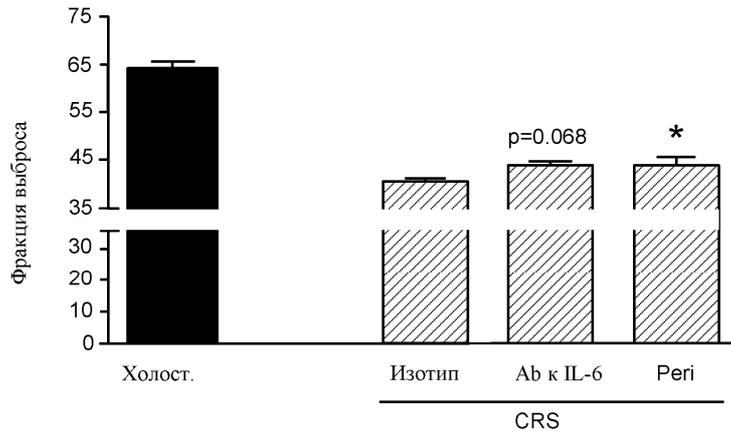
Одна неделя после нефрэктомии (1 неделя дозирования)



*p < 0.05 по сравнению с группой обработки изотипом

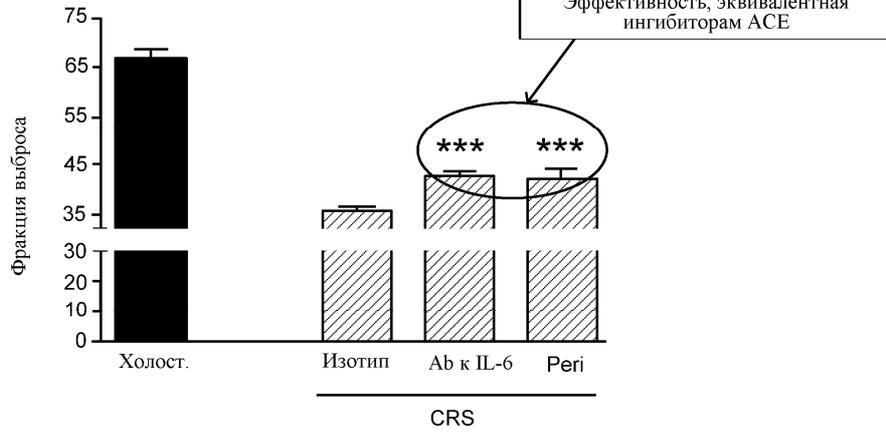
Фиг. 8В

Две недели после нефрэктомии
(2 недели лекарственного средства)



Фиг. 8С

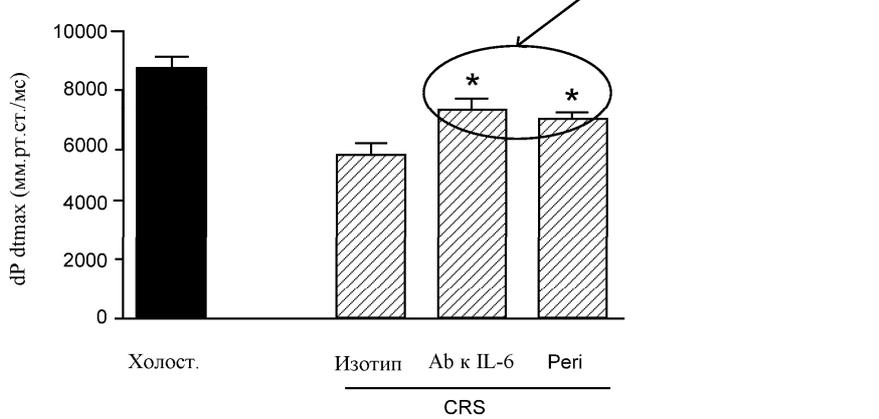
Конец исследования: 4 недели после
нефрэктомии (4 неделя дозирования)



*** $p < 0.001$ по сравнению с группой обработки изотипом

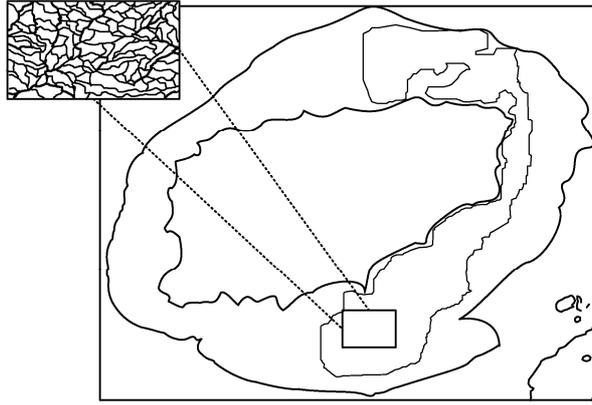
Фиг. 8D

Конец исследования: 4 недели после
нефрэктомии (4 неделя дозирования)

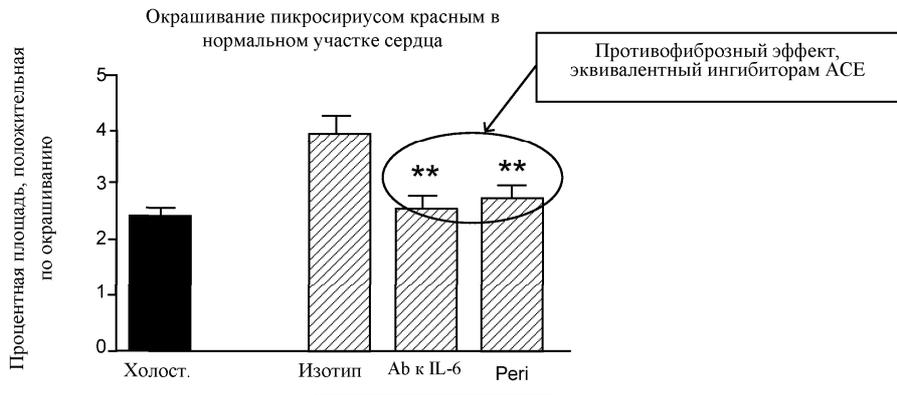


* $p < 0.05$ по сравнению с группой обработки изотипом

Фиг. 9



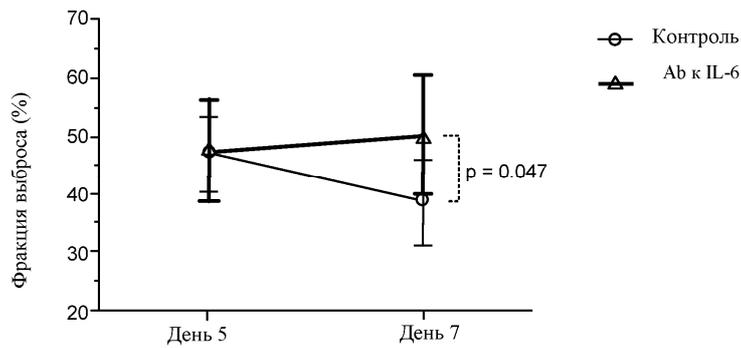
Фиг. 10А



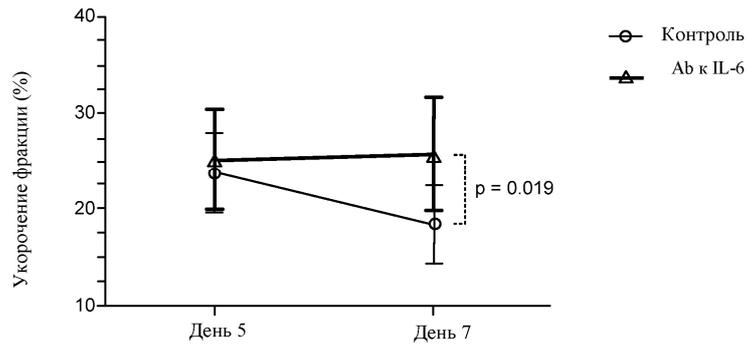
Фиг. 10В



Фиг. 10С



Фиг. 11А



Фиг. 11В