

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 488**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 45/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08002163 .7**
- 96 Fecha de presentación: **20.03.1998**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2011514**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **07.01.2009**

54 Título: **Un agente preventivo o terapéutico para enfermedades mediadas por células t sensibilizadas que comprende un antagonista de il-6 como ingrediente activo**

30 Prioridad:
21.03.1997 JP 6846797

73 Titular/es:
**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
5-1, UKIMA 5-CHOME, KITA-KU
TOKYO, 115-8543, JP**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
08.06.2012

72 Inventor/es:
Mihara, Masahiko

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
08.06.2012

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 382 488 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Un agente preventivo o terapéutico para enfermedades mediadas por células t sensibilizadas que comprende un antagonista de il-6 como ingrediente activo.

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un agente preventivo o terapéutico para enfermedades mediadas por células T sensibilizadas que comprende un antagonista del receptor de interleuquina-6 (IL-6) como un ingrediente activo. La presente invención se refiere también a un inhibidor de células T sensibilizadas que comprende un antagonista del receptor de interleuquina-6 (IL-6) como ingrediente activo. Además, la presente invención se refiere a un agente supresor de células T sensibilizadas que comprende un anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-6 como ingrediente activo.

Técnica Antecedente

15 La IL-6 es una citoquina que también se denomina factor estimulador de células B 2 (BSF2) o interferón β 2. La IL-6 se descubrió como un factor de diferenciación implicado en la activación de las células B linfáticas (Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76). Con posterioridad, se encontró que era una citoquina multifuncional que influye en diversas funciones de las células (Akira, S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78). Se ha informado de que la IL-6 induce la maduración de las células T linfáticas (Lotz et al., J. Exp. Immunol. 18: 1253-1258, 1988).

20 La IL-6 transmite su actividad biológica a través de dos tipos de proteínas en la célula. Uno de ellos es el receptor de IL-6, una proteína de unión al ligando con un peso molecular de aproximadamente 80 kD, al cual se une la IL-6. El receptor de IL-6 no sólo se produce en una forma unida a la membrana que penetra a través y se expresa en la membrana celular, sino también como un receptor de IL-6 soluble que consiste principalmente en la región extracelular.

25 La otra proteína es una proteína gp130 unida a la membrana que tiene un peso molecular de aproximadamente 130 kD que está implicada en la transducción de la señal. La IL-6 y el receptor de IL-6 forman el complejo de IL-6/receptor de IL-6 que, después de unirse a gp130, transmite su actividad biológica a la célula (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967).

30 El antagonista de IL-6 es una sustancia que inhibe la transducción de la actividad biológica de IL-6. En cuanto al antagonista de IL-6, se conocen hasta ahora anticuerpos dirigidos contra IL-6 (anticuerpos anti-IL-6), anticuerpos dirigidos contra el receptor de IL-6 (anticuerpos anti-receptor de IL-6), y anticuerpos dirigidos contra gp130 (anticuerpos anti-gp130). Además, se conocen también antagonistas de IL-6 que se describen en la Solicitud de Patente Internacional WO 95-00852, la Solicitud de Patente Internacional WO 95-11303, la Solicitud de Patente Internacional WO 96-34104, la Solicitud de Patente Internacional WO 96-18648, la Solicitud de Patente Internacional WO 96-17869, la Patente Japonesa No Examinada (Kokai) Núm. 7 (1995)-324097, y la Patente Japonesa No Examinada (Kokai) Núm. 8 (1996) 311098.

35 Los anticuerpos anti-receptor de IL-6 han sido descritos en varios informes (Novick D. et al., Hybridoma (1991) 10, 137-146, Huang, Y. W. et al., Hybridoma (1993) 12, 621-630, Solicitud de Patente Internacional WO 95-09873, Solicitud de Patente Francesa FR 2694767, Patente de Estados Unidos US 521628). Se obtuvo un anticuerpo PM-1 humanizado injertando las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo PM-1 de ratón (Hirata et al., J. Immunology (1989) 143, 2900-2906), en un anticuerpo humano (Solicitud de Patente Internacional WO 92-19759). La Solicitud de Patente Internacional WO 96/11020 demuestra que un anticuerpo PM1 humanizado es eficaz en un modelo de artritis reumatoide.

40 Por otro lado, en muchas enfermedades autoinmunitarias y enfermedades alérgicas, hay células T que reconocen antígenos específicos (células T sensibilizadas) y se sabe que estas células T sensibilizadas están implicadas en la patología de tales enfermedades. Por ejemplo, se sabe de la presencia de células T sensibilizadas que están dirigidas a la proteína básica de mielina en la esclerosis múltiple (Zhang, J. et al., J. Exp. Med. (1994) 179, 973-984), del antígeno S en la uveítis (Nussenblatt, R. B. et al., Am. J. Ophthalmol (1980) 89, 173-179), de la tiroglobulina en la tiroiditis crónica, de alimentos y ácaros para la dermatitis atópica (Kubota, Y. et al., J. Dermatol (1993) 20, 85-87, Kondo, N. et al., J. Allergy Clin. Immunol (1993) 91, 658-668), de bacterias, virus, hongos, etc. en la hipersensibilidad retardada y de metales, laca japonesa, etc. en la dermatitis de contacto, y similares.

45 Además, también es posible inducir estados patológicos similares a los de los seres humanos mediante la inmunización de un animal con estos antígenos o mediante la introducción de células T sensibilizadas con antígenos específicos en un animal no inmunizado. En base a estos hechos, se cree que las células T sensibilizadas juegan un papel importante en las enfermedades antes mencionadas. Actualmente, se utilizan esteroides y/o agentes inmunosupresores para el tratamiento de estas enfermedades, pero son tratamientos sintomáticos y requieren la administración durante un largo período de tiempo, lo que a la larga plantea el problema de los efectos secundarios.

50

55

No se sabía hasta ahora que los antagonistas del receptor de IL-6 como se ha descrito anteriormente mostraran un efecto supresor sobre las células T sensibilizadas y un efecto terapéutico sobre las enfermedades en las que están implicadas las células T sensibilizadas.

Descripción de la Invención

5 Un objeto de la presente invención es proporcionar un agente terapéutico para enfermedades mediadas por células T sensibilizadas, estando dicho agente libre de los inconvenientes anteriormente mencionados.

La presente invención se refiere a un agente preventivo o terapéutico para su uso en enfermedades mediadas por células T sensibilizadas definidas en las reivindicaciones, que comprende un anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-6 como ingrediente activo.

10 La presente invención se refiere también a un agente preventivo o terapéutico para enfermedades mediadas por células T sensibilizadas que comprende un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor de IL-6 como ingrediente activo.

15 La presente invención se refiere también a un agente preventivo o terapéutico para enfermedades mediadas por células T sensibilizadas que comprende un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor de IL-6 humano como ingrediente activo.

La presente invención se refiere también a un agente preventivo o terapéutico para enfermedades mediadas por células T sensibilizadas que comprende un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor de IL-6 de ratón como ingrediente activo.

20 La presente invención se refiere también a un agente preventivo o terapéutico para enfermedades mediadas por células T sensibilizadas que comprende un anticuerpo PM-1, secretado por el hibridoma FERM B-2998, como ingrediente activo.

La presente invención se refiere también a un agente preventivo o terapéutico para enfermedades mediadas por células T sensibilizadas que comprende un anticuerpo MR16-1, secretado por el hibridoma FERM B-5875, como ingrediente activo.

25 La presente invención se refiere también a un agente preventivo o terapéutico para enfermedades mediadas por células T sensibilizadas que comprende un anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-6 que tiene la región constante (región C) de un anticuerpo humano como ingrediente activo.

30 La presente invención se refiere también a un agente preventivo o terapéutico para enfermedades mediadas por células T sensibilizadas que comprende un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado dirigido contra el receptor de IL-6 como ingrediente activo.

La presente invención se refiere también a un agente preventivo o terapéutico para enfermedades mediadas por células T sensibilizadas que comprende un anticuerpo PM-1 humanizado como ingrediente activo.

35 La presente invención se refiere también a un agente preventivo o terapéutico para la uveítis, la tiroiditis crónica, la hipersensibilidad retardada, la dermatitis de contacto, o la dermatitis atópica que comprende el antagonista del receptor de IL-6 anterior como ingrediente activo.

La presente invención se refiere también a un agente supresor de células T sensibilizadas que comprende un anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-6 como ingrediente activo.

Breve explicación de los dibujos

40 La Fig. 1 muestra una acción supresora sobre la reacción de edema de la almohadilla del pie de tipo retardado en ratón MR16-1 después de la administración simultánea de MR16-1 como sensibilización por el bacilo de la tuberculosis.

1. Antagonista de IL-6

45 Los antagonistas de IL-6 pueden ser de cualquier origen, cualquier tipo, y cualquier forma, siempre que tengan un efecto supresor sobre las células T sensibilizadas, un efecto preventivo o terapéutico para enfermedades en las que están implicadas las células T sensibilizadas.

Los antagonistas de IL-6 bloquean la transducción de señales por la IL-6 e inhiben la actividad biológica de IL-6. Como antagonistas de IL-6, se pueden mencionar los anticuerpos anti-IL-6, los anticuerpos anti-receptor de IL-6, los anticuerpos anti-gp130, la IL-6 alterada, o los péptidos parciales de IL-6 o del receptor de IL-6.

1-1. Anticuerpo anti-IL-6

Los anticuerpos anti-IL-6 se pueden obtener como anticuerpos policlonales o monoclonales utilizando un método conocido. En cuanto a los anticuerpos anti-IL-6 para su uso en la presente invención, se prefieren los anticuerpos monoclonales, en particular con origen de mamífero. Los anticuerpos monoclonales con origen de mamífero incluyen aquellos producidos por un hibridoma y un anticuerpo recombinante producido por un anfitrión que ha sido transformado con un vector de expresión que contiene genes de anticuerpos modificados genéticamente. Estos anticuerpos, a través de la unión a IL-6, inhiben la unión de IL-6 al receptor de IL-6, y de ese modo bloquean la transducción de la señal de la actividad biológica de IL-6 en la célula.

Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen el anticuerpo MH166 (Matsuda et al., Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956) y el anticuerpo SK2 (Sato, K. et al., The 21st Nihon Mennekigakkai Soukai (General Meeting of the Japan Immunology Society), Academic Record (1991) 21, 166) y similares.

1-1-1. Preparación de IL-6

Se puede construir básicamente un hibridoma productor de anticuerpo anti-IL-6 utilizando un procedimiento conocido como se describe a continuación. Así, la IL-6 se puede utilizar como un antígeno sensibilizante y se inmuniza por medio del método convencional de inmunización. Las células inmunitarias obtenidas de este modo se fusionan con células parentales conocidas en el proceso de fusión celular convencional, y luego se escrutan las células productoras de anticuerpos monoclonales mediante un método de escrutinio convencional para preparar el hibridoma deseado.

Específicamente, se puede obtener anticuerpo anti-IL-6 de la siguiente manera. Por ejemplo, se puede obtener un antígeno humano utilizado como antígeno sensibilizante empleando la secuencia génica/secuencia de aminoácidos de IL-6 descrita en Eur. J. Biochem (1987) 168, 543, J. Immunol. (1988) 140, 1534, o Argic. Biol. (1990) 54, 2685.

Después de que una célula anfitriona adecuada fuera transformada mediante la inserción de la secuencia génica de IL-6 en un sistema vector de expresión conocido, se purifica la proteína IL-6 de interés de la célula anfitriona o del sobrenadante de cultivo de la misma. La proteína IL-6 purificada se puede utilizar como un antígeno sensibilizante. Como alternativa, se puede utilizar una proteína de fusión de la proteína IL-6 y otra proteína como antígeno sensibilizante.

1-2. Anticuerpo anti-receptor de IL-6

Los anticuerpos anti-receptor de IL-6 para su uso en la presente invención se pueden obtener en forma de anticuerpos policlonales o monoclonales utilizando un método conocido. En cuanto a los anticuerpos anti-IL-6 para su uso en la presente invención, se prefieren los anticuerpos monoclonales, en particular, con un origen de mamífero. Los anticuerpos monoclonales con un origen de mamífero incluyen aquellos producidos por un hibridoma y los producidos por un anfitrión que ha sido transformado con un vector de expresión que contiene genes de anticuerpos modificados genéticamente. Los anticuerpos, a través de la unión al receptor de IL-6, inhiben la unión de IL-6 al receptor de IL-6, y de ese modo bloquean la transducción de la actividad biológica de IL-6 en la célula.

Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen el anticuerpo MR16-1 (Saito et al., J. Immunology (1993) 147, 168-173), el anticuerpo PM-1 (Hirata et al., J. Immunology (1989) 143, 2900-2906), o un anticuerpo AUK12-20, un anticuerpo AUK64-7 o un anticuerpo AUK146-15 (Solicitud de Patente Internacional WO 92-19759), y similares. Entre ellos, el anticuerpo PM-1 es el más preferido.

Casualmente, la línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo PM-1 ha sido depositada internacionalmente bajo las disposiciones del Tratado de Budapest como PM-1 el 10 de julio de 1990 en el National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, de 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón, como FERM BP-2998. Y la línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo MR16-1 ha sido depositada internacionalmente bajo las disposiciones del Tratado de Budapest como hibridoma de MR16-1 de Rata-ratón el 13 de marzo de 1997, con el National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, de 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón, como FERM BP-5875.

1-2-1. Preparación del receptor de IL-6

Los hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal pueden ser preparados básicamente usando un procedimiento conocido se describe más abajo. De este modo, se utilizan los receptores de IL-6 como antígeno sensibilizante y se inmunizan de acuerdo con el método convencional de inmunización. Las células inmunitarias así obtenidas se fusionan con células parentales conocidas en un proceso de fusión celular convencional, y luego se pueden escrutar las células productoras de anticuerpo monoclonal mediante un método de escrutinio convencional para preparar el hibridoma deseado.

Específicamente, se pueden preparar anticuerpos anti-receptor de IL-6 de la siguiente manera. Por ejemplo, se puede obtener el receptor de IL-6 humano utilizado como antígeno sensibilizante para la obtención de anticuerpos empleando la secuencia génica/secuencia de aminoácidos del receptor de IL-6 descrita en la Solicitud de Patente

Europea EP 325474, y se puede obtener el receptor de IL-6 de ratón empleando la descrita en la Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) 3 (1991)-155795.

5 Existen dos tipos de proteínas del receptor de IL-6: el receptor de IL-6 expresado en la membrana celular, y el receptor de IL-6 separado de la membrana celular (Receptor de IL-6 soluble) (Yasukawa et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676). El anticuerpo contra el receptor de IL-6 soluble está compuesto sustancialmente por la región extracelular del receptor de IL-6 unida a la membrana celular, y por lo tanto es diferente del receptor de IL-6 unido a la membrana ya que este último carece de la región transmembrana o de la región transmembrana y la región intracelular.

10 Después de que la secuencia génica del receptor de IL-6 se haya insertado en un sistema vector de expresión conocido para transformar una célula anfitriona apropiada, la proteína del receptor de IL-6 deseada se puede purificar a partir de la célula anfitriona o del sobrenadante de cultivo de la misma utilizando un método conocido. La proteína del receptor de IL-6 purificada de este modo se puede utilizar como antígeno sensibilizante. Como alternativa, las células que expresan una proteína del receptor de IL-6 o una proteína de fusión de la proteína del receptor de IL-6 y otra proteína pueden ser utilizadas como antígeno sensibilizante.

15 La *E. coli* que tiene un plásmido pBIBSF2R que contiene el ADNc que codifica el receptor de IL-6 humano se ha depositado internacionalmente bajo las disposiciones del Tratado de Budapest como HB101-pBIBSF2R el 9 de enero de 1989 con el National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, de 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón, como FERM BP-2232.

1-3. Anticuerpos anti-gp130

20 Se pueden obtener anticuerpos anti-gp130 como anticuerpos policlonales o monoclonales utilizando un método conocido. Como anticuerpos anti-gp130, se prefieren los anticuerpos monoclonales, en particular, con un origen de mamífero. Los anticuerpos monoclonales con un origen de mamífero incluyen aquellos producidos por un hibridoma y los producidos por un anfitrión que ha sido transformado con un vector de expresión que contiene genes de anticuerpos modificados genéticamente. Los anticuerpos, a través de la unión a gp130, inhiben la unión del complejo IL-6/receptor de IL-6 a gp130, y de ese modo bloquean la transducción de la actividad biológica de IL-6 en la célula.

25 Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen el anticuerpo AM64 (Patente Japonesa No Examinada (Kokai) 3 (1991)-219894), el anticuerpo 4B11 y el anticuerpo 2H4 (Documento US5571513), el anticuerpo B-S12 y el anticuerpo B-P8 (Patente Japonesa No Examinada (Kokai) 8 (1996)-291199).

1-3-1. Preparación de gp130

30 Se puede construir básicamente un hibridoma productor de anticuerpo monoclonal utilizando un procedimiento conocido como se describe a continuación. De este modo, se puede utilizar gp130 como un antígeno sensibilizante y se inmuniza mediante un método convencional de inmunización. Las células inmunitarias así obtenidas se fusionan con células parentales conocidas mediante un proceso de fusión celular convencional, y luego se escrutan los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales mediante un método de escrutinio convencional para preparar el hibridoma deseado.

35 Específicamente, el anticuerpo monoclonal puede ser obtenido de la manera siguiente. Por ejemplo, se puede obtener la gp130 utilizada como el antígeno sensibilizante empleando la secuencia génica/secuencia de aminoácidos de IL-6 descrita en la Solicitud de Patente Europea EP 411946.

40 Después de haber transformado una célula anfitriona adecuada mediante la inserción de la secuencia génica de gp130 en un sistema vector de expresión conocido, se purifica la proteína gp130 de interés a partir de la célula anfitriona o del sobrenadante de cultivo de la misma. La proteína gp130 purificada se puede utilizar como antígeno sensibilizante. De manera alternativa, las células que expresan la proteína del receptor de IL-6 o una proteína de fusión de la proteína gp130 y otra proteína pueden ser utilizadas como antígeno sensibilizante.

1-4. Preparación del hibridoma productor de anticuerpos

45 Aunque los mamíferos que se van a inmunizar con el antígeno sensibilizante no están específicamente limitados, éstos se seleccionan preferiblemente tomando en consideración su compatibilidad con la célula parental para su uso en una fusión celular. Por lo general, incluyen, pero no están limitados a, roedores tales ratones, ratas, hámsteres y similares.

50 La inmunización de los animales con un antígeno sensibilizante se lleva a cabo utilizando un método conocido. Un método general, por ejemplo, implica la administración intraperitoneal o subcutánea de un antígeno sensibilizante al mamífero. Específicamente, se mezcla un antígeno sensibilizante que ha sido diluido y suspendido en una cantidad apropiada de solución salina tamponada con fosfato (PBS) o solución salina fisiológica etc., según se desee, con una cantidad apropiada de un coadyuvante común, por ejemplo coadyuvante completo de Freund. Después de haber sido emulsionado se administra preferiblemente a un mamífero varias veces cada 4 a 21 días. De manera alternativa, se puede utilizar un portador adecuado en el momento de la inmunización del antígeno sensibilizante.

Después de la inmunización y la confirmación del incremento en los niveles del anticuerpo deseado en el suero, las células inmunitarias se extraen de los mamíferos y se someten a fusión celular, en la que las células inmunitarias preferidas incluyen, en particular, las células del bazo.

5 Las células de mieloma de mamíferos, así como las otras células parentales que se someten a fusión celular con las células inmunitarias anteriormente mencionadas incluyen preferiblemente varias líneas celulares conocidas tales como P3X63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123: 1548-1550), P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81: 1-7), NS-I (Kohler, G. y Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6: 511-519), MPC-11 (Margulies, D.H. et al., Cell (1976) 8: 405-415), SP2 / 0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276: 269-270), FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35: 1-21), S194 (Trowbridge, I.S., J. Exp. Med. (1978) 148: 313-323), R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277: 131-133) y similares.

10 La fusión celular entre las células inmunitarias anteriores y las células de mieloma se puede llevar a cabo esencialmente de acuerdo con un método conocido tal como describen Milstein et al. (Kohler, G. y Milstein, C., en Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46) y similares.

15 Más específicamente, la fusión celular anterior se lleva a cabo en el caldo nutriente convencional en presencia, por ejemplo, de un acelerador de la fusión celular. En cuanto al acelerador de la fusión celular, por ejemplo, se pueden utilizar polietilenglicol (PEG), virus Sendai (HVJ) y similares, y, además, se puede añadir un coadyuvante tal como dimetilsulfóxido, etc. según se desee, para mejorar la eficacia de la fusión.

20 La razón preferida de las células inmunitarias y las células de mieloma que se va a utilizar es, por ejemplo, de 1 a 10 veces más de células inmunitarias que de células de mieloma. Los ejemplos de los medios de cultivo que se van a utilizar para la fusión celular anterior incluyen medio RPMI1640 y medio de cultivo MEM adecuado para el crecimiento de las líneas celulares de mieloma anteriores, y el medio de cultivo convencional utilizado para este tipo de cultivo celular, y además se puede añadir un suplemento de suero tal como suero de ternera fetal (FCS).

25 En la fusión celular, se mezclan bien cantidades predeterminadas de las células inmunitarias anteriores y de las células de mieloma en el líquido de cultivo anterior, al cual se añade una solución de PEG previamente calentada a aproximadamente 37°C, por ejemplo una solución de PEG con un peso molecular medio de aproximadamente 1000 a 6000, a una concentración de 30 a 60% (p / v) y se mezclan para obtener las células de fusión deseadas (hibridomas). Después, mediante la repetición de la adición sucesiva de un líquido de cultivo adecuado y centrifugación para separar el sobrenadante, se pueden eliminar los agentes de fusión celular, etc. que no son deseables para el crecimiento del hibridoma.

30 Dicho hibridoma se selecciona mediante cultivo en un medio de selección convencional, por ejemplo, medio de cultivo HAT (un líquido de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina, y timidina). El cultivo en dicho medio de cultivo HAT se continúa generalmente durante un período de tiempo suficiente para llevar a cabo la destrucción de las células que no sean el hibridoma deseado (células que no se fusionan), generalmente de varios días a varias semanas. Se lleva a cabo el método de dilución limitante convencional en el que los hibridomas que producen el anticuerpo deseado se escrutan y se clonan monoclonalmente.

35 Además de obtener el hibridoma anterior mediante la inmunización de un animal que no sea un ser humano con un antígeno, también es posible sensibilizar los linfocitos humanos in vitro con el antígeno deseado o con células que expresan el antígeno deseado, y los linfocitos B sensibilizados resultantes se fusionan con células de mieloma humanas, por ejemplo U266, para obtener el anticuerpo humano deseado que tiene la actividad de unión al antígeno deseado o a células que expresan el antígeno deseado (véase La Publicación de Patente Japonesa Post-Examinada (Kokoku) Núm. 1 (1989)-59878). Además, se inmuniza un animal transgénico que tiene un repertorio de todos los genes de anticuerpos humanos con el antígeno o las células que expresan el antígeno para obtener el anticuerpo humano deseado por medio del método descrito anteriormente (véanse las Solicitudes de Patente Internacionales WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 y WO 96/33735).

45 Los hibridomas que producen anticuerpos monoclonales así construidos pueden ser subcultivados en un líquido de cultivo convencional, o pueden ser almacenados durante un período prolongado de tiempo en nitrógeno líquido.

50 Con el fin de obtener anticuerpos monoclonales a partir de dicho hibridoma, se pueden mencionar un método en el que dicho hibridoma se cultiva mediante un método convencional y se obtienen los anticuerpos como sobrenadante, o un método en el que se administra el hibridoma y se desarrolla en un mamífero compatible con dicho hibridoma y se obtienen los anticuerpos en forma de ascitis. El primer método es adecuado para la obtención de anticuerpos de alta pureza, mientras que el último es adecuado para una producción a gran escala de anticuerpos.

55 Específicamente, el hibridoma que produce anticuerpos anti-receptor de IL-6 puede ser construido utilizando el método descrito en la Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) 3 (1989)-139293. Esto se puede llevar a cabo mediante un método en el que el hibridoma productor de anticuerpo PM-1 que había sido depositado internacionalmente bajo las disposiciones del Tratado de Budapest como FERM BP-2998 el 10 de julio de 1990 en el National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology, de 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón, es inyectado por vía intraperitoneal a ratones BALB/c (creados por CLEA Japón) para obtener la ascitis de la cual se purifica el anticuerpo AM-1, o: un método en el que dicho

hibridoma se cultiva en un medio de cultivo adecuado tal como el medio RPMI 1640 que contiene 10% de suero bovino fetal y 5% de BM-Condimed HI (fabricado por Boehringer Mannheim), el medio SFM para hibridoma (fabricado por GIBCO-BRL), el medio PFHM-II (fabricado por GIBCO-BRL) y similares, y se puede purificar el anticuerpo PM-1 a partir del sobrenadante.

5 1-5. Anticuerpo recombinante

Se puede utilizar en la presente invención un anticuerpo recombinante que había sido producido por medio de la tecnología de genes recombinantes en el que se había clonado un gen del anticuerpo a partir del hibridoma y se había integrado en un vector adecuado que se había introducido después en un anfitrión como anticuerpo monoclonal (véase, por ejemplo, Carl, A. K, Borrebaeck, y James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, publicado en el Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD. 1990).

10 Específicamente, se aísla el ARNm que codifica la región variable (V) del anticuerpo deseado a partir del hibridoma que produce el anticuerpo. El aislamiento del ARNm se lleva a cabo mediante la preparación de ARN total utilizando, por ejemplo, un método conocido tal como el método de ultracentrifugación con guanidina (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299), el método AGPC (Chmczynski, P. et al., (1987) 162, 156-159) y, a continuación se purifica el ARNm a partir del ARN total usando el Kit de Purificación de ARNm (fabricado por Pharmacia) y similares. De manera alternativa, el ARNm puede ser preparado directamente utilizando el Kit de Purificación de ARNm Quick Prep (fabricado por Pharmacia).

20 El ADNc de la región V del anticuerpo puede ser sintetizado a partir del ARNm obtenido de este modo utilizando una transcriptasa inversa. El ADNc puede ser sintetizado utilizando el Kit de Síntesis de la Primera Hebra de ADNc con Transcriptasa Inversa de AMV y similares. Como alternativa, para la síntesis y la amplificación del ADNc, se pueden utilizar el Kit 5'-Ampli FINDER RACE (fabricado por Clontech) y el método 5'-RACE (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) que emplea la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El fragmento de ADN deseado se purifica a partir del producto de la PCR obtenido y se puede ligar al ADN del vector. Por otra parte, se construye un vector recombinante a partir del mismo y, a continuación se introduce en E. coli, etc., a partir de la cual se seleccionan las colonias para preparar el vector recombinante deseado. La secuencia de bases del ADN deseado se puede confirmar por medio de un método conocido tal como el método dideoxi.

25 Una vez que se ha obtenido el ADN que codifica la región V del anticuerpo deseado, éste puede ser ligado al ADN que codifica la región constante (región C) del anticuerpo deseado, que luego se integra en un vector de expresión. De manera alternativa, el ADN que codifica la región V del anticuerpo puede ser integrado en un vector de expresión que ya contiene el ADN que codifica la región C del anticuerpo.

30 Con el fin de producir un anticuerpo para su uso en la presente invención, el gen del anticuerpo se integra como se describe a continuación en un vector de expresión de manera que se expresa bajo el control de la región reguladora de la expresión, por ejemplo un intensificador y/o un promotor. Con posterioridad, el vector de expresión puede ser transformado en una célula anfitriona y el anticuerpo puede ser expresado después en la misma.

35 1-6. Anticuerpo alterado

De acuerdo con la presente invención, se pueden utilizar anticuerpos recombinantes alterados artificialmente tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados con el propósito de reducir la antigenicidad heteróloga contra los seres humanos. Estos anticuerpos alterados pueden producirse usando métodos conocidos.

40 Los anticuerpos quiméricos se pueden obtener por medio de ligación del ADN obtenido de este modo que codifica la región V del anticuerpo al ADN que codifica la región C del anticuerpo humano, que después se integra en un vector de expresión y se introduce en un anfitrión para la producción del anticuerpo en él (véase la Solicitud de Patente Europea EP 125023, y la Solicitud de Patente Internacional WO 96/02576). Mediante el uso de este método conocido, se pueden obtener anticuerpos quiméricos útiles para la presente invención.

45 Por ejemplo, el plásmido que contiene el ADN que codifica la región V de la cadena L o la región V de la cadena H del anticuerpo PM-1 quimérico fue designado como pPM-K3 o pPM H1, respectivamente, y la E. coli que tiene el plásmido ha sido depositada internacionalmente bajo las disposiciones del Tratado de Budapest como NCIMB 40366 y NCIMB 40362, respectivamente, el 11 de febrero de 1991, en National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (véase la Solicitud de Patente Internacional WO 92-19759).

50 Se han elaborado anticuerpos humanizados que también se llaman anticuerpos humanos reorganizados injertando regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de anticuerpos de un mamífero que no sean un ser humano, por ejemplo anticuerpo de ratón, en las CDR de un anticuerpo humano. La tecnología del ADN recombinante en general para la preparación de tales anticuerpos también es conocida (véanse la Solicitud de Patente Europea EP 125023 y la Solicitud de Patente Internacional WO 96/02576).

55 Específicamente, se sintetiza una secuencia de ADN que había sido diseñado para ligar las CDR de anticuerpos de ratón con la región marco (FR) de anticuerpos humanos a partir de varios oligonucleótidos divididos que tienen

secciones solapantes entre sí en sus extremos por medio de la técnica de PCR. El ADN obtenido de este modo se ligó al ADN que codificaba la región C del anticuerpo humano y, a continuación se integró en un vector de expresión, que se introdujo en un anfitrión para la producción de anticuerpos (véanse la Solicitud de Patente Europea EP 239400 y Solicitud de Patente Internacional WO 92-19759).

- 5 Para la FR del anticuerpo humano ligada a través de la CDR, se selecciona la región determinante de complementariedad que forma un sitio de unión al antígeno favorable. Cuando se desea, los aminoácidos de la región marco de la región variable del anticuerpo pueden estar sustituidos de modo que la región determinante de complementariedad del anticuerpo humano reorganizado pueda formar un sitio de unión al antígeno apropiado (Sato, K. et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856).
- 10 Para el anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado, se utiliza la región C del anticuerpo humano. En cuanto a la región C de anticuerpo humano, se puede mencionar Cy, y se pueden utilizar Cy1, Cy2, Cy3, y Cy4, por ejemplo. La región C del anticuerpo humano puede ser modificada para mejorar la estabilidad del anticuerpo o la producción del mismo.
- 15 El anticuerpo quimérico consiste en la región variable del anticuerpo derivado de un mamífero que no sea un ser humano y la región C derivada del anticuerpo humano, mientras que el anticuerpo humanizado consiste en la región determinante de complementariedad del anticuerpo derivado de un mamífero que no sea un ser humano y la región marco (FR) y la región C del anticuerpo derivado del anticuerpo humano. Por consiguiente, su antigenicidad en el cuerpo humano se ha reducido de manera que son útiles como ingrediente activo de los agentes terapéuticos de la presente invención.
- 20 Una realización preferida del anticuerpo humanizado para su uso en la presente invención incluye el anticuerpo PM-1 humanizado (véase la Solicitud de Patente Internacional WO 92-19759).

1-7. Expresión y producción

- 25 Los genes de los anticuerpos construidos como se ha descrito anteriormente se pueden expresar y obtener mediante un método conocido. En el caso de las células de mamífero, la expresión puede lograrse utilizando un ADN en el que se utiliza comúnmente un promotor útil, el gen del anticuerpo que se va a expresar, y la señal poli A 3' aguas abajo del mismo que se han conectado operativamente o un vector que contiene dicho ADN. Los ejemplos del promotor/intensificador incluyen el promotor temprano inmediato/intensificador de citomegalovirus humano.

- 30 Además, en cuanto al promotor/potenciador que se puede utilizar para la expresión de anticuerpos para su uso en la presente invención, existen promotores o intensificadores virales, tales como los retrovirus, virus de polio, adenovirus y virus de simio 40 (SV40), y promotores/intensificadores derivados de células de mamífero tales como el factor de elongación humano 1 α (HEF1 α).

- Por ejemplo, la expresión puede lograrse fácilmente por medio del método de Mulligan et al. (*Nature* (1979) 277, 108) cuando se utiliza el promotor/intensificador de SV40, o por medio del método de Mizushima et al. (*Nucleic Acids Res.* (1990) 18, 5322) cuando se utiliza el promotor/intensificador de HEF1 α .

- 35 En el caso de *E. coli*, la expresión se puede llevar a cabo conectando operablemente un promotor útil comúnmente empleado, una secuencia señal para la secreción del anticuerpo, y el gen del anticuerpo que se va a expresar, seguido de la expresión de los mismos. En cuanto al promotor, por ejemplo, se pueden mencionar el promotor lacZ y el promotor araB. Se puede utilizar el método de Ward et al. (*Nature* (1098) 341, 544-546; *FASEB J.* (1992) 6, 2422-2427) cuando se emplea el promotor lacZ, y se puede utilizar el método de Better et al. (*Science* (1988) 240, 1041-1043) cuando se emplea el promotor araB.

- 40 En cuanto a la secuencia señal para la secreción de anticuerpos, cuando se produce en el periplasma de *E. coli*, se puede utilizar la secuencia señal pelB (Lei, S. P. et al., *J. Bacteriol.* (1987) 169, 4379). Después de separar el anticuerpo producido en el periplasma, la estructura del anticuerpo es apropiadamente replegada antes de su uso (véase, por ejemplo, el documento WO 96/30394).

- 45 En cuanto al origen de replicación, se pueden utilizar aquellos derivados de SV40, virus de polio, adenovirus, virus del papiloma bovino (BPV) y similares. Además, para la amplificación del número de copias del gen en el sistema de la célula anfitriona, se pueden incluir vectores de expresión como marcadores seleccionables el gen de la aminoglicósido transferasa (APH), el gen de la timidina quinasa (TK), el gen de la xantina guaninofosforribosil transferasa de *E. coli* (Ecogpt), el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) y similares.

- 50 Para la producción de anticuerpos para su uso en la presente invención, se puede utilizar cualquier sistema de producción. El sistema de producción para la preparación de anticuerpos comprende los sistemas de producción in vitro o in vivo. En cuanto al sistema de producción in vitro, se pueden mencionar un sistema de producción que emplea células eucarióticas y un sistema de producción que emplea células procarióticas.

- 55 Cuando se utilizan células eucariotas, existen sistemas de producción que emplean células animales, células vegetales y células fúngicas. Las células animales conocidas incluyen (1) células de mamífero tales como células

- 5 CHO, células COS, células de mieloma, de riñón de cría hámster (BHK), células HeLa, y células Vero, (2) células de anfibio, tales como oocitos de Xenopus, o (3) células de insectos tales como Sf9, Sf21 y Tn5. Las células vegetales conocidas incluyen, por ejemplo, aquellas derivadas de Nicotiana tabacum, que se somete a cultivo de callos. Las células fúngicas conocidas incluyen levaduras, tales como el género Saccharomyces, más específicamente Saccharomyces Cerevisiae, o de hongos filamentosos tales como el género Aspergillus, más específicamente Aspergillus niger.
- 10 Cuando se utilizan células procarióticas, existen sistemas de producción que emplean células bacterianas. Las células bacterianas conocidas incluyen Escherichia coli (E. coli), y Bacillus subtilis.
- Mediante la introducción por medio de transformación del gen del anticuerpo deseado en estas células y el cultivo de las células transformadas in vitro, se puede obtener el anticuerpo. El cultivo se lleva a cabo mediante métodos conocidos. Por ejemplo, en cuanto al líquido de cultivo, se pueden utilizar DMEM, MEM, RPMI 1640, e IMDM, y se pueden utilizar combinados suplementos de suero tales como suero de ternera fetal (FCS). Además, los anticuerpos pueden ser producidos in vivo mediante la implantación en la cavidad abdominal de un animal de células en las que se ha introducido el gen del anticuerpo y similares.
- 15 En cuanto a los sistemas de producción in vivo, se pueden mencionar aquellos que emplean animales y aquellos que emplean plantas. Cuando se utilizan animales, existen sistemas de producción que emplean mamíferos e insectos.
- 20 En cuanto a los mamíferos, se pueden utilizar cabras, cerdos, ovejas, ratones, y ganado vacuno (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). Asimismo, en cuanto a los insectos, también se pueden utilizar gusanos de seda.
- Cuando se utilizan plantas, se puede emplear por ejemplo tabaco.
- 25 Se introducen genes de anticuerpos en estos animales o plantas, y se producen los anticuerpos en dichos animales o plantas, y se recuperan. Por ejemplo, se inserta un gen del anticuerpo en el centro de una proteína que codifica el gen que es producida inherentemente en la leche tal como la caseína β de cabra para preparar los genes de fusión. Los fragmentos de ADN que contienen el gen de fusión en el que se ha insertado el gen del anticuerpo se inyectan en un embrión de cabra, y el embrión se introduce en una cabra hembra. El anticuerpo deseado se obtiene de la leche producida por la cabra transgénica nacida de la cabra que recibió el embrión o de los descendientes de la misma. Con el fin de aumentar la cantidad de leche que contiene el anticuerpo deseado producida por la cabra transgénica, se pueden administrar hormonas a la cabra transgénica, según proceda. (Ebert, K. M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702).
- 30 Cuando se utilizan gusanos de seda, se infecta el gusano de seda con el baculovirus en el cual ha sido insertado el gen del anticuerpo deseado, y el anticuerpo deseado puede ser obtenido a partir del fluido corporal del gusano de seda (Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594). Por otra parte, cuando se utiliza tabaco, el gen del anticuerpo deseado se inserta en un vector de expresión para plantas, por ejemplo pMON 530, y en ese caso el vector se introduce en una bacteria tal como Agrobacterium tumefaciens. El tabaco, por ejemplo Nicotiana tabacum se infecta después con la bacteria para obtener el anticuerpo deseado a partir de las hojas del tabaco (Julian, K. C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138).
- 35 Cuando el anticuerpo se produce en sistemas de producción in vitro o in vivo, como se ha descrito anteriormente, el ADN que codifica la cadena pesada (cadena H) o la cadena ligera (cadena L) del anticuerpo puede ser integrado por separado en un vector de expresión y los anfitriones se transforman simultáneamente, o el ADN que codifica la cadena H y la cadena L se puede integrar en un único vector de expresión y el anfitrión se transforma con el mismo (véase la Solicitud de Patente Internacional WO 94-11523).
- 1-8. Anticuerpo modificado**
- 45 Los anticuerpos para su uso en la presente descripción pueden ser fragmentos de anticuerpos o versiones modificadas de los mismos, siempre y cuando sean los utilizados preferiblemente. Por ejemplo, en cuanto a los fragmentos de anticuerpo, se pueden citar los fragmentos Fab, F(ab')₂, Fv o Fv de cadena sencilla (scFv) en los que la Fv de la cadena H y de la cadena L se ligan a través de un conector adecuado. Específicamente los anticuerpos se tratan con una enzima, por ejemplo, papaína o pepsina, para producir fragmentos de anticuerpos, o se construyen genes que codifican estos fragmentos de anticuerpo, y luego se introducen en un vector de expresión,
- 50 que es expresado en una célula anfitriona adecuada (véase, por ejemplo, Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. y Horwitz, A. H., Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.; Plueckthun, A. y Skerra, A., Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc.; Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137).
- 55 Se pueden obtener scFv por ligación de la región V de la cadena H y la región V de la cadena L del anticuerpo. En el scFv, la región V de la cadena H y la región V de la cadena L se ligan preferiblemente a través de un conector, preferiblemente un conector peptídico (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883). La

región V de la cadena H y la región V de la cadena L en el scFv pueden derivar de cualquiera de los anticuerpos antes mencionados. En cuanto al conector peptídico para ligar las regiones V, se puede utilizar cualquier péptido de cadena sencilla que comprende, por ejemplo, de 12 a 19 residuos de aminoácido.

5 El ADN que codifica el scFv se puede obtener utilizando un ADN que codifica la cadena H o la región V de la cadena H del anticuerpo anterior y un ADN que codifica la cadena L o la región V de la cadena L del anticuerpo anterior como molde amplificando la porción del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos deseada entre las secuencias anteriores mediante la técnica de PCR especificando el par de cebadores ambos extremos del mismo, y amplificando adicionalmente la combinación de ADN que codifica la porción de conector peptídico y el par de cebadores que define que ambos extremos de dicho ADN están ligados a la cadena H y la cadena L, respectivamente.

10 Una vez que se construyen los ADN que codifican el scFv, se pueden obtener un vector de expresión que los contiene y un anfitrión transformado con dicho vector de expresión mediante métodos convencionales, y se puede obtener un scFv utilizando el anfitrión resultante por medio de los métodos convencionales.

15 Estos fragmentos de anticuerpo se pueden producir mediante la obtención del gen de los mismos en una forma similar a la mencionada anteriormente y permitiendo que sea expresado en un anfitrión. "Anticuerpo" según se usa en la reivindicación de la presente solicitud abarca estos fragmentos de anticuerpos.

20 En cuanto a los anticuerpos modificados, se pueden utilizar anticuerpos asociados con diferentes moléculas tales como polietilenglicol (PEG). "Anticuerpo" según se utiliza en la reivindicación de la presente solicitud abarca estos anticuerpos modificados. Estos anticuerpos modificados se pueden obtener por modificación química de los anticuerpos obtenidos de este modo. Estos métodos ya han sido establecidos en la técnica.

1-9. Separación y purificación de anticuerpos

1-9-1. Separación y purificación de anticuerpos

25 Los anticuerpos producidos y expresados como se ha descrito anteriormente pueden ser separados del interior o del exterior de la célula anfitriona y pueden ser purificados después hasta la homogeneidad. La separación y purificación del anticuerpo para su uso en la presente invención puede llevarse a cabo mediante cromatografía de afinidad. En cuanto a la columna utilizada para dicha cromatografía de afinidad, se pueden mencionar la columna de Proteína A y la columna de proteína G. Los ejemplos de los portadores utilizados en la columna de Proteína A son Hyper D, POROS, Sefarosa F. F. y similares. De manera alternativa, se pueden emplear sin ninguna limitación los métodos para la separación y purificación utilizados convencionalmente para las proteínas. La separación y purificación del anticuerpo para su uso en la presente invención pueden llevarse a cabo mediante la combinación, según sea apropiado, de cromatografías distintas de la cromatografía de afinidad, mencionada antes, filtración, ultrafiltración, precipitación por adición de sal, diálisis, y similares. La cromatografía incluye, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, de filtración en gel y similares. Estas cromatografías se pueden aplicar en la HPLC. Como alternativa, se puede utilizar la cromatografía de fase inversa.

35 1-9-2. Determinación de la concentración de anticuerpos

40 La concentración de anticuerpo obtenida en el apartado 2-1 anterior se puede determinar por medio de la medición de la absorbancia o mediante el análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) y similares. De este modo, cuando se emplea la medición de la absorbancia, el anticuerpo para su uso en la presente invención o una muestra que contiene el anticuerpo se diluye apropiadamente con PBS (-) y, a continuación se mide la absorbancia a 280 nm, seguido del cálculo utilizando el coeficiente de absorción de 1,35 DO a 1 mg/ml. Cuando se utiliza el método de ELISA, se lleva a cabo la medición como sigue. De este modo, se añaden 100 µl anti -IgG humana de cabra (fabricada por TAGO) diluida a 1 µg/ml en tampón bicarbonato, 0,1 M, pH 9,6, a una placa de 96 pocillos (fabricada por Nunc), y se incuba durante la noche a 4°C para inmovilizar el anticuerpo.

45 Después del bloqueo, se añaden 100 µl de cada anticuerpo diluido apropiadamente para su uso en la presente invención o una muestra que contiene el anticuerpo, o 100 µl de IgG humana (fabricada por CAPPEL) como patrón, y se incuban a temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado, se añaden 100 µl de anticuerpo anti-IgG humana marcado con fosfatasa alcalina diluido 5000 veces (fabricado por BIO SOURCE), y se incuban a la temperatura ambiente durante 1 hora. Después del lavado, se añade la solución de sustrato y se incuban, seguido de la medición de la absorbancia a 405 nm utilizando el LECTOR DE MICROPLACAS Modelo 3550 (fabricado por Bio-Rad) para calcular la concentración del anticuerpo deseada.

1-10. Antagonistas de IL-6 que no son anticuerpos

50 La IL-6 alterada tiene una actividad de unión al receptor de IL-6 y no transmite la actividad biológica de IL-6. De este modo, la IL-6 alterada, aunque compite con la IL-6 por la unión al receptor de IL-6, no transmite la actividad biológica de IL-6, y de ese modo bloquea la transducción de señal por IL-6.

La IL-6 alterada se puede construir mediante la introducción de mutaciones reemplazando los residuos de aminoácido de la secuencia de aminoácidos de la IL-6. La IL-6, fuente de la IL-6 alterada, puede ser de cualquier origen, pero cuando se tiene en cuenta la antigenicidad, es preferiblemente IL-6 humana. Específicamente, la estructura secundaria, de la IL-6 se pronostica mediante un programa conocido de modelado molecular de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo WHATIF (Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990), 8, 52-56), y se evalúan los efectos generales de los residuos de aminoácidos que se van a reemplazar. Después de haber determinado un residuo de aminoácido apropiado, se introduce la mutación por medio del método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) comúnmente utilizado empleando un vector que contiene la secuencia de bases que codifica el gen de la IL-6 humana para obtener de ese modo un gen que codifica la IL-6 alterada. Este se integra después, según se desee, en un vector de expresión apropiado, a partir del cual se puede obtener la IL-6 alterada de acuerdo con la expresión, la producción y la purificación de dicho anticuerpo recombinante.

Los ejemplos específicos de la IL-6 alterada son descritos por Brakenhoff et al., en J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93, y por Savino et al., en EMBO J. (1994) 13, 1357-1367, documentos WO 96-18648, y WO 96-17869.

El péptido parcial de la IL-6 o el péptido parcial del receptor de la IL-6 para su uso en la presente invención tiene una actividad de unión al receptor de IL-6 o a IL-6, respectivamente, y no transmiten la actividad biológica de IL-6. De este modo, el péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 se unen al receptor de IL-6 o a IL-6, respectivamente, y de ese modo la capturan. Como resultado, no transmiten la actividad biológica de IL-6, y bloquean la transducción de la señal de IL-6.

El péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 es un péptido que comprende una parte o toda la secuencia de aminoácidos de la región implicada en la unión a IL-6 y el receptor de IL-6 en la secuencia de aminoácidos de IL-6 o el receptor de IL-6. Dicho péptido comprende generalmente de 10 a 80, preferiblemente de 20 a 50, más preferiblemente de 20 a 40 residuos de aminoácido.

El péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 pueden ser construidos mediante la especificación de la región implicada en la unión a IL-6 y el receptor de IL-6 en la secuencia de aminoácidos de la IL-6 o del receptor de IL-6, y mediante la producción de una parte o de toda de la secuencia de aminoácidos por un método convencional tal como una tecnología de ingeniería genética o un método de síntesis de péptidos.

Con el fin de preparar el péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 por medio de una tecnología de ingeniería genética, se integra la secuencia de ADN que codifica el péptido deseado en un vector de expresión, del cual se puede obtener el péptido de acuerdo con la expresión, la producción y la purificación de dicho anticuerpo recombinante.

La preparación del péptido parcial de IL-6 o del péptido parcial del receptor de IL-6 por medio del método de síntesis de péptidos se puede llevar a cabo utilizando un método utilizado comúnmente en la síntesis de péptidos tal como la síntesis en fase sólida o la síntesis en fase líquida. Específicamente, se puede utilizar el método descrito en Zokuyakuhin no Kaihatsu (Sequel to Development of Pharmaceuticals), vol. 14, Peptide Gousei (Peptide Synthesis), editado por Haruaki Yajima, Hirokawa Shoten, 1991. El método de síntesis en fase sólida utilizado incluye, por ejemplo, una reacción en la que un aminoácido correspondiente al extremo C-terminal del péptido que se va a sintetizar está acoplado a un soporte que es insoluble en disolventes orgánicos y, a continuación un aminoácido del que el grupo funcional α amino o un grupo funcional de la cadena lateral han sido protegidos con un grupo protector apropiado se condensan, un aminoácido cada vez, desde el extremo C-terminal hacia la dirección N-terminal, y se repite de manera alternativa una reacción en la que se elimina dicho grupo protector del grupo α -amino del aminoácido o el péptido acoplado a la resina alternativamente para alargar la cadena peptídica. Los métodos de síntesis de péptidos en fase sólida se dividen en el método Boc y el método Fmoc dependiendo del tipo de grupo protector que se utilice.

Una vez que la síntesis del péptido deseado se ha completado, se escinde la cadena peptídica del soporte por medio de una reacción de desprotección. Para la escisión de la cadena peptídica, se utilizan generalmente fluoruro de hidrógeno o trifluorometanosulfonato en el método Boc y TFA en el método Fmoc. En el método Boc, por ejemplo, la resina peptídica anterior se trata en fluoruro de hidrógeno en presencia de anisol. Con posterioridad, el grupo protector se elimina y el péptido se recupera mediante la escisión del soporte. Liofilizando éste, se puede obtener un péptido bruto. Por otro lado, en el método Fmoc, se utiliza por ejemplo TFA, de una manera similar a la anterior para llevar a cabo la reacción de desprotección y la reacción de escisión del péptido del soporte.

El péptido bruto así obtenido se puede aplicar a una HPLC para su separación y purificación. Su elución puede llevarse a cabo en un sistema disolvente de agua-acetonitrilo que se utiliza comúnmente para la purificación de proteínas bajo unas condiciones óptimas. La fracción correspondiente al pico del perfil de la cromatografía obtenida se recoge y se liofiliza. La fracción de péptido purificada de este modo se identifica sometiendo al análisis del peso molecular por medio de análisis espectroscópico de masas, análisis de la composición de aminoácidos, o análisis de la secuencia de aminoácidos, y similares.

Los ejemplos específicos del péptido parcial de IL-6 o del péptido parcial del receptor de IL-6 se describen en la Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) 2 (1990)-188600, Patente japonesa No Examinada (Kokai)

7 (1995)-324097, Patente japonesa No Examinada (Kokai) 8 (1996)-311098, y la Publicación de Patente de los Estados Unidos US 5210075.

2. Confirmación de la actividad del antagonista de IL-6

5 La actividad del antagonista de IL-6 puede ser evaluada utilizando un método conocido convencionalmente. Por ejemplo, se añade IL-6 a células MH60.BSF2 dependientes de IL-6 y se puede evaluar la actividad utilizando la incorporación de ³H-timidina en las células dependientes de IL-6 en la coexistencia del antagonista de IL-6 como un índice. De manera alternativa, se puede llevar a cabo la evaluación mediante la adición de IL-6 marcada con I¹²⁵ y una cantidad en exceso de IL-6 no marcada a U266, una célula que expresa el receptor de IL-6, y la adición del antagonista de IL-6 al mismo tiempo y, a continuación mediante la determinación de la IL-6 marcada con I¹²⁵ unida a la célula que expresa el receptor de IL-6.

3. Confirmación de los efectos terapéuticos

Con el fin de confirmar los efectos logrados por la presente invención, se puede administrar el antagonista de IL-6 a un animal que ha sido sensibilizado con células T a través de la exposición a un animal en el que se habían introducido células T sensibilizadas, y evaluar los efectos supresores sobre las células T sensibilizadas.

15 En cuanto al antígeno sensibilizante que se va a administrar al animal se puede utilizar, por ejemplo, el bacilo de la tuberculosis.

En cuanto al animal que se va a inmunizar, se pueden utilizar los animales generalmente utilizados en los experimentos tales como ratones, ratas, conejos, y similares. El efecto de la presente invención que se va a evaluar puede ser confirmado por medio de la observación de la reacción inflamatoria retardada inducida por una exposición al mismo antígeno del animal al que se administró el antígeno.

20 Como se describe en los siguientes ejemplos, en la reacción del edema de la almohadilla del pie retardada en ratón, se observó que la administración de anticuerpos anti-receptor de IL-6 daba lugar a la supresión de la reacción inflamatoria retardada. Dado que se sabía que las células T sensibilizadas estaban implicadas en la reacción de edema de la almohadilla del pie retardada, esto reveló que los antagonistas de IL-6 tales como los anticuerpos anti-receptor de IL-6 ejercen un efecto inhibitorio sobre las células T sensibilizadas.

4. Ruta de administración y preparación farmacéutica

Los agentes preventivos o terapéuticos para enfermedades mediadas por células T sensibilizadas de la presente invención se pueden administrar, sistémicamente o localmente, por una ruta parenteral, por ejemplo inyección intravenosa tal como infusión por goteo, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, e inyección subcutánea. El método de administración puede ser elegido, según sea apropiado, dependiendo de la edad y las condiciones del paciente. La dosis eficaz se elige en el intervalo de 0,01 mg a 100 mg por kg de peso corporal por administración. Como alternativa, se puede seleccionar una dosis en el intervalo de 1 a 1000 mg, preferiblemente de 5 a 50 mg por paciente.

35 Los agentes preventivos o terapéuticos para enfermedades mediadas por células T sensibilizadas de la presente invención pueden contener portadores o aditivos farmacéuticamente aceptables dependiendo de la ruta de administración. Los ejemplos de tales portadores o aditivos incluyen agua, un disolvente orgánico farmacéuticamente aceptable, colágeno, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, un polímero de carboxivinilo, sal de sodio de carboximetilcelulosa, sodio poliacrílico, alginato de sodio, dextrano soluble en agua, sal de sodio de carboximetil almidón, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma xantana, goma arábiga, caseína, gelatina, agar, diglicerina, propilenglicol, polietilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, albúmina de suero humano (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, un agente tensioactivo farmacéuticamente aceptable y similares.

Los aditivos utilizados se eligen entre, pero no están limitados a, los anteriores o combinaciones de los mismos dependiendo de la forma de dosificación.

45 Las enfermedades sujeto que van a ser prevenidas o tratadas de la presente invención son enfermedades en las que están implicadas células T sensibilizadas. En concreto, incluyen la hipersensibilidad retardada, la tiroiditis crónica, la uveítis, la dermatitis atópica, la dermatitis de contacto.

Ejemplos

La presente invención se explicará ahora con más detalle con referencia a los ejemplos de trabajo, ejemplos de referencia y ejemplos experimentales. Se debe observar, sin embargo, que la presente invención no se limita a ellos de ninguna manera.

Ejemplo 1. Efectos inhibidores sobre la reacción de la almohadilla del pie retardada

Se añadieron células muertas secas de *Mycobacterium butyricum*, a 2,5 mg/ml en coadyuvante incompleto de Freund para preparar una emulsión, 0,2 ml de la cual se inyectaron después por vía subcutánea a ratones C57BL/6

macho para la exposición. El día 14, se inyectaron por vía subcutánea 10 mg de células muertas secas de Mycobacterium butyricum suspendidas en solución salina fisiológica en la almohadilla del pie derecho del animal para provocar la reacción. Veinticuatro horas más tarde, se midieron los pesos de la almohadilla del pie izquierdo y derecho y se utilizaron las diferencias en los pesos como índice de la fuerza de la reacción.

5 Se administró por vía intraperitoneal anticuerpo MR16-1 a 0,125 mg, 0,5 mg o 2 mg de una sola vez de forma simultánea a la exposición. El grupo de control recibió IgG de rata (KH-5) que tenía el mismo isotipo y el grupo de ratones no sensibilizado recibió solución salina fisiológica de una manera similar. El resultado se muestra en la Figura 1.

10 La administración de una vez del anticuerpo MR16-1 el día de la exposición inhibió la reacción del edema de la almohadilla del pie retardada de una manera dependiente de la dosis.

Ejemplo de Referencia 1.Preparación del receptor de IL-6 soluble humano

15 Se preparó el receptor de IL-6 soluble mediante el método de PCR utilizando un plásmido pBSF2R.236 que contenía ADNc que codifica el receptor de IL-6 obtenido de acuerdo con el método de Yamasaki et al., Science (1988) 241, 825-828. El plásmido pBSF2R.236 se digirió con una enzima de restricción Sph I para obtener el ADNc del receptor de IL-6, que se insertó después en mp18 (fabricado por Amersham). Utilizando un oligocebador sintético diseñado para introducir un codón de parada en el ADNc del receptor de IL-6, se introdujo una mutación en el ADNc del receptor de IL-6 por medio del método PCR utilizando el Mutagenesis System in vitro (fabricado por Amersham). El procedimiento dio como resultado la introducción de un codón de parada para el aminoácido en la posición 345, y dio el ADNc que codificaba el receptor de IL-6 soluble.

20 Con el fin de expresar el ADNc del receptor de IL-6 soluble en células CHO, éste se ligó al plásmido pSV (fabricado por Pharmacia) para obtener el plásmido pSVL344. El ADNc del receptor de IL-6 soluble que se escindió con Hind III-Sal I se insertó en el plásmido pCEdhfr que contenía el ADNc de dhfr para obtener el plásmido pCEdhfr344 que puede ser expresado en las células CHO.

25 Se transfectaron diez µg del plásmido pCEdhfr344 a una línea celular dhfr-CHO DXB-11 (Urland et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1980) 77, 4216-4220) mediante el método del fosfato de calcio (Chen et al., Mol. Cell Biol. (1987) 7, 2745-2751). Las células CHO transfectadas se cultivaron en un medio de selección α MEM libre de nucleósido que contenía glutamina 1 mM, FCS sometido a diálisis al 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomina.

30 Las células CHO seleccionadas fueron escrutadas por el método de dilución limitante para obtener un solo clon de células CHO. El clon de células CHO se amplificó en metotrexato (MTX) 20 nM a 200 nM para obtener una línea de células CHO 5E27 que produce el receptor de IL-6 humano soluble. La línea de células CHO 5E27 se cultivó en medio Dulbecco modificado de Iscove (IMDM, fabricado por Gibco) que contenía FBS al 5%. El sobrenadante del cultivo se recogió y la concentración de receptor de IL-6 soluble en el sobrenadante del cultivo se determinó por medio de ELISA.

35 Ejemplo de referencia 2.Preparación de anticuerpos anti-IL-6 humana

40 Se inmunizaron ratones BALB/c con 10 µg de la IL-6 recombinante (Hirano et al., Immunol. Lett., 17:41, 1988) junto con coadyuvante completo de Freund, y esto se repitió cada semana hasta que se pudieron detectar anticuerpos anti-IL-6 en el suero. Se extrajeron células inmunitarias de los ganglios linfáticos locales y se fusionaron con una línea celular de mieloma P3U1 utilizando polietilenglicol 1500. Se seleccionaron los hibridomas de acuerdo con el método de Oi et al. (Selective Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) que emplea el medio HAT, y se estableció el hibridoma que producía los anticuerpos anti-IL-6 humana.

45 El hibridoma que producía anticuerpos anti-IL-6 humana se sometió a un análisis de unión a IL-6 de la siguiente manera. De este modo, se recubrió una placa de microtitulación de 96 pocillos elaborada con polivinilo flexible (fabricada por Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA) con 100 µl de anti-IgG de ratón de cabra (10 µg/ml, fabricado por Cooper Biomedical, Inc., Malvern, PA) en tampón carbonato-carbonato de hidrógeno 0,1 M, pH 9,6, durante la noche a 4°C. Con posterioridad, la placa se trató con PBS que contenía albúmina de suero humano al 1% (BSA) a la temperatura ambiente durante 2 horas.

50 Después de lavar en PBS, se añadieron 100 µl del sobrenadante de cultivo del hibridoma a cada pocillo y, a continuación se incubó durante la noche a 4°C. La placa se lavó, se añadió IL-6 recombinante marcada con ¹²⁵I a cada pocillo a una concentración de 2000 cpm/0,5 ng/pocillo, y después se determinó la radiactividad de cada pocillo después del lavado por medio de un contador gamma (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA). De los 216 clones de hibridoma, 32 fueron positivos en el análisis de unión a IL-6. De estos clones, se obtuvo finalmente MH166.BSF2 estable. El anticuerpo anti-IL-6 MH166 producido por dicho hibridoma tiene un subtipo de IgG1 κ.

55 Después, se utilizó el clon de hibridoma de ratón dependiente de IL-6 MH166.BSF2 para examinar una actividad neutralizadora con respecto al crecimiento del hibridoma por MH166. Se tomaron alícuotas de las células

MH166.BSF2 $1 \times 10^4/200 \mu\text{l}$ /pocillo, y a esto se le añadieron las muestras que contenían el anticuerpo MH166, se cultivaron durante 48 horas, se añadió ^3H -timidina $15,1 \text{ Ci/mM}$ (New England Nuclear, Boston, MA), y el cultivo se continuó durante otras 6 horas. Las células se colocaron en un papel filtro de vidrio y se trataron por medio de una cosechadora automática (Labo Mash Science Co., Tokio, Japón). Como control, se utilizó anticuerpo anti-IL-6 de conejo.

Como resultado, el anticuerpo MH166 inhibió la incorporación de la ^3H -timidina por las células MH166.BSF2 2 inducida por IL-6 en una forma dependiente de la dosis. Esto reveló que el anticuerpo MH166 neutraliza la actividad de IL-6.

Ejemplo de referencia 3.Preparación del anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano

El anticuerpo anti-receptor de IL-6 MT18 preparado por el método de Hirata et al. (J. Immunol., 143, 2900-2906, 1989) se unió a Sefarosa 4B activada con CNBr (fabricada por Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) de acuerdo con el régimen adjunto y se purificó el receptor de IL-6 (Science (1988) 241, 825-828). Una línea celular de mieloma humano U266 se solubilizó con hidrocloreuro de fluoruro de p-paraminofenil-metanosulfonilo 1 mM (fabricado por Wako Chemicals) que contenía digitonina al 1% (fabricada por Wako Chemicals), trietanolamina 10 mM (pH 7,8) y NaCl $0,15 \text{ M}$ (tampón de digitonina), y se mezcló con anticuerpo MT18 unido a cuentas de Sefarosa 4B. A continuación, las cuentas se lavaron seis veces con el tampón de digitonina, para preparar el receptor de IL-6 parcialmente purificado.

Se inmunizaron ratones BALB/C cuatro veces cada diez días con el receptor de IL-6 parcialmente purificado anterior obtenido a partir de 3×10^9 células U266, y después se preparó un hibridoma utilizando un método convencional. El sobrenadante del cultivo de hibridoma del pocillo con crecimiento positivo se sometió a ensayo para determinar su actividad de unión al receptor de IL-6 de acuerdo con el método descrito a continuación. Se marcaron 5×10^7 células U266 con ^{35}S -metionina ($2,5 \text{ mCi}$) y se solubilizaron con el tampón de digitonina anterior. Las células U266 solubilizadas fueron mezcladas con un volumen de $0,04 \text{ ml}$ de anticuerpo MT18 unido a cuentas de Sefarosa 4B y, a continuación se lavaron seis veces con el tampón de digitonina. El receptor de IL-6 marcado con ^{35}S -metionina se hizo eluir con $0,25 \text{ ml}$ del tampón de digitonina (pH 3,4) y se neutralizó en $0,025 \text{ ml}$ de Tris 1M (pH 7,4).

Se mezclaron $0,05 \text{ ml}$ del sobrenadante del cultivo de hibridoma con $0,01 \text{ ml}$ de Proteína G Sefarosa (fabricada por Pharmacia). Después del lavado, se incubó la Sefarosa con $0,005 \text{ ml}$ de solución de receptor de IL-6 marcado con ^{35}S preparada como se ha descrito anteriormente. El producto inmunoprecipitado se analizó mediante SDS-PAGE para investigar el sobrenadante del cultivo de hibridoma que reacciona con el receptor de IL-6. Como resultado, se estableció el clon de hibridoma con reacción positiva PM-1. El anticuerpo producido a partir del hibridoma PM-1 tiene un subtipo de IgG1k.

Se estudió la actividad inhibitoria de la unión de IL-6 del anticuerpo producido por el hibridoma PM-1 al receptor de IL-6 humano utilizando la línea celular de mieloma humano U266. Se preparó IL-6 humana recombinante a partir de E. coli (Hirano et al., Immunol. Lett., 17:41, 1988), y se marcó con ^{125}I utilizando el reactivo de Bolton-Hunter (New England Nuclear, Boston, MA) (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967). Se cultivaron 4×10^5 células U266 con el sobrenadante del cultivo de hibridoma PM-1 al 70% (v/v) junto con 14.000 cpm de IL-6 marcada con ^{125}I en presencia de un exceso de 100 veces de la IL-6 no marcada durante una hora a la temperatura ambiente. Se dispusieron en una capa setenta μl de la muestra sobre $300 \mu\text{l}$ de FCS en un tubo de polietileno de microcentrifuga de $400 \mu\text{l}$. Después de la centrifugación, se determinó la radiactividad celular.

El resultado reveló que el anticuerpo producido por el hibridoma PM-1 inhibe la unión de IL-6 al receptor de IL-6.

Ejemplo de referencia 4.Preparación del anticuerpo anti-receptor de IL-6 de ratón

Se preparó un anticuerpo monoclonal dirigido contra receptor de IL-6 de ratón de acuerdo con el método descrito por Saito et al., en J. Immunol. (1993) 147, 168-173.

Se cultivaron células CHO que producían el receptor de IL-6 soluble de ratón en el medio líquido IMDM que contenía FCS al 10%. A partir del sobrenadante del cultivo, se purificó el receptor de IL-6 soluble de ratón utilizando el receptor de IL-6 soluble de ratón RS12 (véase Saito et al., más arriba) y una columna de afinidad fijada a gel Affigel 10 (Biorad).

El receptor de IL-6 soluble de ratón ($50 \mu\text{g}$) así obtenido se mezcló con coadyuvante completo de Freund, que después se inyectó en el abdomen de ratas Wistar (Japan Charles River). A partir de las 2 semanas los animales fueron reforzados con coadyuvante incompleto de Freund. El día 45, se sacrificaron las ratas, y se fusionaron las células del bazo a aproximadamente 2×10^8 con 1×10^7 células de mieloma de ratón P3U1 utilizando PEG1500 al 50% (Boehringer Mannheim) de acuerdo con el método convencional, y después se escrutaron por el medio de cultivo HAT.

Después de añadir el sobrenadante del cultivo a la placa recubierta con anticuerpo de conejo anti-IgG de rata (Cappel), se hizo reaccionar el receptor de IL-6 soluble de ratón. Con posterioridad, utilizando anticuerpo anti-receptor de IL-6 de ratón de conejo y anti-IgG de conejo de oveja marcada con fosfatasa alcalina, se escrutaron los

hibridomas productores de anticuerpos dirigidos contra el receptor de IL-6 soluble de ratón por medio de ELISA. Una vez confirmada la producción de anticuerpos, los clones de hibridoma fueron sub-escrutados dos veces para obtener un único clon de hibridoma. El clon fue denominado MR16-1.

5 La actividad neutralizadora del anticuerpo producido por el hibridoma sobre la transducción de la señal de la IL-6 de ratón fue examinada por medio de la incorporación de ³H-timidina utilizando células MH60.BSF2 (Matsuda et al., J. Immunol. (1988) 18, 951-956). Para una placa de 96 pocillos, se prepararon células MH60.BSF2 a 1 x 10⁴ células/200 µl/pocillo. A la placa se le añadieron IL -6 de ratón y el anticuerpo MR16-1 o el anticuerpo RS12 a 12,3 - 1000 ng/ml, y luego se cultivaron a 37°C y CO₂ al 5% durante 44 horas y después se añadió µCi/pocillo de ³H-timidina. Al cabo de 4 horas, se midió la incorporación de ³H-timidina. Como resultado, el anticuerpo MR16-1 suprimió la incorporación de ³H-timidina a las células MH60.BSF2.

10 De este modo se demostró que el anticuerpo producido por el hibridoma MR16-1 inhibe la unión de IL-6 al receptor de IL-6.

Aplicabilidad Industrial

15 De acuerdo con la presente invención, se demostró que un anticuerpo anti-receptor de IL-6 tiene un efecto supresor sobre las células T sensibilizadas. Por lo tanto, se indicó que dichos antagonistas de IL-6 son útiles como agentes terapéuticos para la uveítis, la tiroiditis crónica, la hipersensibilidad retardada, la dermatitis de contacto, o la dermatitis atópica.

Referencia a los microorganismos que están depositados en el marco del Tratado de Cooperación en materia de Patentes, Regla 13-2, y nombre del instituto de depósito

20 Instituto de Depósito

Nombre: National Institute of Bioscience and Human Technology, Agency of Industrial Science and Technology

Dirección: 1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki, Japón

Microorganismo (1)

Indicación: Hibridoma MR16-1 de Rata-ratón

25 Número de depósito: FERM BP-5875

Fecha de depósito: 13 de marzo de 1997

Microorganismo (2)

Indicación: HB 101-pIBIBSF2R

Número de depósito: FERM BP-2232

30 Fecha de depósito: 9 de enero de 1989

Microorganismo (3)

Indicación: PM1

Número de depósito: FERM HP-2998

Fecha de depósito: 12 de julio de 1989

35 Órgano de depósito

Nombre: National Collection of Industrial and Marine Bacteria Limited

Dirección: 23 St. Machar Drive Aberdeen AB2 1RY

Microorganismo (4)

Indicación: Escherichia coli DH5α-PPM-k3

40 Número de depósito: NCIMB 40366

Fecha de depósito: 12 de febrero de 1991

Microorganismo (5)

ES 2 382 488 T3

Indicación: Escherichia coli DHS α -PPM-h1

Número de depósito: NCIMB 40362

Fecha de depósito: 12 de febrero de 1991

REIVINDICACIONES

1. Un agente preventivo o terapéutico para su uso en el tratamiento de enfermedades mediadas por células T sensibilizadas seleccionadas del grupo que consiste en uveítis, tiroiditis crónica, hipersensibilidad retardada, dermatitis de contacto, o dermatitis atópica que comprende un anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-6.
- 5 2. El agente preventivo o terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal.
3. El agente preventivo o terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor de la IL-6 humana.
- 10 4. El agente preventivo o terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 2, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor de la IL-6 de ratón.
5. El agente preventivo o terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde el anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-6 es el anticuerpo producido por el hibridoma FERM BP 2998.
6. El agente preventivo o terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde el anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-6 es el anticuerpo producido por el hibridoma FERM BP 5875.
- 15 7. El agente preventivo o terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde el anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-6 que tiene la región constante del anticuerpo humano.
8. El agente preventivo o terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, donde el anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo quimérico o humanizado dirigido contra el receptor de IL-6.
- 20 9. El agente preventivo o terapéutico para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde el anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo humanizado producido por el hibridoma FERM BP 2998.

Fig.1

