

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 809**

51 Int. Cl.:  
**A61K 45/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04807818 .2**  
96 Fecha de presentación: **17.12.2004**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1707215**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2006**

54 Título: **Remedio contra la vasculitis**

30 Prioridad:  
**19.12.2003 JP 2003423517**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**13.06.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**13.06.2012**

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

72 Inventor/es:  
**NISHIMOTO, Norihiro;**  
**KISHIMOTO, Tadimitsu y**  
**NAKAHARA, Hideko**

74 Agente/Representante:  
**de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 382 809 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

Remedio contra la vasculitis.

**Campo Técnico**

En la presente memoria se describe un agente preventivo y/o terapéutico novedoso para la vasculitis.

**5 Técnica Anterior**

La vasculitis es una de las afecciones patológicas intratables observadas comúnmente en las enfermedades autoinmunitarias, y muchos casos de la misma son refractarios a los métodos terapéuticos utilizados convencionalmente tales como esteroides e inmunosupresores y, por lo tanto se han intentado conseguir nuevos métodos terapéuticos. En el síndrome de vasculitis, se produce inflamación en las arterias de diferentes tamaños, y fiebre, dolor en los músculos y articulaciones, oclusión vascular, úlceras en la piel, y se puede desarrollar mononeuritis múltiple. La vasculitis incluye los síndromes de vasculitis intratables tales como la poliarteritis nodosa y el síndrome de aortitis. Las lesiones de la poliarteritis nodosa se caracterizan por inflamaciones necróticas de la media y la adventicia, y la aortitis desarrolla normalmente inflamaciones de la íntima, la media y la adventicia.

La Aortitis también se denomina arteritis de Takayasu. Se ha sugerido que la patología de la vasculitis está asociada con la IL-6. Por ejemplo, Noris et al. han informado de que los niveles en sangre de IL-6 aumentan en pacientes con arteritis de Takayasu en la fase activa de la patología en comparación con personas sanas normales (Circulation 1999 Jul 6; 100(1); 55-60). Sin embargo, esta publicación también informa de que la concentración en suero de RANTES, una de las quimioquinas, también aumenta. Noris et al. también sugieren la posibilidad de que estas citoquinas sean responsables de las lesiones vasculíticas en pacientes con arteritis de Takayasu.

La publicación, no obstante, no hace mención alguna a la posibilidad de que la arteritis de Takayasu pueda ser tratada inhibiendo la IL-6. De este modo, en la presente memoria se describen agentes preventivos y/o terapéuticos para la vasculitis que comprenden un antagonista de IL-6 como ingrediente activo.

Después de una investigación intensiva y exhaustiva, los autores de la presente invención han demostrado que la IL-6 es indispensable en la patología de la vasculitis y que un antagonista de IL-6 tiene un efecto terapéutico para la vasculitis. Más sorprendentemente, en el estudio de los autores de la presente invención, cuando la unión de IL-6 a su receptor era inhibida por un anticuerpo contra el receptor de IL-6, la IL-6 per se disminuía en la sangre. De este modo, se demostró que la terapia de inhibición de IL-6 no solamente tiene efecto anti-inflamatorio sobre la vasculitis per se si no que también trata la vasculitis per se actuando sobre el núcleo de la vasculitis.

De este modo, en la presente memoria se describe un agente preventivo y/o terapéutico para la vasculitis, comprendiendo dicho agente un antagonista de interleuquina-6 (IL-6) como ingrediente activo.

En la presente memoria se describe un agente preventivo y/o terapéutico para la vasculitis que tiene resistencia a esteroides y/o inmunosupresores, comprendiendo dicho agente un antagonista de interleuquina-6 (IL-6) como ingrediente activo.

Dicha vasculitis es por ejemplo la poliarteritis nodosa, el síndrome de aortitis, o una vasculitis que está asociada con anomalías inmunológicas. El síndrome de aortitis también se denomina arteritis de Takayasu. En cuanto a la vasculitis asociada con anomalías inmunológicas, por ejemplo, se pueden mencionar la vasculitis asociada con la artritis reumatoide y la vasculitis asociada con el lupus eritematoso generalizado (LEG).

Dicho antagonista de IL-6 es un anticuerpo contra el receptor de IL-6, preferiblemente un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6. Dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es muy preferiblemente un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano, por ejemplo el anticuerpo PM-1, o un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón, por ejemplo el anticuerpo MR16-1. Dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es preferiblemente un anticuerpo recombinante.

Dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano. Según se utiliza en la presente memoria muy preferiblemente el anticuerpo es un anticuerpo PM-1 humanizado.

Asimismo en la presente memoria se describe:

- (1) El uso de un antagonista de interleuquina-6 (IL6) para la fabricación de un agente preventivo y/o terapéutico para la vasculitis.
- (2) El uso de un antagonista de interleuquina-6 (IL6) para la fabricación de un agente preventivo y/o terapéutico para la vasculitis que tiene resistencia a esteroides y/o inmunosupresores.
- (3) El uso de acuerdo con los apartados (1) o (2) anteriores donde dicha vasculitis es la poliarteritis nodosa.

- (4) El uso de acuerdo con los apartados (1) o (2) anteriores donde dicha vasculitis es el síndrome de aortitis.
- (5) El uso de acuerdo con los apartados (1) o (2) anteriores donde dicha vasculitis es la vasculitis asociada con anomalías inmunológicas.
- 5 (6) El uso de acuerdo con cualquiera de los apartados (1) a (5) anteriores donde dicho antagonista de IL-6 es un anticuerpo contra el receptor de IL-6.
- (7) El uso de acuerdo con el apartado (6) anterior donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6.
- (8) El uso de acuerdo con el apartado (6) anterior donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano.
- 10 (9) El uso de acuerdo con el apartado (6) anterior donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón.
- (10) El uso de acuerdo con los apartados (6) a (9) anteriores donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo recombinante.
- 15 (11) El uso de acuerdo con el apartado (8) anterior donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano es un anticuerpo PM-1.
- (12) El uso de acuerdo con el apartado (9) anterior donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón es un anticuerpo MR16-1.
- (13) El uso de acuerdo con los apartados (6) a (12) anteriores donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano.
- 20 (14) El uso de acuerdo con el apartado (13) anterior donde dicho anticuerpo humanizado contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo PM-1 humanizado.
- (15) Un método para prevenir y/o tratar la vasculitis que comprende administrar un antagonista de interleuquina-6 (IL-6).
- (16) Un método para prevenir y/o tratar la vasculitis que tiene resistencia a esteroides y/o inmunosupresores
- 25 que comprende administrar un antagonista de interleuquina-6 (IL-6).
- (17) El método de acuerdo con los apartados (15) o (16) anteriores donde dicha vasculitis es la poliarteritis nodosa.
- (18) El método de acuerdo con los apartados (15) o (16) anteriores donde dicha vasculitis es el síndrome de aortitis.
- (19) El método de acuerdo con los apartados (15) o (16) anteriores donde dicha vasculitis es la vasculitis asociada con anomalías inmunológicas.
- 30 (20) El método de acuerdo con uno cualquiera de los apartados (15) a (19) anteriores donde dicho antagonista de IL-6 es un anticuerpo contra el receptor de IL-6.
- (21) El método de acuerdo con el apartado (20) anterior donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6.
- 35 (22) El método de acuerdo con el apartado (20) anterior donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano.
- (23) El método de acuerdo con el apartado (20) anterior donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón.
- (24) El método de acuerdo con cualquiera de los apartados (20) a (23) anteriores donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo recombinante.
- 40 (25) El método de acuerdo con el apartado (22) anterior donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano es un anticuerpo PM-1.
- (26) El método de acuerdo con el apartado (23) anterior donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón es un anticuerpo MR1.
- 45 (27) El método de acuerdo con cualquiera de los apartados (20) a (26) anteriores donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano contra el receptor de IL-6.

(28) El método de acuerdo con el apartado (27) anterior donde dicho anticuerpo humanizado contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo PM-1 humanizado.

#### Breve Explicación de los Dibujos

5 La Fig. 1 es una fotografía que muestra el resultado de una TC en el tratamiento del síndrome de vasculitis con anticuerpo contra IL-6R humanizado, en la que la flecha superior indica la aorta ascendente y la flecha inferior indica la aorta descendente

La Fig. 2 es una fotografía que muestra el resultado de una TC en el tratamiento del síndrome de vasculitis con anticuerpo contra IL-6R humanizado, en la que la flecha indica el arco aórtico.

10 La Fig. 3 es una fotografía que muestra el resultado de una TC en el tratamiento del síndrome de vasculitis con anticuerpo contra IL-6R humanizado, en la que la flecha superior indica la aorta ascendente y la flecha inferior indica la aorta descendente

La Fig. 4 es una fotografía que muestra el resultado de una TC en el tratamiento del síndrome de vasculitis con anticuerpo contra IL-6R humanizado, en la que la flecha superior indica la aorta ascendente y la flecha inferior indica la aorta descendente

15 La Fig. 5 es una fotografía que muestra el resultado de una TC en el tratamiento del síndrome de vasculitis con anticuerpo contra IL-6R humanizado, en la que la flecha indica el arco aórtico.

La Fig. 6 es una fotografía que muestra el resultado de una TC en el tratamiento del síndrome de vasculitis con anticuerpo contra IL-6R humanizado, en la que la flecha superior indica la aorta ascendente y la flecha inferior indica la aorta descendente

#### 20 Mejor Modo de Llevar a Cabo la Invención

La IL-6 es una citoquina que también se denomina factor estimulador de células B 2 (BSF2) o interleuquina  $\beta$ 2. La IL-6 fue descubierta como un factor de diferenciación implicado en la activación de las células B linfática (Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76). Después de eso, se descubrió que era una citoquina multifuncional que influye en diferentes 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, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258).

La IL-6 transmite su actividad biológica a través de dos tipos de proteínas sobre la célula. Una de ellas es el receptor de IL-6, una proteína de unión al ligando con un peso molecular de alrededor de 80 kD, al cual se une la IL-6 (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981; Yamasaki, K. et al., Science (1987) 241, 825-828). El receptor de IL-6 existe no solamente en la forma unida a la membrana la cual atraviesa y es expresada sobre la membrana celular sino también en forma de un receptor soluble de IL-6 que consiste principalmente en la región extracelular.

La otra es una proteína unida a membrana gp130 que tiene un peso molecular de alrededor de 130 kD que está implicada en la transducción de la señal de no unión al ligando. La IL-6 y el receptor de IL-6 forman el complejo de IL-6/receptor de IL-6 que, tras la unión a gp130, transmite su actividad biológica a la célula (Taga, T. et al., Cell (1989) 58, 573-581).

35 Un antagonista de IL-6 es una sustancia que inhibe la transducción de la actividad biológica de IL-6. En cuanto a los antagonistas de IL-6, se conocen hasta ahora un anticuerpo dirigido contra la IL-6 (anticuerpo anti-IL-6), un anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-6 (anticuerpo anti-receptor de IL-6), y un anticuerpo dirigido contra gp130 (anticuerpo anti-gp130), IL-6 alterada, péptidos parciales de IL-6 o del receptor de IL-6 y similares.

40 El anticuerpo anti-receptor de IL-6 ha sido descrito en numerosos informes (Novick D. et al., Hibridoma (1991) 10, 137-146, Huang, Y. W. et al., Hibridoma (1993) 12, 621-630, Publicación de Patente Internacional WO 95-09873, Solicitud de Patente Francesa FR 2694767, Patente de los Estados Unidos US 521628). Se ha sabido que se ha obtenido un anticuerpo PM-1 humanizado trasplantando la región determinante de la complementariedad (CDR) de uno de ellos, un anticuerpo de ratón PM-1 (Hirata, Y. et al., J. Immunology (1989) 143, 2900-2906), a un anticuerpo humano (Publicación de Patente Internacional WO 92-19759).

45 El antagonista de IL-6 anterior es un anticuerpo contra el receptor de IL-6, preferiblemente un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano o un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón. En cuanto al anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano anterior, se puede ilustrar el anticuerpo PM-1, y en cuanto al anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón anterior, se puede ilustrar el anticuerpo MR16-1. El anticuerpo anterior es preferiblemente un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano, por ejemplo un anticuerpo PM-1 humanizado.

Los antagonistas de IL-6 para su uso en la presente invención pueden tener cualquier origen, cualquier clase, y cualquier forma, con tal que sean útiles como ingrediente activo para un efecto preventivo o terapéutico para la vasculitis.

Los antagonistas de IL-6 bloquean la transducción de la señal por IL-6 e inhiben la actividad biológica de IL-6. Los antagonistas de IL-6 son preferiblemente sustancias que tienen actividad inhibitoria de cualquiera de IL-6, receptor de IL-6, y gp130.

5 Los anticuerpos anti-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 al anticuerpo anti-IL-6 para su uso en la presente invención, se prefieren los anticuerpos monoclonales, en particular, de origen mamífero. Los anticuerpos monoclonales de origen mamífero incluyen aquellos producidos por un hibridoma y un anticuerpo recombinante producidos por un anfitrión que ha sido transformado con un vector de expresión que contiene genes de anticuerpo producidos mediante ingeniería genética. Estos anticuerpos, por medio de la unión a IL-6, bloquean la unión de IL-6 al receptor de IL-6, y de este 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 SK2 (Sato, K. et al., The 21st Nihon Menekigakkai Soukai (General Meeting of the Japan Immunology Society), Academic Record (1991) 21, 166) y similares.

15 Un hibridoma que produce un anticuerpo anti-IL-6 puede ser construido básicamente utilizando un procedimiento conocido como se describe más abajo. De este modo, se puede utilizar IL-6 como un antígeno sensibilizante y se inmuniza por medio de un método de inmunización convencional. Las células inmunes obtenidas de este modo se fusionan con células parentales conocidas en un proceso de fusión celular convencional, y después las células productoras de anticuerpo monoclonal se escrutan mediante un método de escrutinio convencional para preparar el hibridoma deseado.

20 Específicamente, el anticuerpo anti-IL-6 puede ser obtenido de la siguiente manera. Por ejemplo, se puede obtener una IL-6 humana para su uso como antígeno sensibilizante para obtener un anticuerpo utilizando la secuencia de genes/aminoácidos de IL-6 descrita en Eur. J. Biochem (1987) 168, 543-550, J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541, o Argic. Biol. (1990) 54, 2685-2688.

25 Una vez que una célula anfitriona adecuada es transformada insertando la secuencia del gen de IL-6 en un sistema vector de expresión conocido, se purifica la proteína IL-6 de interés a partir de la célula anfitriona o del sobrenadante de cultivo de la misma, y la proteína IL-6 purificada puede ser utilizada como antígeno sensibilizante. Alternativamente, se puede utilizar como antígeno sensibilizante una proteína de fusión de la proteína IL-6 y otra proteína.

30 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, de origen mamífero. Los anticuerpos monoclonales de origen mamífero incluyen aquellos producidos por un hibridoma y aquellos producidos por un anfitrión que ha sido transformado con un vector de expresión que contiene genes del anticuerpo producidos mediante ingeniería genética. 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 este modo bloquean la transducción de la actividad biológica de IL-6 en la célula.

Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen el anticuerpo MR16-1 (Tamura, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924-11928), el anticuerpo PM-1 (Hirata, et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906), o el anticuerpo AUK12-20, el anticuerpo AUK64-7 o el anticuerpo AUK146-15 (Publicación de Patente Internacional WO 92-19759), y similares. Entre ellos, el más preferido es el anticuerpo PM-1.

40 Casualmente, la línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo PM-1 ha sido depositada internacionalmente bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest como PM-1 el 12 de Julio de 1995 con el Patent Microorganism Depository of the National Institute of Industrial Science and Technology, en Chuo 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japón, como FERM BP-2998. La línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo MR16-1 ha sido depositada internacionalmente bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest como MR16-1 el 13 de Marzo de 1997 con el Patent Microorganism Depository of the National Institute of Industrial Science and Technology, en Chuo 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japón, como FERM BP-5875.

45 Los hibridomas que producen anticuerpo monoclonal anti-receptor de IL-6 puede ser preparados básicamente utilizando un procedimiento conocido como se describe más abajo. De este modo, el receptor de IL-6 se utiliza como un antígeno sensibilizante y se inmuniza de acuerdo con un método de inmunización convencional. Las células inmunes obtenidas de este modo se fusionan con células parentales conocidas en un procedimiento de fusión celular convencional, y después las células productoras de anticuerpo monoclonal se pueden escrutar mediante un método de escrutinio convencional para preparar el hibridoma deseado.

55 Específicamente, el anticuerpo anti-receptor de IL-6 se puede preparar de la siguiente manera. Por ejemplo, el receptor de IL-6 humano utilizado como antígeno sensibilizante para obtener el anticuerpo se puede obtener utilizando la secuencia génica/secuencia de aminoácidos del receptor de IL-6 descritas en la Solicitud de Patente Europea EP 325474, y el receptor de IL-6 de ratón se puede obtener utilizando el gen del receptor de IL-6 descrito en la Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) 3-155795.

- Existen dos tipos de proteínas del receptor de IL-6: el receptor de IL-6 expresado sobre 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 del receptor de IL-6 soluble está compuesto sustancialmente por la región extracelular del receptor de IL-6 unido a la membrana celular y, de este modo, es diferente del receptor de IL-6 unido a la membrana ya que el primero carece de la región transmembrana o tanto de la región transmembrana como de la región intracelular. En cuanto a la proteína del receptor de IL-6, se puede utilizar cualquier receptor de IL-6, con tal que se pueda utilizar como antígeno sensibilizante para la producción del anticuerpo del receptor de IL-6 para su uso en la presente invención.
- Una vez que la secuencia génica del receptor de IL-6 se ha insertado en un sistema vector de expresión conocido para transformar una célula anfitriona apropiada, se puede purificar la proteína del receptor de IL-6 deseada de la célula anfitriona o del sobrenadante de cultivo de la misma utilizando un método conocido, y la proteína del receptor de IL-6 purificada así purificada se puede utilizar como antígeno sensibilizante. Alternativamente, las células que están expresando el receptor de IL-6 o una proteína de fusión de la proteína del receptor de IL-6 y otra proteína se pueden utilizar como antígeno sensibilizante.
- La E. coli que tiene un plásmido pIBBSF2R que contiene ADNc que codifica el receptor de IL-6 humano ha sido depositada internacionalmente bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest como HB101-pIBBSF2R el 9 de Enero de 1989 con el Patent Microorganism Depository of the National Institute of Industrial Science and Technology, en Chuo 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japón, como FERM BP-2232.
- Los anticuerpos anti-gp130 pueden ser obtenidos en forma de anticuerpos policlonales o monoclonales utilizando un método conocido. En cuanto a los anticuerpos anti-gp130, se prefieren los anticuerpos monoclonales, en particular, de origen mamífero. Los anticuerpos monoclonales de origen mamífero incluyen aquellos producidos por un hibridoma y aquellos producidos por un anfitrión que ha sido transformado con un vector de expresión que contiene genes del anticuerpo construidos por medio de ingeniería genética. Los anticuerpos, a través de la unión a gp130, inhiben la unión del complejo de IL-6/receptor de IL-6 a gp130, y de este modo bloquean la transducción de la actividad biológica de IL-6 en la célula.
- Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen el anticuerpo AM64 (Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) 3-219894), el anticuerpo 4B11 y el anticuerpo 2H4 (documento US 5571513), el anticuerpo B-S12 y el anticuerpo B-P8 (Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) 8-291199).
- El hibridoma productor de anticuerpo monoclonal anti-gp130 se puede crear básicamente utilizando un procedimiento conocido como se describe más abajo. De este modo, se puede utilizar gp130 como antígeno sensibilizante e inmunizarlo mediante el método de inmunización convencional. Las células inmunes obtenidas de este modo se fusionan con células parentales conocidas mediante un procedimiento de fusión celular convencional y, después, los hibridomas productores de anticuerpo monoclonal se escrutan mediante el método de escrutinio convencional para preparar el hibridoma deseado.
- Específicamente, el anticuerpo monoclonal puede ser obtenido de la siguiente manera. Por ejemplo, la gp130 utilizada como antígeno sensibilizante para la generación de anticuerpo se puede obtener utilizando la secuencia génica/secuencia de aminoácidos de gp130 descritas en la Solicitud de Patente Europea EP 411946.
- Una vez que una célula anfitriona adecuada es transformada insertando la secuencia del gen gp130 en un sistema vector de expresión conocido, se purifica la proteína gp130 de interés a partir de la célula anfitriona o del sobrenadante del cultivo de la misma. La proteína del receptor de gp130 purificada se puede utilizar como antígeno sensibilizante. Alternativamente, una proteína de fusión de la proteína gp130 y otra proteína se puede utilizar como antígeno sensibilizante.
- Aunque los mamíferos que van a ser inmunizados con el antígeno sensibilizante no están limitados específicamente, éstos se seleccionan preferiblemente tomando en consideración su compatibilidad con la célula parental para su uso en la fusión celular. Generalmente incluyen roedores tales como ratones, ratas, hámsteres y similares.
- La inmunización de 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. Alternativamente se puede utilizar un portador adecuado en el momento de la inmunización del antígeno sensibilizante.
- Después de la inmunización y la confirmación del aumento de los niveles de anticuerpo en suero deseados, se extraen las células inmunes del mamífero y se someten a fusión celular. Las células inmunes preferidas que se van a someter a fusión celular incluyen, en particular, las células de bazo.

Las células de mieloma de mamífero como las otras células parentales que se fusionan con las células inmunes anteriormente mencionadas incluyen preferiblemente diferentes líneas celulares conocidas tales como P3X63Ag8.653 (Kearney, J. F. et al., J. Immunol. (1979) 123; 1548-1550), P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81; 1-7), NS-1 (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.

La fusión celular entre las células inmunes 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., Methods Enzymol. (1981) 73; 3-46) y similares.

Más específicamente, la fusión celular anterior se lleva a cabo en un 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 aumentar la eficacia de la fusión.

La razón preferida de células inmunes y células de mieloma que se va a utilizar es, por ejemplo, de 1 a 10 veces más de células inmunes 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 adecuados 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).

En la fusión celular, se mezclan bien cantidades pre-determinadas de las células inmunes anteriores y las células de mieloma en el cultivo líquido anterior, al cual se añade una solución de PEG previamente calentada a alrededor de 37°C, por ejemplo una solución de PEG con un peso molecular medio de alrededor de 1.000 a 6.000, a una concentración de 30 a 60% (p/v) y se mezclan para obtener las células de fusión deseadas (hibridoma). Después, repitiendo la adición sucesiva de un líquido de cultivo adecuado y la centrifugación para separar el sobrenadante, se pueden separar los agentes de fusión celular etc. que no son deseables para el crecimiento del hibridoma.

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

Además de obtener el hibridoma anterior inmunizando un animal distinto de un ser humano con un antígeno, también es posible sensibilizar linfocitos humanos in vitro con un 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 las células que expresan el antígeno deseado (véase la Publicación de Patente Japonesa Post-Examinada (Kokoku) No. 1-59878). Además, se puede inmunizar 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 en el método descrito más arriba (véanse las Publicaciones de Patente Internacionales WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 y WO 96/33735).

El hibridoma productor de anticuerpo monoclonal construido de este modo se puede subcultivar en el líquido de cultivo convencional, o se puede almacenar durante un período de tiempo prolongado en nitrógeno líquido.

Con el fin de obtener anticuerpos monoclonales a partir de dicho hibridoma, se puede utilizar un método en el que dicho hibridoma se cultiva mediante el método convencional y los anticuerpos se obtienen en forma de sobrenadante, o un método en el que el hibridoma se administra, y se hace crecer en un mamífero compatible con dicho hibridoma y se obtienen los anticuerpos en forma de ascitis. El primer método es adecuado para obtener anticuerpos de elevada pureza, mientras el último es adecuado para la producción a gran escala de anticuerpos.

Por ejemplo, se puede construir un hibridoma productor de anticuerpo anti-receptor de IL-6 utilizando el método descrito en la Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) 3-139293. Se puede llevar a cabo por medio de un método en el cual el hibridoma productor del anticuerpo PM-1 que había sido depositado internacionalmente bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest como FERM BP-2998 el 12 de Julio de 1989 con el Patent Microorganism Depository of the National Institute of Industrial Science and Technology, en Chuo 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japón, se inyecta intraperitonealmente en ratones BALB/c para obtener la ascitis a partir de la cual se purifica el anticuerpo PM-1, o un método en el cual dicho hibridoma se cultiva en un medio de cultivo adecuado tal como el medio RPMI1640 que contiene suero bovino fetal al 10% y MB-Condimed H1 al 5% (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.

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

Específicamente, el ARNm que codifica la región variable (V) del anticuerpo deseado se aísla de células productoras de anticuerpo tales como un hibridoma. El aislamiento del ARNm se lleva a cabo preparando el 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 (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159), y después se purifica el ARNm del ARN total utilizando el kit de Purificación de ARNm (fabricado por Pharmacia) y similares. Alternativamente, se puede preparar directamente el ARNm utilizando el Kit de Purificación de ARNm Quick Prep (fabricado por Pharmacia).

El ADNc de la región V del anticuerpo se puede sintetizar a partir del ARNm obtenido de este modo utilizando una transcriptasa inversa. Se puede sintetizar el ADNc utilizando el Kit de Síntesis de ADNc de la primera Hebra con Transcriptasa Inversa AMV y similares. Alternativamente, para la síntesis y amplificación del ADNc, se puede utilizar el Kit 5'-Ampli FINDER RACE Kit (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 de allí y después se introduce en E. coli etc., a partir de la cual se seleccionan 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 didesoxi.

Una vez que se ha obtenido el ADN que codifica la región V del anticuerpo deseado, éste se puede ligar al ADN que codifica la región constante (región C) del anticuerpo deseado, que después es integrado en un vector de expresión. Alternativamente, el ADN que codifica la región V del anticuerpo se puede integrar en un vector de expresión que contiene el ADN que codifica la región C del anticuerpo.

Con el fin de producir el anticuerpo para su uso en la presente invención, se integra el gen del anticuerpo como se describe más abajo en un vector de expresión para que sea expresado bajo el control de la región reguladora de la expresión, por ejemplo un intensificador y/o un promotor. Con posterioridad, el vector de expresión se puede transformar en una célula anfitriona y después se puede expresar allí el anticuerpo.

De acuerdo con la presente invención, se puede utilizar un anticuerpo recombinante alterado artificialmente tal como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, y un anticuerpo humano con el fin de disminuir la antigenicidad heteróloga contra los seres humanos. Estos anticuerpos alterados se pueden producir utilizando métodos conocidos.

Se puede obtener un anticuerpo quimérico ligando el ADN así obtenido que codifica la región V del anticuerpo al ADN que codifica la región C del anticuerpo humano, que después es integrado en un vector de expresión e introducido en un anfitrión para la producción en el mismo del anticuerpo (véanse la Solicitud de Patente Europea EP 125023, y la Publicación de Patente Internacional WO 92-19759). Utilizando este método conocido, se puede obtener un anticuerpo quimérico útil para la presente invención.

Por ejemplo, un plásmido que contiene ADN que codifica la región V de la cadena L o la región V de la cadena H del anticuerpo quimérico PM-1 fue designado como pPM-k3 o pPM-h1, respectivamente, y la E. coli que tiene el plásmido ha sido depositada internacionalmente bajo las estipulaciones del Tratado de Budapest como NCIMB 40366 y NCIMB 40362, respectivamente, el 12 de Febrero de 1991 con National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (23 St Machar Drive, Aberdeen, Escocia, AB2 1RY, Reino Unido de Gran Bretaña e Irlanda del Norte).

Se ha elaborado un anticuerpo humanizado, que también se denomina anticuerpo humano reformado, trasplantando la región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo de un mamífero distinto de un ser humano, por ejemplo un anticuerpo de ratón, a la CDR del anticuerpo humano. También se conoce la tecnología del ADN recombinante general para la preparación de tales anticuerpos (véanse la Solicitud de Patente Europea EP 125023 y la Publicación de Patente Internacional WO 92-19759).

Específicamente, un ADN que fue diseñado para ligar la CDR del anticuerpo de ratón con la región marco (FR) del anticuerpo humano se sintetiza a partir de varios oligonucleótidos divididos que tienen secciones solapantes entre sí en los extremos del mismo. El ADN obtenido de este modo se liga al ADN que codifica la región C del anticuerpo humano y después se integra en un vector de expresión, que es introducido en un anfitrión para la producción de anticuerpo (véanse la Solicitud de Patente Europea EP 239400 y la Publicación de Patente Internacional WO 92-19759).

Para la FR del anticuerpo humano ligada a través de la CDR, se selecciona la región determinante de la complementariedad que forma un sitio de unión al antígeno favorable. Cuando se desea, se pueden sustituir los aminoácidos de la región marco de la región variable del anticuerpo de manera que la región determinante de la



complementariedad del anticuerpo humano reformado puede formar un sitio de unión al antígeno apropiado (Sato, K. et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856).

5 Por ejemplo, para un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado, se utiliza la región C del anticuerpo humano. En cuanto a la región C del anticuerpo humano, se puede mencionar Cy, y se pueden utilizar, por ejemplo, Cy1, Cy2, Cy3, y Cy4. La región C del anticuerpo humano se puede modificar para mejorar la estabilidad del anticuerpo o la producción del mismo.

10 Un anticuerpo quimérico consiste en la región variable de un anticuerpo derivado de un mamífero distinto de un ser humano y la región C derivada de un anticuerpo humano, mientras un anticuerpo humanizado consiste en la región determinante de la complementariedad de un anticuerpo derivado de un mamífero distinto de un ser humano y la región marco y la región C de un anticuerpo derivado de un anticuerpo humano. Por lo tanto, la antigenicidad del mismo en el organismo humano se ha reducido de manera que son útiles como anticuerpos para su uso en la presente invención.

Como una realización preferida del anticuerpo humanizado para su uso en la presente invención, se puede mencionar el anticuerpo PM-1 humanizado (véase la Publicación de Patente Internacional WO 92-19759).

15 Además, en cuanto al método de obtención del anticuerpo humano, se conoce una tecnología que emplea la inmunopurificación con una genoteca de anticuerpos humanos, además de los descritos más arriba. Por ejemplo, la región variable del anticuerpo humano es expresada sobre la superficie de un fago mediante el método de presentación en fagos en forma de un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) para seleccionar un fago que se une al antígeno. Analizando el gen del fago seleccionado, se puede determinar la secuencia del ADN que codifica la región variable del anticuerpo humano que se une al antígeno. Una vez que se ha aclarado la secuencia del ADN de scFv que se une al antígeno, es posible construir un vector de expresión apropiado que contiene dicha secuencia y después obtener un anticuerpo humano. Estos métodos ya se conocen y se pueden encontrar en los documentos WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, y WO 95/15388.

20 Los genes de anticuerpos construidos como se ha descrito más arriba se pueden expresar y obtener mediante un método conocido. En el caso de las células de mamífero, la expresión se puede lograr utilizando un vector que contiene un promotor útil comúnmente utilizado, el gen del anticuerpo que se va a expresar, el ADN en el cual se ha conectado operablemente la señal poliA en 3' aguas abajo de la misma o un vector que contiene dicho ADN. Los ejemplos del promotor/intensificador incluyen el promotor/intensificador temprano de citomegalovirus humano.

30 Adicionalmente, en cuanto al promotor/intensificador que se puede utilizar para la expresión del anticuerpo para su uso en la presente invención, se pueden emplear promotores/intensificadores virales tales como los de retrovirus, virus del polio, adenovirus, y virus de simios 40 (SV40), y promotores/intensificadores derivados de células de mamífero tales como el factor de elongación 1 $\alpha$  humano (HEF1 $\alpha$ ).

35 Por ejemplo, la expresión se puede completar fácilmente mediante el método de Mulligan et al. (Mulligan, R. C. et al., *Nature* (1979) 277, 108-114) cuando se utiliza el promotor/intensificador de SV40, o mediante el método de Mizushima et al. (Mizushima, S. y Nagata, S. *Nucleic Acids Res.* (1990) 18, 5322) cuando se utiliza un promotor/intensificador HEF1 $\alpha$ .

40 En el caso de *E. coli*, la expresión se puede llevar a cabo conectando operablemente un promotor útil comúnmente utilizado, una secuencia señal para la secreción del anticuerpo, y el gen del anticuerpo que se va a expresar, seguido de la expresión del mismo. 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. (Ward, E.S. et al., *Nature* (1998) 341, 544-546; Ward, E.S. et al., *FASEB J.* (1992) 6, 2422-2427) cuando se emplea el promotor lacZ, y se puede utilizar el método de Better et al. (Better, M. et al., *Science* (1988) 240, 1041-1043) cuando se emplea el promotor araB.

45 En cuanto a la secuencia señal para la secreción del anticuerpo, cuando se produce en el periplasma de *E. coli*, se puede emplear la secuencia señal pelB (Lei, S. P. et al., *J. Bacteriol.* (1987) 169, 4379-4383). 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).

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

55 Para la producción de anticuerpo para su uso en la presente invención, se puede utilizar cualquier sistema de producción. El sistema de producción para la preparación de anticuerpo comprende el sistema de producción in vitro o in vivo. En cuanto al sistema de producción in vitro, se puede mencionar un sistema de producción que emplea células eucarióticas y el sistema de producción que emplea células procarióticas.

- 5 Cuando se utilizan las células eucarióticas, existen sistemas de producción que emplean células animales, células vegetales, o células fúngicas. Las células animales conocidas incluyen (1) células de mamífero tales como células CHO, células COS, células de mieloma, células de riñón de cría de hámster (BHK), células HeLa, y células Vero, (2) células de anfibio tales como oocitos de *Xenopus*, o (3) células de insecto tales como sf9, sf21, y Tn5. Las células vegetales conocidas incluyen, por ejemplo, aquellas derivadas de *Nicotiana tabacum*, que pueden ser sometidas a cultivo de callos. Las células fúngicas conocidas incluyen levaduras tales como el género *Saccharomyces*, más específicamente *Saccharomyces cerevisiae*, u 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*.
- 15 Introduciendo, por medio de transformación, el gen del anticuerpo deseado en estas células y cultivando 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, RPMI1640, e IMDM, y se pueden utilizar combinados suplementos de suero tales como suero de ternera fetal (FCS). Además, se pueden producir anticuerpos in vivo implantando células en las cuales se ha introducido el gen del anticuerpo en la cavidad abdominal de un animal y similares.
- 20 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.
- 25 En cuanto a los mamíferos, se pueden utilizar mamíferos, cerdos, ovejas, ratones, y ganado vacuno (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). Asimismo, en cuanto a los insectos, se pueden utilizar gusanos de seda. Cuando se utilizan plantas, se puede emplear, por ejemplo, tabaco.
- 30 Los genes del anticuerpo son introducidos en estos animales o plantas, y los anticuerpos son producidos en dichos animales o plantas, y recuperados. Por ejemplo, se inserta un gen de anticuerpo en el medio del gen que codifica la proteína que es producida inherentemente en la leche tal como la caseína  $\beta$  de cabra para preparar genes de fusión. Los fragmentos de ADN que contienen el gen de fusión en el cual ha sido 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 a partir de la leche producida por la cabra transgénica nacida de la cabra que recibió el embrión o de los vástagos de la misma. Con el fin de incrementar la cantidad de leche que contiene el anticuerpo deseado producida por la cabra transgénica, se pueden administrar hormonas a la cabra transgénica según sea apropiado (Ebert, K.M. et al., *Bio/Technology* (1994) 12, 699-702).
- 35 Cuando se utilizan gusanos de seda, se infectan los gusanos de seda con baculovirus en los cuales se ha insertado el gen del anticuerpo, y se puede obtener el anticuerpo deseado a partir del fluido corporal del gusano de seda (Maeda, S. et al., *Nature* (1985) 315, 592-594). Por otra parte, cuando se utiliza tabaco, se inserta el gen del anticuerpo deseado en un vector de expresión para plantas, por ejemplo pMON 530, y después se introduce el vector en una bacteria tal como *Agrobacterium tumefaciens*. Después se infecta con la bacteria el tabaco, por ejemplo *Nicotiana tabacum*, 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).
- 40 Cuando se produce el anticuerpo en sistemas de producción in vitro o in vivo, como se ha descrito más arriba, 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 son transformados simultáneamente, o el ADN que codifica la cadena H y la cadena L pueden ser integrados en un único vector de expresión, y el anfitrión es transformado con él (véase la Publicación de Patente Internacional WO 94-11523).
- 45 Los anticuerpos para su uso en la presente invención pueden ser fragmentos de anticuerpos o versiones modificadas de los mismos con tal que sean utilizados preferiblemente. Por ejemplo, en cuanto a los fragmentos de anticuerpo, se pueden mencionar Fab,  $F(ab)_2$ , Fv o Fv de cadena sencilla (scFv) en los que la Fv de la cadena H y la cadena L fueron ligados por medio de un conector adecuado.
- 50 Específicamente, los anticuerpos se tratan con una enzima, por ejemplo, papaína o pepsina, para producir fragmentos de anticuerpo, o se construyen los genes que codifican estos fragmentos de anticuerpo, y después se introducen en un vector de expresión, que es expresado en una célula anfitriona adecuada (véanse, 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; Plueckthun, A. y Skerra, A., *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496; Lamoyi, E., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 652-663; Rousseaoux, J. et al., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 663-66; Bird, R.E. et al., *TIBTECH* (1991) 9, 132-137).
- 55 Se puede obtener un scFv ligando 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 por medio de un conector, preferiblemente un conector peptídico (Huston, J.S. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 5879-5883). La región V de la cadena H y la región V de la cadena L del scFv pueden derivar de cualquiera de los anticuerpos

anteriormente mencionados. En cuanto al conector peptídico para ligar las regiones V, se puede utilizar cualquier péptido de cadena sencilla que comprenda, por ejemplo, de 12 a 19 residuos de aminoácido.

5 El ADN que codifica el scFv se puede obtener utilizando la cadena H o la región V de la cadena H del anticuerpo anterior y el 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 con el par de cebadores que especifica ambos extremos del mismo, y amplificando adicionalmente la combinación de ADN que codifica la porción conectora del péptido y el par de cebadores que define que ambos extremos de dicho ADN puedan ser ligados a la cadena H y a la cadena L, respectivamente.

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

Estos fragmentos de anticuerpo se pueden producir obteniendo el gen del mismo de una manera similar a la mencionada más arriba y permitiendo que sea expresado en un anfitrión. "Anticuerpo" según se utiliza en la presente memoria también incluye estos fragmentos de anticuerpo.

15 En cuanto a los anticuerpos modificados, se pueden utilizar anticuerpos asociados con diferentes moléculas tales como polietilenglicol (PEG). "Anticuerpo" según se utiliza en la presente memoria también incluye estos anticuerpos modificados. Estos anticuerpos modificados pueden ser obtenidos químicamente modificando los anticuerpos obtenidos de este modo. Estos métodos ya han sido establecidos en la técnica.

20 Los anticuerpos producidos y expresados como se ha descrito más arriba pueden ser separados del interior o el exterior de la célula anfitriona y después pueden ser purificados hasta su homogeneidad. La separación y purificación del anticuerpo para su uso en la presente invención se pueden completar 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. Alternativamente, los métodos para la separación y purificación  
25 utilizados convencionalmente para proteínas pueden ser empleados sin ninguna limitación.

La separación y purificación del anticuerpo para su uso en la presente invención se pueden completar combinando, según sea apropiado, cromatografías distintas de la cromatografía de afinidad mencionada más arriba, filtración, ultrafiltración, precipitación por adición de sal, diálisis y similares. La cromatografía incluye, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel y similares. Estas cromatografías se  
30 pueden aplicar a la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Alternativamente, se puede utilizar la HPLC de fase inversa.

La concentración de anticuerpo obtenida en lo anterior se puede determinar mediante la medición de la absorbancia o el análisis de inmunoabsorción con enzima ligada (ELISA) y similares. De este modo, cuando se emplea la medición de la absorbancia, la muestra se diluye apropiadamente con PBS(-) y después se mide la absorbancia a  
35 280 nm, seguido del cálculo utilizando el coeficiente de absorción de 1,35 DO a 1 mg/ml. Cuando se utiliza el método ELISA, la medición se lleva a cabo como sigue. De este modo, se añaden 100 µl de anti-IgG humana de cabra (fabricada por TAG) 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 incuban durante la noche a 4°C para inmovilizar el anticuerpo. Después del bloqueo, se añaden 100 µl de cada uno del anticuerpo de la presente invención diluido apropiadamente o una muestra que  
40 contiene el anticuerpo, o 100 µl de IgG humana (fabricada por CAPPEL) como patrón, y se incuban a la temperatura ambiente durante 1 hora.

Después de lavar, 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 de lavar, se  
45 añade la solución sustrato y se incuba, seguido de la medición de la absorbancia a 405 nm utilizando el LECTOR DE MICROPLACA Modelo 3550 (fabricado por Bio-Rad) para calcular la concentración del anticuerpo deseado.

La IL-6 alterada descrita en la presente memoria 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 IL-6 por la unión al receptor de IL-6, no transmite la actividad biológica de IL-6, y de este modo bloquea la transducción de la señal por IL-6.

La IL-6 alterada puede ser construida por medio de la introducción de mutaciones remplazando residuos de aminoácido de la secuencia de aminoácido de IL-6. IL-6, la fuente de la IL-6 alterada puede tener cualquier origen, pero cuando se va a tener en cuenta la antigenicidad, es preferiblemente IL-6 humana.

55 Específicamente, la estructura secundaria de la IL-6 se pronostica utilizando un programa de modelado molecular conocido de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo WHATIF (Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990), 8, 52-56), y se evalúan los efectos globales del residuo de aminoácido que se va a remplazar. Después de haber determinado un residuo de aminoácido apropiado, se introduce la mutación para efectuar la sustitución del aminoácido mediante el método de la 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 como molde para obtener de ese modo un

gen que codifica una 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 los métodos de expresión, producción y purificación de dicho anticuerpo recombinante.

5 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, documento WO 96-18648, y documento WO 96-17869.

10 El péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 descritos en la presente memoria tienen una actividad de unión al receptor de IL-6 o 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 inhibe específicamente la unión de IL-6 al receptor de IL-6 uniéndose al receptor de IL-6 o a IL-6, respectivamente, y de este modo lo capturan. Como resultado, no transmiten la actividad biológica de IL-6, y de este modo 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 algo de o toda la secuencia de aminoácidos de la región implicada en la unión a IL-6 y al receptor de IL-6 en la secuencia de aminoácidos de IL-6 o del receptor de IL-6. Tal péptido comprende generalmente 10 - 80, preferiblemente 20 - 50, más preferiblemente 20 - 40 residuos de aminoácido.

15 El péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 se pueden construir especificando la región implicada en la unión a IL-6 y al receptor de IL-6 en la secuencia de aminoácidos de IL-6 o del receptor de IL-6, y produciendo algo de o toda la secuencia de aminoácidos mediante un método convencional tal como tecnología de ingeniería genética o un método de síntesis peptídica.

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

25 La preparación del péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 mediante el método de síntesis peptídica se puede efectuar utilizando un método usado comúnmente en la síntesis peptídica tal como la síntesis en fase sólida o la síntesis en fase líquida.

30 Específicamente se puede utilizar el método descrito en Zoku-Iyakuin no Kaihatsu (Sequel to Development of Pharmaceuticals), Vol. 14, Peptide Gousei (Peptide Synthesis), editado by Haruaki Yajima, Hirokawa Shoten, 1991. El método de síntesis en fase sólida utilizado incluye, por ejemplo, una reacción en la cual un aminoácido correspondiente al C-terminal del péptido que se va a sintetizar se acopla a un soporte que es insoluble en disolventes orgánicos, y a continuación un aminoácido en el que el grupo  $\alpha$ -amino o un grupo funcional de la cadena lateral ha sido protegido con un grupo protector apropiado se condensa con un aminoácido cada vez en dirección C-terminal a N-terminal, y una reacción en la que se elimina dicho grupo protector del grupo  $\alpha$ -amino del aminoácido o el péptido acoplado a la resina se repiten alternativamente para elongar la cadena peptídica. Los métodos de síntesis peptídica en fase sólida se dividen en el método Boc y el método Fmoc dependiendo del tipo de grupo protector que se vaya a utilizar.

35 Después de completar la síntesis de los péptidos deseados, se lleva a cabo una reacción de desprotección y una reacción para escindir la cadena peptídica del soporte. Para la escisión de la cadena peptídica, se utilizan generalmente fluoruro de hidrógeno o ácido trifluorometanosulfónico en el método Boc, y TFA en el método Fmoc.

40 En el método Boc, por ejemplo, la resina peptídica anterior se trata en fluoruro de hidrógeno en presencia de anisól. Con posterioridad, el grupo protector se elimina y el péptido se recupera escindiéndolo del soporte. Mediante su liofilización, se puede obtener un péptido bruto. Por otra parte, en el método Fmoc, la reacción de desprotección y la reacción de escisión del péptido del soporte se pueden realizar en TFA por ejemplo, mediante un modo procedimental similar al anterior.

45 El péptido bruto obtenido de este modo se puede aplicar a HPLC para su separación y purificación. Su elución se puede llevar a cabo en un sistema disolvente de agua-acetonitrilo que se utilice comúnmente para la purificación de proteínas en condiciones óptimas. La fracción correspondiente al pico del perfil de cromatografía obtenida se recoge y se liofiliza. La fracción peptídica purificada de este modo se identifica sometiéndola al análisis del peso molecular mediante un análisis de espectroscopía de masas, el análisis de la composición de aminoácidos, o el análisis de la secuencia de aminoácidos, y similares.

50 Los ejemplos específicos del péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 se describen en la Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) 2-188600, la Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) 7-324097, la Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) 8-311098, y Publicación de Patente de los Estados Unidos US 5210075.

55 La actividad del antagonista de IL-6 para su uso en la presente invención para bloquear la transducción de la señal de IL-6 se puede evaluar utilizando un método conocido convencionalmente. Específicamente, se cultiva la línea celular de mieloma humano dependiente de IL-6 (S6B45, KPMM2), la línea celular de linfoma T de Lennert humano

KT3, o la célula dependiente de IL-6 MH60.BSF2, a las que se añade IL-6, y la actividad se puede evaluar utilizando la incorporación de timidina- $H^3$  a la células dependiente de IL-6 en coexistencia del antagonista de IL-6.

5 Alternativamente, se puede cultivar U266, una célula que expresa el receptor de IL-6, a la que se añade IL-6 marcada con  $I^{125}$  y se añade un antagonista de IL-6 al mismo tiempo, y a continuación se determina la IL-6 marcada con  $I^{125}$  unida a la célula que expresa el receptor de IL-6. En el sistema de análisis anterior, se establece un grupo de control negativo que no contiene antagonistas de IL-6, además del grupo en el que está presente un antagonista del receptor de IL-6, y los resultados obtenidos para los mismos se comparan para evaluar la actividad inhibidora del antagonista del receptor de IL-6.

10 Como se describe en el Ejemplo de más abajo, el anticuerpo anti-receptor de IL-6 exhibió un efecto terapéutico de la vasculitis, sugiriendo que los antagonistas de IL-6 tales como el anticuerpo anti-receptor de IL-6 son eficaces como agente terapéutico para la vasculitis.

El sujeto que se va a tratar en la presente invención es un mamífero. El sujeto mamífero que se va a tratar es preferiblemente un ser humano.

15 Los agentes preventivos o terapéuticos de la presente invención se pueden administrar, oralmente o parenteralmente, sistémicamente o localmente. Por ejemplo, se pueden seleccionar inyección intravenosa tal como infusión por goteo, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, supositorios, lavado intestinal, comprimidos orales con recubrimiento entérico, y similares, y el método de administración se puede elegir, según sea apropiado, dependiendo de la edad y las condiciones del paciente. La dosificación eficaz se elige del intervalo de 0,01 mg a 100 mg por kg de peso corporal por administración. Alternativamente, se puede elegir la dosificación en el intervalo de 1 a 20 mg, preferiblemente de 2 a 8 mg por paciente.

20 Las dosificaciones preferidas y los métodos de administración preferidos son tales que, en el caso del anticuerpo anti-receptor de IL-6, las cantidades en las que está presente el anticuerpo libre en la sangre son dosificaciones efectivas. En ejemplos específicos, se administran de 1 mg a 20 mg por kg de peso corporal, preferiblemente de 2 mg a 8 mg, al mes (4 semanas) en una a varias dosis, por ejemplo dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, una vez cada cuatro semanas, y similares mediante inyección intravenosa tal como infusión por goteo e inyección subcutánea. El calendario de administración se puede ajustar observando la enfermedad y los niveles en sangre de los ensayos de laboratorio, por ejemplo, prolongando el intervalo de administración de dos veces a la semana o una vez a la semana a una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, y similares.

30 Los agentes preventivos o terapéuticos para la vasculitis 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 carboxivinílico, carboximetilcelulosa sódica, sal de sodio de ácido poliacrílico, alginato de sodio, dextrano soluble en agua, carboximetilalmidón sódico, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma xantana, goma Arábiga, caseína, gelatina, agar, diglicerina, propilenglicol, polietilenglicol, Vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, seralbúmina humana (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, un 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.

### Ejemplo

40 La presente invención se explicará ahora con más detalle con referencia a los ejemplos de trabajo y los ejemplos de referencia. Se debe observar, no obstante, que la presente invención no está limitada por los mismos de ninguna manera.

### Ejemplo de Trabajo 1

#### Método:

45 Los pacientes con síndrome de vasculitis intratable (poliarteritis nodosa, síndrome de aortitis) refractarios a la terapia convencional se sometieron a tratamiento con anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6. Con el permiso de The Advanced Medical Treatment Committee of the Osaka University Hospital, dos pacientes recibieron anticuerpo PM-1 humanizado (MRA) que es un anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6. El criterio de valoración fue la mejora de la evaluación de imágenes mediante imagenología de resonancia magnética (IRM) y tomografía computarizada (TC), la mejora de las condiciones cutáneas, la mejora de los marcadores inflamatorios tales como la proteína C reactiva (PCR), y mejora de QOL (dolor, artralgia, malestar). Asimismo, se evaluaron los recuentos de células de sangre periférica, la bioquímica general, la función homeostática, IL-6, el receptor soluble de IL-6, la concentración de anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6 en sangre, el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), la interleuquina-1b (IL-1b), y el factor de crecimiento epidérmico vascular (VEGF).

55 **Resultado:**

**Caso 1:**

Mujer de 19 años de edad. Diagnosticada de síndrome de aortitis en 1996. Tenía una complicación de colitis ulcerosa. Se comenzó con Prednisolona (PSL) 60 mg/día. Ni siquiera el uso combinado de ciclosporina pudo reducir la PSL a 20 mg/día o menos. En 1998, en respuesta al agravamiento, se utilizó ciclofosfamida 150 mg/día además de la terapia por pulsos de metilprednisolona (mPSL), pero no se pudo reducir a 30 mg/día o menos. Se añadió betametasona 1 mg/día, y a continuación se realizó la leucoféresis siete veces, pero sin efecto. En 2000 y más adelante, se utilizó intermitentemente la terapia por pulsos de mPSL, y se utilizaron combinados 100 mg/día de azatioprina, 2 g/día de micofenolato de mofetilo, y 17,5 mg/semana de metotrexato, pero sin efecto.

Como se muestra en las Figs. 1-6, la TC reveló la hipertrofia notoria de la pared de los vasos sanguíneos en la aorta ascendente, la trifurcación del arco aórtico, y la aorta descendente. Se observó estenosis en la arteria subclavia izquierda (1t. SCA). Se observó inflamación severa con 12,6 mg/dl de PCR, y debido al dolor de pecho persistente grave, una reducción de peso corporal de 5 kg al mes, y se produjeron ataques de inconsciencia, se utilizó infusión por goteo de 200 mg/semana de MRA. Alrededor de dos semanas después, la PCR se volvió negativa. Un mes después, mejoró el dolor de pecho, y como se observa en las Figs. 1-6, se observaron mejora de la hipertrofia de la pared de los vasos sanguíneos en la aorta ascendente, la trifurcación del arco aórtico y la aorta descendente, y el ensanchamiento del lumen de los vasos sanguíneos y, además, mejoró el flujo sanguíneo de la arteria carótida. Asimismo la hemoglobina fecal se volvió negativa, y los síntomas de colitis ulcerosa desaparecieron. Durante la terapia con MRA, aumentaron los niveles de TNF $\alpha$ , pero sin agravamiento alguno de los síntomas. La mejora de la hipertrofia de la pared de la aorta y el ensanchamiento del lumen de los vasos sanguíneos se mantuvieron hasta los dos años de la terapia con MRA. La arteritis de Takayasu también se denomina enfermedad sin pulso, y en este paciente tampoco se podía sentir el pulso, pero después del tratamiento se pudo sentir la pulsación de las arterias del radio y el cúbito en la muñeca. Debido al uso prolongado de MRA, los niveles en sangre de IL-6 disminuyeron de 1720 pg/ml a 100 pg/ml.

**Caso 2:**

Un varón de 42 años de edad en 1986, desarrolló arteritis nodosa (de tipo cutáneo), y a pesar de los tratamientos con PSL, azatiopurina, colchicina y anti-coagulantes, se repitieron remisión y agravamiento. En 1995 y posteriormente, se utilizó ciclofosfamida combinada con la terapia por pulsos de mPSL, pero sin efecto. A partir de 1997, comenzó la administración en embolada de azatiopurina, ciclofosfamida y  $\gamma$ -globulina, y a partir de 2000, se iniciaron la terapia por pulsos de ciclofosfamida y la leucoféresis, pero sin efecto. Se realizó injerto cutáneo sobre la úlcera cutánea debida a la vasculitis, pero sin efecto, y, debido al agravamiento, se realizaron la extirpación de la fíbula derecha y una amputación B-K. La vasculitis necrótica se agravó adicionalmente, y la úlcera del miembro inferior se agrandó. Después de comenzar el tratamiento con 200 mg/semana de un anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6, mejoraron la fiebre, el eritema cutáneo y los dolores musculares observados previamente. Aunque no se pudo evitar la extirpación del muslo derecho, después de eso se observó la normalización de los recuentos de leucocitos con disminución de IL-6 en sangre, y no agravamiento de la úlcera cutánea.

**Discusión:**

Puesto que MRA fue eficaz para pacientes con vasculitis intratable que no podía ser controlada mediante los tratamientos convencionales, se sugirió que el tratamiento de inhibición de IL-6 podría proporcionar un método de tratamiento novedoso para la vasculitis. Esto significa que la IL-6 es indispensable para el establecimiento de la patología de la vasculitis. Asimismo, puesto que se observó la reducción de la IL-6 en todos los casos, esto demuestra que el tratamiento de inhibición de IL-6 no solo tiene un efecto anti-inflamatorio sino que actúa sobre la naturaleza esencial de la vasculitis.

**Ejemplo de referencia 1. Preparación de receptor de IL-6 soluble humano**

Se preparó receptor de IL-6 soluble mediante el método 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., (Yamasaki, K. 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 a continuación se insertó en mp18 (fabricado por Amersham). Utilizando un cebador oligonucleotídico 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 mediante el método PCR utilizando el Mutagenesis System (fabricado por Amersham) *in vitro*. El procedimiento dio como resultado la introducción de un codón de parada en el aminoácido de la posición 345, y proporcionó el ADNc que codificaba el receptor soluble de IL-6.

Con el fin de expresar el ADNc del receptor soluble de IL-6 en células CHO, éste se ligó al plásmido pSV (fabricado por Pharmacia) para obtener el plásmido pSVL344. El ADNc del receptor soluble de IL-6 que se escindió con Hind III-Sal I se insertó en el plásmido pECEdhfr que contenía el ADNc de dhfr para obtener el plásmido pECEdhfr344 que se puede expresar en las células CHO.

Se transfectaron 10  $\mu$ g de plásmido pECEdhfr344 a una línea celular dhfr-CHO DXB-11 (Urlaub G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) por medio del método de precipitación con fosfato de calcio (Chen C. et al., Mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745-2751). Las células CHO transfectadas se cultivaron durante 3 semanas en un medio

de selección  $\alpha$  MEM sin nucleósidos que contenía glutamina 1 mM, FCS dializado al 10%, 100 U/ml de penicilina, y 100  $\mu$ g/ml de estreptomicina.

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

Ejemplo de referencia 2. Preparación de anticuerpo contra IL-6 humana

10 Se inmunizaron ratones BALB/c con 10  $\mu$ g de la IL-6 recombinante (Hirano et al., *Immunol. Lett.*, (1988) 17, 41) junto con coadyuvante completo de Freund, y esto se repitió cada semana hasta que se pudo detectar anticuerpo anti-IL-6 en el suero. Las células inmunes se extrajeron de los nódulos linfáticos locales y a continuación se fusionaron con una línea celular de mieloma P3U1 utilizando polietilenglicol 1500. Los hibridomas se seleccionaron de acuerdo con el método de Oi et al. (*Selective Methods in Cellular Immunology*, W.H. Freeman y Co., San Francisco, 351, 1980)

15 que emplea el medio HAT, y se estableció un hibridoma que produce anticuerpo anti-IL-6 humana.

El hibridoma que produce anticuerpo anti-IL-6 humana se sometió al análisis de unión a IL-6 como sigue.

De este modo, una placa de microtitulación de 96 pocillos elaborada de polivinilo flexible (fabricada por Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA) se revistió con 100  $\mu$ l de anti-Ig de ratón de cabra (10  $\mu$ l/ml, fabricado por Cooper Biomedical, Inc., Malvern, PA) durante la noche a 4°C. Con posterioridad, la placa se trató con 100  $\mu$ l de PBS que contenía seralbúmina bovina (BSA) al 1% a temperatura ambiente durante 2 horas.

20

Después de lavar en PBS, se añadieron a cada pocillo 100  $\mu$ l del sobrenadante de cultivo del hibridoma, y a continuación se incubó durante la noche a 4°C. La placa se lavó, se añadió a cada pocillo IL-6 recombinante marcada con  $I^{125}$  a una concentración de 2000 cpm/0,5 ng/pocillo, y a continuación se determinó la radiactividad de cada pocillo después del lavado mediante un contador gamma (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA). De 216 clones de hibridomas, 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 IgG1k.

25

A continuación, se utilizó el clon de hibridoma de ratón dependiente de IL-6 MH60.BSF2 para examina la actividad neutralizadora con respecto al crecimiento del hibridoma mediante el anticuerpo MH166. Las células MH60.BSF2 se dispensaron a  $1 \times 10^4/200$   $\mu$ l/pocillo, y a esto se le añadieron las muestras que contenían el anticuerpo MH166, se cultivaron durante 48 horas, se añadieron 0,5  $\mu$ Ci/pocillo de timidina- $H^3$  (New England Nuclear, Boston, MA), y el cultivo prosiguió durante 6 horas adicionales. Las células se colocaron sobre un papel de filtro de vidrio y se trataron con la cosechadora automática (Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan). Como control, se utilizó anticuerpo anti-IL-6 de conejo.

30

35 Como resultado, el anticuerpo MH166 inhibió, de una manera dependiente de la dosis, la incorporación de timidina- $H^3$  de las células MH60.BSF2 inducida por IL-6. Esto reveló que el anticuerpo MH166 neutraliza la actividad de IL-6.

### Ejemplo de referencia 3. Preparación de anticuerpo anti-receptor de IL-6 humana

Un anticuerpo anti-receptor de IL-6 MT18 preparado mediante el método de Hirata et al. (Hirata, Y. et al. *J. Immunol.*, (1989) 143, 2900-2906) se unió a Sefarosa 4B activada por CNBr (fabricada por Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) de acuerdo con el régimen adjunto, y el receptor de IL-6 (Yamasaki, K. et al., *Science* (1988) 241, 825-828) se purificó. Una línea celular de mieloma humana U266 se solubilizó con hidrocloreuro de fluoruro de p-para-aminofenilmetanosulfonilo 1 mM (fabricado por Wako Chemicals) (tampón de digitonina) que contenía digitonina al 1% (fabricada por Wako Chemicals), trietanolamina 10 mM (pH 7,8) y NaCl 0,15 M, 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 para utilizarlo en la inmunización.

40

45

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

50

Se mezclaron 0,05 ml del sobrenadante de cultivo del hibridoma con 0,01 ml de Protein G Sefarosa (fabricada por Pharmacia). Después de lavar, la Sefarosa se incubó con 0,005 ml de solución de receptor de IL-6 marcado con  $S^{35}$  preparada como se ha descrito anteriormente. El inmunoprecipitado se analizó mediante SDS-PAGE para investigar

55

el sobrenadante de cultivo del hibridoma que reacciona con el receptor de IL-6. Como resultado, se estableció el clon de hibridoma PM-1 (FERM BP-2998) de reacción positiva. El anticuerpo producido a partir del hibridoma PM-1 tiene un subtipo de IgG1κ.

5 La actividad inhibitora de la unión a IL-6 del anticuerpo producido por el hibridoma PM-1 al receptor de IL-6 humano se estudió utilizando la línea celular de mieloma humana U266. Se preparó una IL-6 recombinante humana a partir de *E. coli* (Hirano et al., *Immunol. Lett.*, (1988) 17, 41-45), y se marcó con  $I^{125}$  utilizando el reactivo de Bolton-Hunter (New England Nuclear, Boston, MA) (Taga, T. et al., *J. Exp. Med.* (1987) 166, 967-981).

10 Se cultivaron  $4 \times 10^5$  células U266 con el sobrenadante de cultivo del hibridoma PM-1 al 70% (v/v) junto con 14.000 cpm de IL-6 marcada con  $I^{125}$  durante una hora. Se dispusieron en capas 70  $\mu$ l de la muestra sobre 300  $\mu$ l de FCS en un tubo de polietileno de microcentrífuga de 400  $\mu$ l. Después de la centrifugación, se determinó la radiactividad de la célula.

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 de anticuerpo anti-receptor de IL-6 de ratón**

15 Se preparó un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor de IL-6 de ratón de acuerdo con el método descrito por Saito, et al., *J. Immunol.* (1991) 147, 168-173.

Las células CHO que producen el receptor soluble de IL-6 de ratón se cultivaron en el líquido de cultivo IMDM que contenía FCS al 10%. A partir del sobrenadante de cultivo, se purificó el receptor soluble de IL-6 de ratón utilizando una columna de afinidad en la que el anticuerpo anti-receptor de IL-6 de ratón RS12 (véase Saito, et al., supra) estaba fijado a gel Affigel 10 (fabricado por Biorad).

20 El receptor soluble de IL-6 de ratón (50  $\mu$ g) obtenido de este modo se mezcló con coadyuvante completo de Freund, que a continuación se inyectó en el abdomen de ratas Wistar. A partir de 2 semanas de la administración, los animales recibieron un refuerzo de coadyuvante incompleto de Freund. El día 45, se cosecharon las células del bazo de la rata, y alrededor de  $2 \times 10^8$  células del mismo se fusionaron con  $1 \times 10^7$  células de mieloma de ratón P3U1 utilizando un PEG1500 al 50% (fabricado por Boehringer Mannheim) de acuerdo con el método convencional, y a continuación se escrutaron mediante el medio de cultivo HAT.

25 Después de añadir el sobrenadante de cultivo del hibridoma a la placa revestida con el anticuerpo de conejo anti-IgG de rata (fabricado por Cappel), se hizo reaccionar el receptor soluble de IL-6 de ratón. Con posterioridad, utilizando anticuerpo de conejo anti-receptor de IL-6 de ratón y anti-IgG de conejo de oveja marcado fosfatasa alcalina, se escrutaron los hibridomas producidos el anticuerpo dirigido contra el receptor soluble de IL-6 de ratón mediante ELISA. Una vez confirmada la producción de anticuerpo, los clones de hibridoma se subescrutaron dos veces para obtener un solo clon de hibridoma. El clon se denominó MR16-1.

30 La actividad neutralizadora del anticuerpo producido por el hibridoma sobre la transducción de la señal de la IL-6 de ratón se examinó mediante la incorporación de timidina  $H^3$  utilizando células MH60.BSF2 (Matsuda, T. et al., *J. Immunol.* (1988) 18, 951-956). En una placa de 96 pocillos, se prepararon células MH60.BSF2 a  $1 \times 10^4$  células/200  $\mu$ l/pocillo. A la placa se le añadieron 10 pg/ml de IL-6 de ratón y anticuerpo MR16-1 o anticuerpo RS12 a 12,3 - 1000 ng/ml, y a continuación se cultivaron a 37°C y  $CO_2$  al 5% durante 44 horas, y después se añadió 1  $\mu$ Ci/pocillo de timidina- $H^3$ . Al cabo de 4 horas, se midió la incorporación de timidina- $H^3$ . Como resultado, el anticuerpo MR16-1 suprimió la incorporación de timidina- $H^3$  por las células MH60.BSF2.

40 De este modo, se demostró que el anticuerpo producido por el hibridoma MR16-1 (FERM BP-5875) inhibe la unión de IL-6 al receptor de IL-6.



**REIVINDICACIONES**

1. Un agente para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la vasculitis, comprendiendo dicho agente un anticuerpo contra el receptor de IL6 como ingrediente activo, donde el anticuerpo inhibe la unión de IL-6 al receptor de IL-6.
- 5 2. El agente de acuerdo con la reivindicación 1, para su uso en la prevención y/o el tratamiento de la vasculitis que tiene resistencia a esteroides y/o inmunosupresores.
3. El agente para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, donde dicha vasculitis es la poliarteritis nodosa.
4. El agente para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, donde dicha vasculitis es el síndrome de aortitis.
- 10 5. El agente para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, donde dicha vasculitis es la vasculitis asociada con anomalías inmunológicas.
6. El agente para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6.
7. El agente para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano.
- 15 8. El agente para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón.
9. El agente para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo recombinante.
- 20 10. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano es obtenible a partir de la línea celular de hibridoma depositada con el número de acceso FERM BP-2998.
11. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón es obtenible a partir de la línea celular de hibridoma depositada con el número de acceso FERM BP-5875.
- 25 12. El agente para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano contra el receptor de IL-6.
- 30 13. El agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicho anticuerpo humanizado contra el receptor de IL-6 de humano es una forma humanizada del anticuerpo obtenible a partir de la línea celular de hibridoma depositada con el número de acceso FERM BP-2998.
14. El uso de un anticuerpo contra el receptor de IL-6 para la fabricación de un agente preventivo y/o terapéutico para la vasculitis, donde el anticuerpo inhibe la unión de IL-6 al receptor de IL-6.
15. El uso de acuerdo con la reivindicación 14, para la fabricación de un agente preventivo y/o terapéutico para la vasculitis que tiene resistencia a esteroides y/o inmunosupresores.
- 35 16. El uso de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, donde dicha vasculitis es la poliarteritis nodosa.
17. El uso de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, donde dicha vasculitis es el síndrome de aortitis.
18. El uso de acuerdo con la reivindicación 14 o 15, donde dicha vasculitis es la vasculitis asociada con anomalías inmunológicas.
- 40 19. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6.
20. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano.
21. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18, donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón.
- 45 22. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 21, donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo recombinante.

23. El uso de acuerdo con la reivindicación 20, donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano es obtenible a partir de la línea celular de hibridoma depositada con el número de acceso FERM BP-2998.

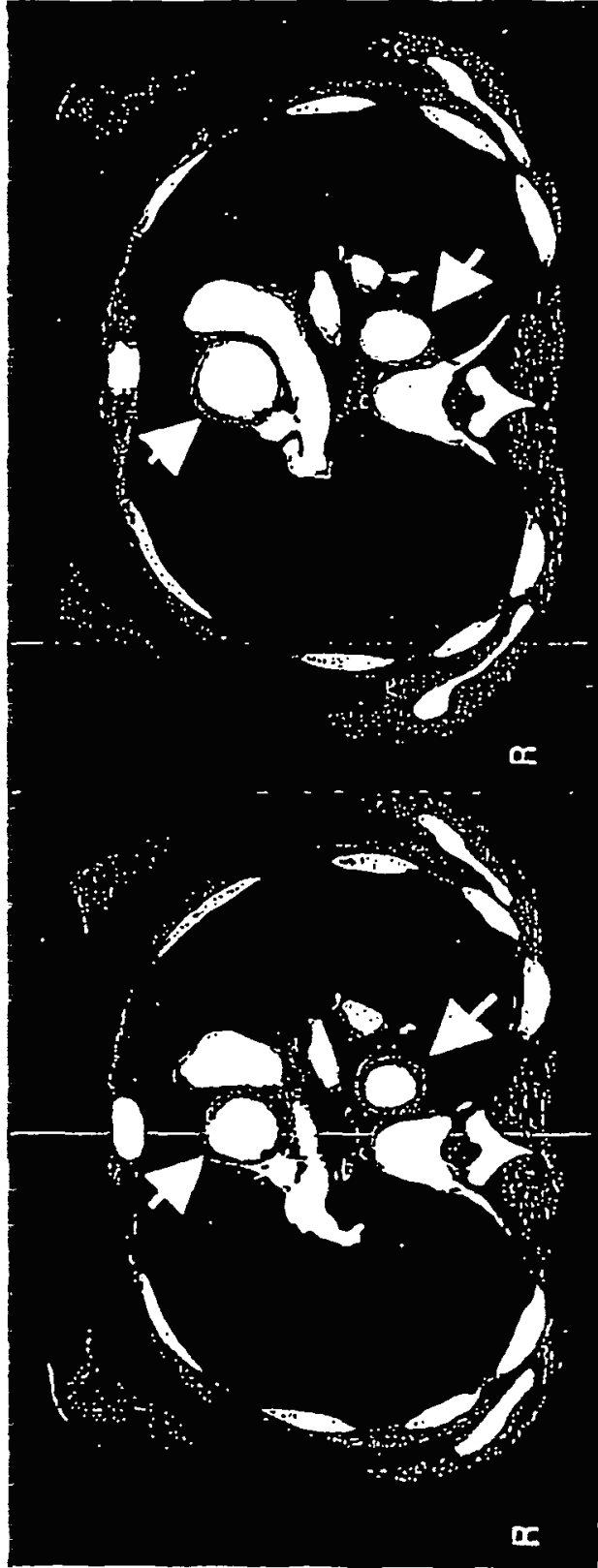
24. El uso de acuerdo con la reivindicación 21, donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón es obtenible a partir de la línea celular de hibridoma depositada con el número de acceso FERM BP-5875.

5 25. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 14 a 24, donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

26. El uso de acuerdo con la reivindicación 25, donde dicho anticuerpo humanizado contra el receptor de IL-6 es una forma humanizada del anticuerpo obtenible a partir de la línea celular de hibridoma depositada con el número de acceso FERM BP-2998.

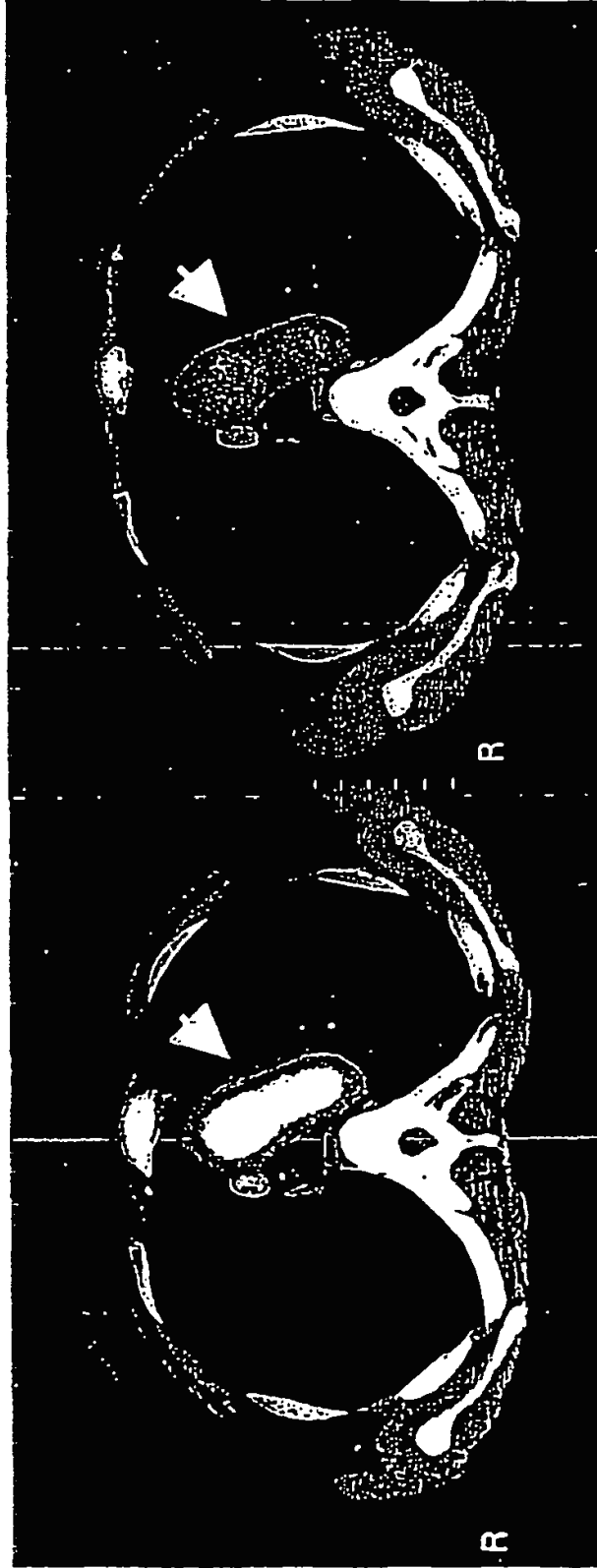
10

Fig.1



**Antes del Tratamiento 4 Semanas después del Tratamiento**

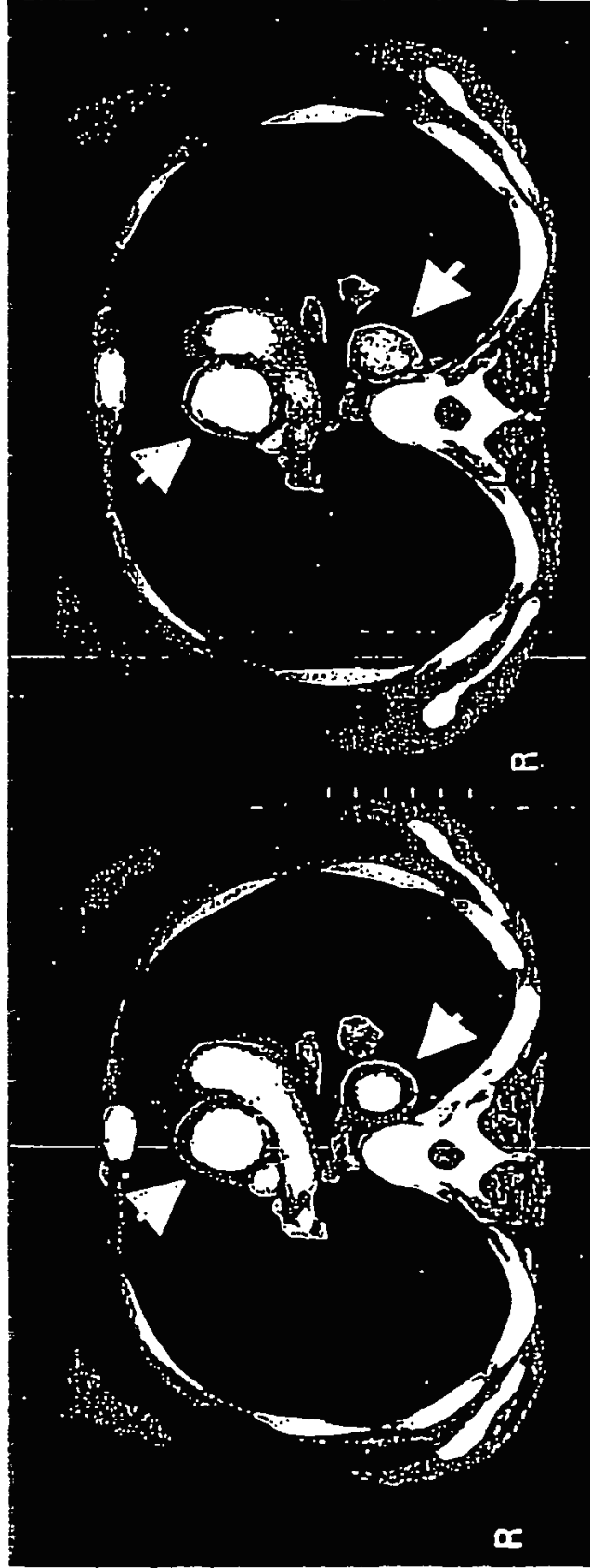
Fig. 2



**4 Semanas Después  
del Tratamiento**

**Antes del Tratamiento**

Fig. 3



**4 Semanas Después  
del Tratamiento**

**Antes del Tratamiento**

Fig. 4

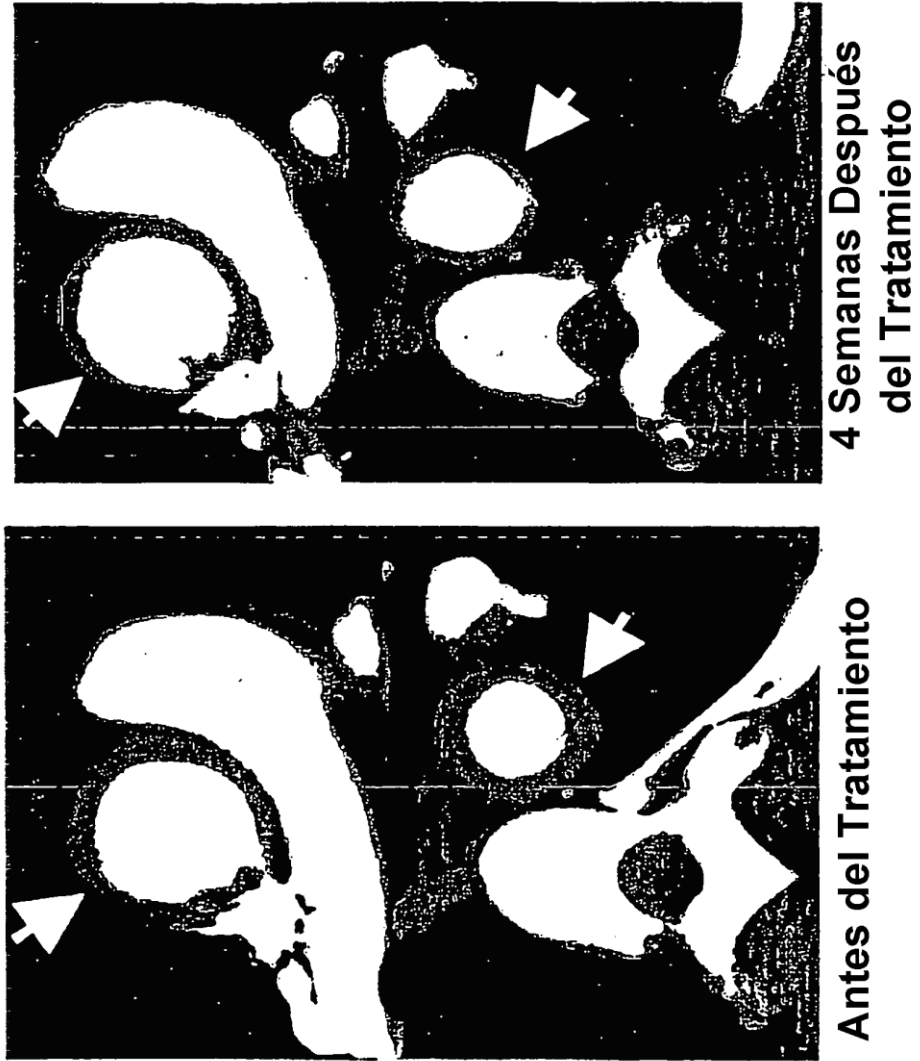
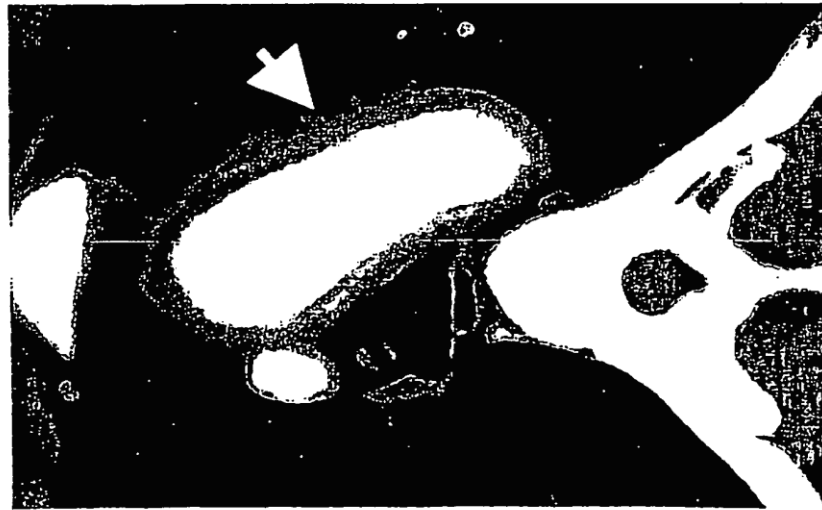
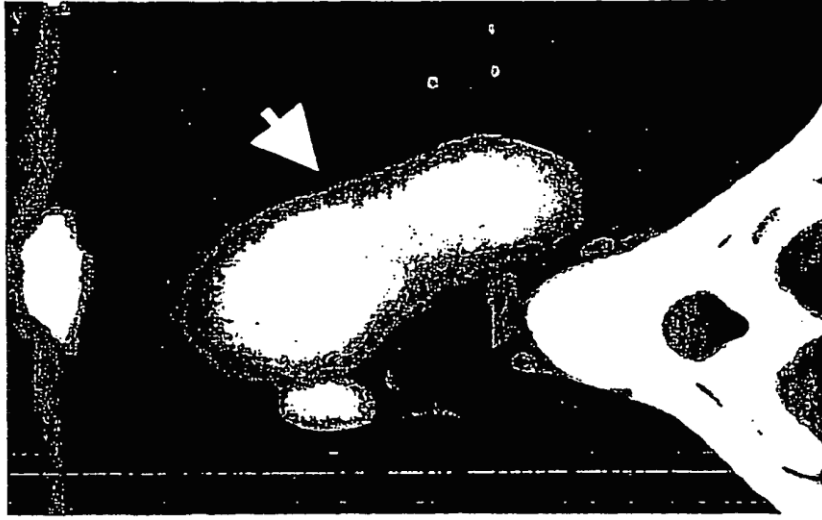


Fig. 5

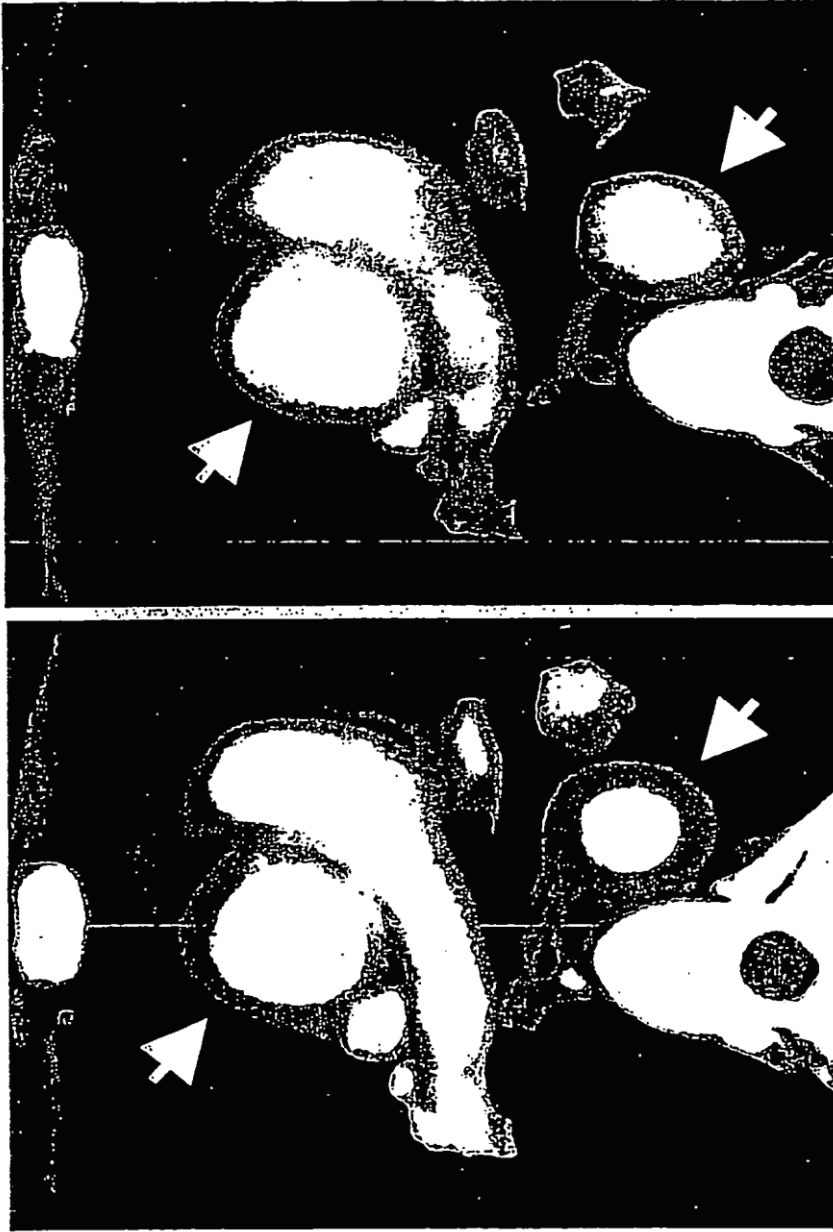


Antes del Tratamiento



4 Semanas Después  
del Tratamiento

Fig. 6



4 Semanas Después  
del Tratamiento

Antes del Tratamiento