

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 222**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 38/20 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **95921130 .1**
96 Fecha de presentación: **07.06.1995**
97 Número de publicación de la solicitud: **0783893**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.07.1997**

54 Título: **Inhibición del crecimiento anómalo de células sinoviales utilizando un antagonista de IL-6 como principio activo**

30 Prioridad:
07.10.1994 JP 24403594

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.07.2012

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

72 Inventor/es:
**KISHIMOTO, Tadimitsu;
MIHARA, Masahiko;
MORIYA, Yoichiro y
OHSUGI, Yoshiyuki**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 384 222 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

Inhibición del crecimiento anómalo de células sinoviales utilizando un antagonista de IL-6 como principio activo.

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un inhibidor del crecimiento de células sinoviales que comprende un antagonista de interleuquina-6 como componente eficaz.

Antecedentes en la técnica

10 La artritis reumatoide crónica es una enfermedad inflamatoria crónica sistémica en la que se produce un crecimiento anómalo del tejido conectivo, incluyendo tejido sinovial, en las articulaciones (Melnik *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 33:493-500, 1990). Se ha demostrado que las articulaciones de los pacientes con artritis reumatoide crónica presentan un marcado crecimiento de células sinoviales, la formación de una estructura de múltiples capas debido a un crecimiento anómalo de las células sinoviales (formación de pannus), la invasión de células sinoviales hacia el tejido cartilaginoso y el tejido óseo, una vascularización hacia el tejido sinovial, y la infiltración de células inflamatorias, tales como linfocitos y macrófagos. Se ha indicado que los mecanismos de aparición de la artritis reumatoide crónica se basan en factores tales como la herencia, infecciones bacterianas y la contribución de diversas citoquinas y factores del crecimiento, pero el mecanismo global de aparición sigue siendo poco claro.

15 En los últimos años se han detectado citoquinas y factores del crecimiento, incluyendo interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-8 (IL-8), factor de necrosis tumoral α (TNF α), factor del crecimiento transformante β (TGF β), factor del crecimiento de fibroblastos (FGF), y factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) en la membrana sinovial y el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide crónica (Nouri *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.*, 55:295-302, 1984; Thornton *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.*, 86:79-86, 1991; Saxne *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 31:1041-1045, 1988; Seitz *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 87:463-469, 1991; Lafyatis *et al.*, *J. Immunol.*, 143:1142-1148, 1989; Melnik *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 33:493-500, 1990).

20 Se cree que IL-1, TNF α y PDGF son factores del crecimiento de células sinoviales particularmente poderosos (Thornton *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.*, 86:79-86, 1991; Lafyatis *et al.*, *J. Immunol.*, 143:1142-1148, 1989; Gitter *et al.*, *Immunology*, 66:196-200, 1989). También se ha sugerido que la estimulación por IL-1 y TNF da como resultado la producción de interleuquina-6 (IL-6) por las células sinoviales (Ito *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 35:1197-1201, 1992).

25 La IL-6 es una citoquina también conocida como factor 2 estimulante de células B o interferón β 2. La IL-6 se descubrió como un factor de diferenciación que contribuye a la activación de células linfoides B (Hirano, T. *et al.*, *Nature*, 324, 73-76, 1986), y después se descubrió que era una citoquina multifuncional que influye en el funcionamiento de una diversidad de tipos celulares diferentes (Akira, S. *et al.*, *Adv. in Immunology*, 54, 1-78, 1993). Son necesarias dos moléculas de la membrana funcionalmente diferentes para la inducción de las actividades IL-6. Una de estas es el receptor de IL-6 (IL-6R), con un peso molecular de aproximadamente 80 KD, que se une de modo específico a IL-6.

30 La IL-6 existe en una forma de unión a membrana que se expresa sobre la membrana celular y penetra a través de la membrana celular, así como en forma de IL-6 soluble (sIL-6R) que consiste principalmente en el dominio extracelular. Otra proteína es gp130, con un peso molecular de aproximadamente 130 KD, que no se une al ligando sino que actúa para mediar en la transducción de señales. La IL-6 y el IL-6R forman el complejo IL-6/IL-6R que, a su vez, se une a otra proteína de membrana gp130, para inducir la actividad biológica de IL-6 en la célula (Taga *et al.*, *J. Exp. Med.*, 196:967, 1987).

35 Se ha indicado que el suero o el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide crónica contiene cantidades excesivas de interleuquina-6 (IL-6) y receptor de IL-6 soluble (sIL-6R) (Houssiau *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 31:784-788, 1988; Hirano *et al.*, *Eur. J. Immunol.*, 18:1797-1801, 1988; Yoshioka *et al.*, *Japn. J. Rheumatol.*, en imprenta), y puesto que se han obtenido resultados similares en modelos animales de artritis reumatoide (Takai *et al.*, *Arthritis Rheum.*, 32:594-600, 1989; Leisten *et al.*, *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 56:108-115, 1990), se ha sugerido que la IL-6 de alguna manera está implicada en la artritis reumatoide crónica.

40 Sin embargo, la publicación de patente no examinada japonesa nº 4-89433 indica que péptidos que estimulan poderosamente la producción de IL-6 son eficaces como terapias para la artritis reumatoide crónica.

45 Además Higaki *et al.* han sugerido que células sinoviales procedentes de pacientes con artritis reumatoide crónica tienen una reacción de crecimiento bajo frente a la IL-6, y que la IL-6, por tanto, tiene una función inhibitoria frente al crecimiento de células sinoviales (*Clinical Immunology*, 22:880-887, 1990). Así, existen informes contradictorios con respecto a la relación entre IL-6 y la artritis reumatoide crónica, y la relación aún no está clara.

50 En fechas recientes, Wendling *et al.* han indicado que la administración de anticuerpos anti-IL-6 a pacientes con artritis reumatoide crónica alivia temporalmente los síntomas clínicos y biológicos, mientras que también aumenta los niveles de IL-6 en suero (*J. Rheumatol.*, 20:259-262, 1993).

El documento EP-A-409607 divulga el anticuerpo humanizado contra un receptor de IL-6 que se reivindica en la presente, pero no menciona ningún uso en ningún tratamiento.

El documento JP-A-04187646 divulga el uso de un anticuerpo contra un receptor de IL-6 para suprimir la acción de IL-6 y su uso para tratar enfermedades provocadas por las acciones de IL-6.

- 5 Estos informes no proporcionan ningún dato sobre si IL-6 acelera el crecimiento de células sinoviales de la artritis reumatoide crónica o si tiene un efecto inhibitorio, y por tanto sigue sin saberse si IL-6 tiene o no un efecto directo sobre las células sinoviales de pacientes con artritis reumatoide crónica.

Descripción de la invención

- 10 Se han utilizado agentes esteroideos antiinflamatorios, tales como corticoesteroides, como terapias para la artritis reumatoide, pero puesto que su uso continuado induce unos efectos secundarios indeseables, tales como daños en tejidos dérmicos y la inhibición de la función de la corteza adrenal, se han buscado fármacos con menos efectos secundarios.

- 15 Un objeto de la presente invención es proporcionar una nueva composición farmacéutica sin las desventajas mencionadas anteriormente, para inhibir el crecimiento anómalo de células sinoviales en la artritis reumatoide crónica, cuyo componente eficaz es un antagonista de interleuquina-6.

- 20 Los presentes inventores han realizado una investigación concienzuda acerca del papel de la IL-6 en células sinoviales de la artritis reumatoide, durante la cual no se descubrió crecimiento de células sinoviales de la artritis reumatoide crónica sólo con IL-6, y por tanto se investigó otro factor distinto a IL-6, y esto dio como resultado la conclusión de la presente invención que se basa en el descubrimiento de que, mientras IL-6 sola no muestra casi efectos de crecimiento sobre células sinoviales, se produce un poderoso efecto de crecimiento de células sinoviales en presencia de IL-6 e IL-6R soluble, y además este efecto de crecimiento de células sinoviales es suprimido por la adición de un antagonista que inhibe la actividad IL-6, tal como un anticuerpo de IL-6R.

De forma más específica, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para suprimir el crecimiento anómalo de células sinoviales, que comprende un antagonista de IL-6 como componente eficaz.

- 25 La presente invención también se refiere a un inhibidor del crecimiento de células sinoviales cuyo componente eficaz es un antagonista de IL-6.

Breve descripción de lo dibujos

- La figura 1 es una gráfica que muestra la captación de ³H-timidina hacia células sinoviales en presencia de IL-6 sola, de sIL-6R sólo, y en presencia de ambos IL-6 y sIL-6R.

- 30 La figura 2 es una gráfica que muestra el efecto de un anticuerpo de IL-6 o de un anticuerpo de IL-6R sobre la captación de ³H-timidina hacia células sinoviales en presencia de ambos IL-1 β y sIL-6R.

La figura 3 es una gráfica que muestra el efecto de un anticuerpo de IL-6 o de un anticuerpo de IL-6R sobre la captación de ³H-timidina hacia células sinoviales en presencia de ambos IL-6 y sIL-6R.

- 35 La figura 4 es una gráfica que muestra el efecto supresor del anticuerpo de IL-6R sobre la aparición de artritis inducida por colágeno en modelos de ratón.

La figura 5 es una gráfica que muestra los niveles de anticuerpos anticolágeno en suero en ratones artríticos.

- 40 La figura 6 es una fotografía de un examen histopatológico de la articulación de la pata trasera de un ratón con artritis por colágeno. (a) es una fotografía procedente de un ratón del grupo al que se le administró anticuerpo del receptor de IL-6, y (b) es una fotografía procedente de un ratón del grupo al que se le administró anticuerpo control. En el grupo al que se le administró anticuerpo del receptor de IL-6, la invasión de tejido de granulación hacia el cartílago y el hueso (sinovitis proliferativa crónica) fue claramente suprimida.

Descripción detallada de la invención

- 45 Una composición farmacéutica según la invención es un fármaco que, cuando se administra a pacientes con artritis reumatoide crónica, suprime el crecimiento de células sinoviales en articulaciones y tiene un efecto aliviante y terapéutico sobre los síntomas.

El antagonista de IL-6 utilizado según la invención es un anticuerpo de IL-6R.

- 50 El anticuerpo utilizado como antagonista según la invención, tal como un anticuerpo de IL-6R, puede ser cualquier derivación o tipo (monoclonal, policlonal), pero se prefieren especialmente anticuerpos monoclonales derivados de animales mamíferos. Estos anticuerpos se unen a IL-6R para inhibir la unión entre IL-6 e IL-6R y, por tanto, para bloquear la transducción de señales de IL-6, inhibiendo la actividad biológica de IL-6.

- 5 Las especies animales para las células productoras de anticuerpos monoclonales no están particularmente limitadas con la condición de que sean de mamífero, y pueden utilizarse anticuerpos humanos o anticuerpos derivados de un mamífero distinto a un ser humano. Los anticuerpos monoclonales derivados de un mamífero distinto de un ser humano son preferiblemente anticuerpos monoclonales derivados de conejos o roedores porque son más fáciles de preparar. No existen restricciones particulares sobre los roedores, pero los ejemplos preferidos son ratones, ratas y hámsters.
- Los ejemplos de anticuerpos de IL-6R incluyen el anticuerpo PM-1 (Hirata *et al.*, J. Immunol., 143:2900-2906, 1989), el anticuerpo AUK12-20, el anticuepo AUK64-7 y el anticuerpo AUK146-15 (solicitud de patente no examinada internacional nº WO92-19759).
- 10 Entre estos, se prefiere el anticuerpo PM-1.
- Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse de la siguiente manera, que se basa en una técnica conocida. Es decir, el IL-6R se utiliza como antígeno sensibilizante para la inmunización según un método de inmunización convencional, y los inmunocitos resultantes entonces se fusionan con células de origen conocidas mediante un método de fusión de células convencional, y las células productoras de anticuerpos monoclonales se seleccionan mediante un método de selección convencional para preparar los anticuerpos.
- 15 De forma más específica, los anticuerpos monoclonales pueden prepararse de la siguiente manera. Por ejemplo, si el antígeno sensibilizante es el IL-6R humano, los anticuerpos se obtienen utilizando la secuencia génica para el IL-6R humano. La secuencia génica del IL-6R humano se inserta en un sistema de vector de expresión público y se utiliza para transformar células hospedantes adecuadas, tras lo cual la proteína de IL-6R deseada se purifica de las células hospedantes o del sobrenadante del cultivo, y la proteína de IL-6R purificada entonces se utiliza como antígeno sensibilizante.
- 20 En el caso del IL-6R humano, la proteína de IL-6R puede obtenerse utilizando la secuencia génica descrita en la solicitud de patente europea nº EP325474. Existen dos tipos de IL-6R, uno que se expresa sobre la membrana celular, y una forma soluble (sIL-6R) que está separada de la membrana celular. El sIL-6R consiste principalmente en el dominio extracelular de IL-6R que está unido a la membrana celular, y se diferencia del IL-6R unido a la membrana porque carece del dominio transmembrana, o del dominio transmembrana y el dominio intracelular.
- 25 Los animales mamíferos inmunizados con el antígeno sensibilizante no tienen restricciones particulares, sino que se seleccionan preferiblemente en consideración a su compatibilidad con las células de origen utilizadas para la fusión celular, y en general pueden utilizarse ratones, ratas, hámsters y conejos.
- 30 La inmunización de los animales con el antígeno sensibilizante puede realizarse mediante un método conocido público. Por ejemplo, un método convencional implica la inyección intraperitoneal o subcutánea de los animales mamíferos con el antígeno sensibilizante. De modo específico, el antígeno sensibilizante se diluye preferiblemente con un equivalente de PBS (disolución salina tamponada con fosfato) o disolución salina fisiológica, se suspende y se utiliza junto con una cantidad adecuada de un adyuvante convencional, tal como adyuvante completo de Freund si se desea, y después se administra a los animales mamíferos unas cuantas veces cada 4-21 días. También puede utilizarse un vehículo apropiado para la inmunización con el antígeno sensibilizante.
- 35 Después de esta inmunización y la confirmación de un aumento en los niveles en suero del anticuerpo deseado, se extraen los inmunocitos de los animales mamíferos y se suministran para la fusión celular, siendo las células esplénicas los inmunocitos especialmente preferidos.
- 40 Las células de origen utilizadas para la fusión con los inmunocitos mencionados anteriormente pueden ser células de mieloma procedentes de animales mamíferos, y pueden utilizarse de forma adecuada una serie de cepas celulares ya conocidas por el público, tales como P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol., 123:1548, 1978), p3-U1 (Current Topics in Microbiology and Immunology, 81:1-7, 1978), NS-1 (Eur. J. Immunol., 6:511-519, 1976), MPC-11 (Cell, 8:405-415, 1976), SP2/0 (Nature, 276:269-270, 1978), Of (J. Immunol. Meth., 35:1-21, 1980), S194 (J. Exp. Med., 148:313-323, 1978), R210 (Nature, 277:131-133, 1979). La fusión celular de los inmunocitos con las células de mieloma puede basarse en un método conocido público, por ejemplo, el método de Milstein *et al.* (Milstein *et al.*, Methods Enzymol., 73:3-46, 1981).
- 45 De forma más específica, la fusión celular mencionada anteriormente se realiza en un cultivo nutriente convencional en presencia de un promotor de la fusión celular. El promotor de la fusión utilizado puede ser, por ejemplo, polietilenglicol (PEG) o el virus Sendai (HVJ), y también puede añadirse si se desea un adyuvante, tal como dimetilsulfóxido, para aumentar la eficacia de la fusión.
- 50 Las proporciones de los inmunocitos y las células de mieloma utilizadas son preferiblemente una cantidad de 1 a 10 veces mayor de inmunocitos con respecto a las células de mieloma. El medio de cultivo utilizado para la fusión celular puede ser, por ejemplo, medio de cultivo RPMI1640 o medio de cultivo MEM, que son adecuados para el crecimiento de cepas de células de mieloma, u otros medios de cultivo habituales utilizados para este cultivo celular, y también pueden utilizarse con ellos disoluciones de suero suplementarias, tales como suero de ternera fetal (FCS).
- 55

- 5 La fusión celular se realiza mezclando a fondo las cantidades prescritas de inmunocitos y de células de mieloma en el medio de cultivo descrito anteriormente, añadiendo una disolución de PEG precalentada hasta aproximadamente 37 °C, por ejemplo, teniendo el PEG un peso molecular medio de aproximadamente 1000 a 6000, al medio de cultivo habitualmente a una concentración del 30% al 60% (en p/v), y después mezclando para formar las células fusionadas deseadas (hibridomas). Después, se repite el procedimiento de adición gradual de un medio de cultivo adecuado y una centrifugación para eliminar el sobrenadante, para lograr la eliminación del agente de fusión celular, etc., que es desfavorable para el crecimiento de los hibridomas.
- 10 Los hibridomas adecuados se seleccionan cultivando en un medio de cultivo de selección normal, tal como un medio de cultivo HAT (que contiene hipoxantina, aminopterina y timina). El cultivo en el medio de cultivo HAT continúa durante un tiempo dado, habitualmente de unos cuantos días a unas cuantas semanas, que es suficiente para que mueran las células que no sean hibridomas (células no fusionadas). Después se realiza una dilución limitada normal, y los hibridomas que producen los anticuerpos deseados se someten a enmascaramiento y monoclonación.
- 15 Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales preparados de esta manera pueden subcultivarse en una disolución de cultivo habitual y también pueden colocarse en nitrógeno líquido para una conservación a largo plazo.
- 20 Para adquirir los anticuerpos monoclonales de los hibridomas, los hibridomas se cultivan según un método convencional tras lo cual se recupera el sobrenadante del cultivo, o bien se utiliza un método por el que los hibridomas son inyectados en un animal mamífero compatible, se hacen crecer y se obtiene el fluido de ascitis. El primer método es adecuado para obtener anticuerpos con alta pureza, mientras que el segundo método es adecuado para la producción en masa de anticuerpos.
- 25 Los anticuerpos monoclonales obtenidos mediante estos métodos entonces pueden purificarse hasta un alto grado utilizando medios de purificación convencionales, tales como desalación, filtración en gel, cromatografía de afinidad, o similares.
- 30 Los anticuerpos monoclonales preparados de esta manera entonces pueden comprobarse para el reconocimiento de alta sensibilidad y alta pureza del antígeno por medios inmunológicos habituales, tales como un radioinmunoensayo (RIA), un inmunoensayo ligado a enzimas (EIA, ELISA), la técnica de anticuerpos fluorescentes (análisis de inmunofluorescencia), etc.
- 35 Los anticuerpos monoclonales utilizados según la invención no se limitan a anticuerpos monoclonales producidos por hibridomas, y pueden haber sido modificados de modo artificial con el objetivo de disminuir su heteroantigenicidad contra seres humanos. Por ejemplo, puede utilizarse un anticuerpo quimérico que consiste en la región variable de un anticuerpo monoclonal de un animal mamífero distinto de un ser humano, tal como un ratón, y la región constante de un anticuerpo humano, y dicho anticuerpo quimérico puede ser producido mediante un método conocido para producir anticuerpos quiméricos, en particular una técnica de recombinación génica.
- 40 También pueden utilizarse anticuerpos humanos remodelados según la invención. Estos se preparan utilizando la región determinante de la complementariedad de un ratón u otro animal mamífero no humano para sustituir la región determinante de la complementariedad de un anticuerpo humano, y los métodos de recombinación génica convencionales para ello son muy conocidos. Uno de los métodos conocidos puede utilizarse para obtener un anticuerpo humano remodelado que sea útil según la invención. Un ejemplo preferido de dicho anticuerpo humano remodelado es hPM-1 (véase la solicitud de patente no examinada internacional nº WO92-19759).
- 45 Cuando sea necesario, pueden sustituirse aminoácidos de la región de marco (FR) de la región variable de un anticuerpo, de manera que la región determinante de la complementariedad del anticuerpo humano remodelado forma un sitio de unión a anticuerpos adecuado (Sato *et al.*, Cancer Res., 53:851-856, 1993). Además, el objeto mencionado anteriormente también puede lograrse construyendo un gen que codifique un fragmento de anticuerpo que se une al antígeno para inhibir la actividad IL-6, tal como Fab o Fv, o un Fv monocatenario (scFv), en los que el Fv de las cadenas H y L se une a través de un conector apropiado, y se utiliza para la expresión en células hospedantes apropiadas (véase, por ejemplo, Bird *et al.*, TIBTECH, 9:132-137, 1991; Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988).
- 50 Una composición farmacéutica según la invención cuyo componente eficaz sea un antagonista de IL-6 es eficaz si bloquea la transducción de señales de IL-6 y suprime el crecimiento anómalo de células sinoviales inducido por IL-6, que están implicados en la enfermedad. El ejemplo 1 demuestra el efecto supresor del crecimiento *in vitro* en células sinoviales derivadas de pacientes reumáticos. En el ejemplo 2, se administró un anticuerpo del receptor de IL-6 a modelos artríticos de ratones inmunizados con el colágeno de tipo II, y los datos pertinentes demuestran (1) la supresión de la aparición de artritis basándose en el índice de artritis (figura 4), (2) la supresión de la producción de anticuerpos de anti-colágeno de tipo II en la sangre de ratones inmunizados con colágeno (figura 5), y (3) la supresión de la invasión de tejido de granulación hacia el cartílago y el hueso (sinovitis proliferativa crónica) en las articulaciones de las patas traseras de modelos de ratones artríticos a los que se les administra anticuerpo del receptor de IL-6 (figura 6).
- 55 Con respecto a los anteriores (1) y (2), los resultados confirman un efecto supresor por el anticuerpo del receptor de

IL-6, en especial inicialmente, sobre la aparición de la artritis en modelos animales. Los resultados de (3) demuestran que se suprime la invasión de tejido de granulación hacia el tejido cartilaginoso y óseo, y esto apoya los resultados obtenidos en el ejemplo 1 (inhibición *in vitro* del crecimiento de células sinoviales).

5 Los resultados experimentales de (1) y (2) indican que la composición farmacéutica de la presente invención tiene un excelente efecto inicial. La composición farmacéutica de la invención se administra preferiblemente por vía parenteral, por ejemplo mediante inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea, de forma sistémica o local. Además, puede estar en forma de un kit de formulación médica junto con al menos un tipo de vehículo o diluyente médico.

10 La dosificación de la composición farmacéutica de la invención, cuando se administra a seres humanos, será diferente del trastorno patológico y de la edad del paciente, y de la vía de administración, y por tanto deben seleccionarse dosis adecuadas y apropiadas. Por ejemplo, puede seleccionarse un máximo de 4 dosis divididas en el intervalo de aproximadamente 1 a 1000 mg/paciente. Sin embargo, la composición farmacéutica de la invención no se limita a estas dosificaciones.

15 La composición farmacéutica de la invención puede formularse según métodos convencionales. Por ejemplo, se prepara una formulación en inyección disolviendo el antagonista de IL-6 purificado en un disolvente, tal como disolución salina fisiológica o una disolución tampón, y después añadiendo un inhibidor de la absorción, tal como Tween 80, gelatina, albúmina de suero humana (HSA) o similares, y la mezcla puede liofilizarse antes de su uso para la reconstitución en disolución. El excipiente utilizado para la liofilización puede ser un alcohol de azúcar, tal como manitol, o glucosa o un sacárido.

20 Ejemplos

La presente invención se explicará a continuación con más detalle mediante los siguientes ejemplos, ejemplos de referencia y ejemplos experimentales, entendiéndose que la invención no se limita de ninguna manera a estos.

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

25 Se preparó el IL-6R soluble (Yasukawa *et al.*, J. Biochem., 108:673-676, 1990) mediante el método de PCR (reacción en cadena de polimerasa) utilizando el plásmido pBSF2R.236 que contiene ADNc que codifica el receptor de IL-6 (IL-6R) humano obtenido según el método de Yamasaki *et al.* (Science, 241:825-828, 1988).

30 El plásmido mencionado pBSF2R.236 se digirió con la enzima de restricción SphI para obtener un fragmento de ADNc de IL-6R que entonces se insertó en mp18 (Amersham Co.). Se empleó el oligocebador sintético ATATTCTCTAGAGAGATTCT, diseñado para la introducción de un codón de fin en el ADNc de IL-6R, para introducir una mutación en el ADNc de IL-6R mediante el método de PCR utilizando un sistema de mutagénesis *in vitro* (Amersham Co.). Este procedimiento da como resultado la introducción de un codón de fin en la posición del aminoácido 345 para obtener ADNc que codifica el IL-6R soluble (sIL-6R).

35 Para expresar el ADNc de sIL-6R en células CHO, el mencionado ADNc de sIL-6R cortado con HindIII-Sall se insertó en el plásmido pECEdhfr (Clauser *et al.*, Cell, 45:721-735, 1986) que tiene un ADNc que codifica la dihidrofolato reductasa (dhfr) insertado en el sitio de ruptura de la enzima de restricción PvuI, para obtener el plásmido de expresión en células CHO pECEdhfr344.

Se emplearon 10 µg del plásmido pECEdhfr344 para la transfección de la línea celular dhfr⁺CHO DXB-11 (Urland *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216-4220, 1980) mediante el método de precipitación de fosfato de calcio (Chen *et al.*, Mol. Cell. Biol., 7:2745-2751, 1987).

40 Las células CHO transfectadas se cultivaron durante 3 semanas en un medio de cultivo selectivo αMEM sin nucleósidos que contenía glutamina 1 mM, suero de ternera fetal dializado al 10% (FCS), penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml. Las células CHO seleccionadas se seleccionaron mediante el método de dilución limitante, y se obtuvo una única línea de células CHO monoclonal. El clon de células CHO se amplificó en metotrexato (MTX) de concentración 20 nM a 200 nM, para obtener la línea de células CHO productora de sIL-6R humano 5E27.

45 La línea de células CHO 5E27 se cultivó en medio de Dulbecco modificado de Iscove (IMDM, producto de Gibco Co.) que contenía FCS al 5%, se recuperó el sobrenadante del cultivo, y se midió la concentración de sIL-6R en el sobrenadante del cultivo mediante el método ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas) según el procedimiento habitual.

50 Ejemplo de referencia 2. Preparación del anticuerpo de IL-6 humana

Se preparó un anticuerpo de IL-6 humana según el método de Matsuda *et al.* (Eur. J. Immunol., 18:951-956, 1988).

Se inmunizaron ratones BALB/c con 10 µg de IL-6 recombinante (Hirano *et al.*, Immunol. Lett., 17:41, 1988) junto con adyuvante completo de Freund, y esto continuó una vez a la semana hasta que se detectaron anticuerpos anti-

IL-6 en el suero sanguíneo.

Se extrajeron inmunocitos de los nódulos linfáticos locales y se empleó polietilenglicol 1500 para la fusión con la línea celular de mieloma P3U1. Los hibridomas se seleccionaron según el método de Oi *et al.* (Selective Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) utilizando un medio de cultivo HAT, y se estableció una línea de hibridoma productora de anticuerpos de IL-6 humana. El hibridoma productor de anticuerpos de IL-6 humana se sometió a un ensayo de unión a IL-6 de la siguiente manera.

De modo específico, una microplaca de 96 pocillos de polivinilo blando (producto de Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA) se revistió durante la noche con 100 μ l de anticuerpo anti-Ig de ratón de cabra (10 μ l/ml, producto de Cooper Biomedical, Inc., Malvern, PA) en una disolución tampón de carbonato-bicarbonato 0,1 M (pH 9,6) a 4 °C. La placa entonces se trató durante 2 horas a temperatura ambiente con PBS que contiene 100 μ l de albúmina de suero bovino al 1% (BSA). Después de lavar con PBS se añadieron 100 μ l del sobrenadante del cultivo de hibridoma a cada pocillo, y se realizó una incubación durante la noche a 4 °C.

Las placas entonces se lavaron y se añadió IL-6 recombinante marcada con 125 I a cada pocillo hasta 2000 cpm/0,5 ng/pocillo, y después de lavar se midió la radiactividad de cada pocillo con un contador gamma (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA). De los 216 clones de hibridoma, 32 clones de hibridoma fueron positivos para el ensayo de unión de IL-6. Entre estos clones se obtuvo finalmente el clon estable MH166.BSF2. El anticuerpo de IL-6 MH166 producido por este hibridoma tiene un subtipo IgG1K.

La línea celular de hibridoma de ratón dependiente de IL-6 MH60.BSF2 (Matsuda *et al.*, Eur. J. Immunol., 18:951-956, 1988) entonces se utilizó para determinar la actividad neutralizante del anticuerpo MH166 sobre el crecimiento del hibridoma. Se dispensaron células MH60.BSF2 a una cantidad de $1 \times 10^4/200$ μ l/pocillo, se le añadió una muestra que contenía anticuerpo MH166, se realizó el cultivo durante 48 horas, y se añadieron 15,1 Ci/mmol de 3 H-timidina (New England Nuclear, Boston, MA), tras lo cual el cultivo continuó durante 6 horas.

Las células se colocaron sobre un papel de filtro de vidrio y se trataron con un recolector automático (Labo Mash Science Co., Tokio, Japón). Se utilizó anticuerpo anti-IL-6 de conejo como control. Como resultado, el anticuerpo MH166 inhibe la captación de 3 H-timidina por las células MH60.BSF2 de una manera dependiente de la dosis. Esto demuestra que el anticuerpo MH166 neutraliza la actividad IL-6.

Ejemplo de referencia 3. Preparación de un anticuerpo del receptor de IL-6 humana

El anticuerpo anti-IL-6R MT18 construido mediante el método de Hirata *et al.* (J. Immunol., 143:2900-2906, 1989) se unió a Sepharose 4B (producto de Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) activado con CNBr, según las instrucciones adjuntas, y el complejo unido se utilizó para purificar IL-6R (Yamasaki *et al.*, Science, 241:825-828, 1988).

La línea celular de mieloma humano U266 se solubilizó con clorhidrato de sulfoni fluoruro de p-paraaminofenilmetano 1 mM (producto de Wako Chemicals) que contenía digitonina al 1% (producto de Wako Chemicals), trietanolamina 10 mM (pH 7,8) y NaCl 0,15 M (disolución tampón de digitonina), y se mezcló con anticuerpo MT18 unido a esferas de Sepharose 4B. Las esferas entonces se lavaron 6 veces con disolución tampón de digitonina para obtener IL-6R parcialmente purificado para la inmunización.

Se inmunizaron ratones BALB/c 4 veces cada 10 días con el IL-6R parcialmente purificado obtenido de 3×10^9 células U266, y después se prepararon hibridomas mediante métodos convencionales. Los sobrenadantes del cultivo de los hibridomas procedentes de pocillos de crecimiento positivo se examinaron para la actividad de unión a IL-6 mediante el siguiente método. Después de marcar 5×10^7 células U266 con 35 S-metionina (2,5 mCi), se solubilizaron con la disolución tampón de digitonina mencionada anteriormente. Las células U266 solubilizadas se mezclaron con 0,04 ml de anticuerpo MT18 unido a esferas de Sepharose 4B, y después de lavar 6 veces con disolución tampón de digitonina, el IL-6R marcado con 35 S-metionina se retiró mediante un lavado con 0,25 ml de disolución tampón de digitonina (pH 3,4) y se neutralizó con 0,025 ml de Tris 1 M (pH 7,4).

Se mezclaron 0,05 ml del sobrenadante del cultivo de hibridoma con 0,01 ml de proteína G-Sepharose (producto de Pharmacia). Después de lavar, el Sepharose se incubó con 0,005 ml de la disolución de IL-6R marcado con 35 S preparada antes. La sustancia inmunoprecipitada se analizó mediante SDS-PAGE, y se estudiaron los sobrenadantes del cultivo de hibridoma que reaccionan con IL-6R. Como resultado, se estableció un clon de hibridoma positivo a la reacción PM-1. El anticuerpo de IL-6R PM-1 producido por el hibridoma PM-1 tiene el subtipo IgG1K.

La actividad inhibidora del anticuerpo producido por el hibridoma PM-1 frente a la unión de IL-6 al IL-6R humano se investigó utilizando la línea celular de mieloma humano U266. Se preparó IL-6 recombinante humana con *E. coli* (Hirano *et al.*, Immunol. Lett., 17:41, 1988) y reactivo de Bolton-Hunter marcado con 125 I (New England Nuclear, Boston, MA) (Taga *et al.*, J. Exp. Med., 166:967, 1987).

Se cultivaron 4×10^5 células U266 a temperatura ambiente en presencia de un exceso en 100 veces de IL-6 no

marcada durante una hora, junto con 70% (en v/v) de sobrenadante del cultivo de hibridoma PM-1 y 14000 cpm de IL-6 marcada con ^{125}I . Se extendió una muestra de 70 μl sobre 300 μl de FCS colocados en un tubo de polietileno de microcentrifuga de 400 μl , y después de una centrifugación se midió la radiactividad sobre las células.

Como resultado se demostró que los anticuerpos producidos por el hibridoma PM-1 inhibían la unión de IL-6 a IL-6R.

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

Se prepararon anticuerpos monoclonales contra el receptor de IL-6 mediante el método descrito en la solicitud de patente japonesa n° 6-134617.

10 Siguiendo el método de Saito *et al.* (J. Immunol., 147, 168-173, 1993), se cultivaron células CHO que producen el receptor de IL-6 soluble de ratón en medio IMDM que contenía FCS al 10%, y el receptor de IL-6 soluble de ratón se purificó del sobrenadante del cultivo utilizando el anticuerpo del receptor de IL-6 soluble de ratón RS12 (véase *ibid.* Saito *et al.*) y un gel Affigel 10 inmovilizante de columna de afinidad (Biorad).

15 Se mezclaron 50 μg del receptor de IL-6 soluble de ratón obtenido con adyuvante completo de Freund y se inyectaron por vía intraperitoneal en ratas Wistar (Nihon Charles River Co.). Se administraron inmunizaciones de refuerzo con adyuvante incompleto de Freund después de 2 semanas. En el día 45^o se sacrificaron las ratas y se emplearon aproximadamente 2×10^8 células esplénicas para la fusión celular con 1×10^7 células de mieloma P3U1 de ratón mediante un método convencional utilizando PEG1500 al 50% (Berlinger Mannheim), tras lo cual los hibridomas se seleccionaron con medio HAT.

20 Tras añadir los sobrenadantes del cultivo de hibridoma a una inmunoplaaca revestida con anticuerpo anti-IgG de rata de conejo (Cappel Co.), el receptor de IL-6 soluble de ratón se hizo reaccionar con estos y se seleccionaron los hibridomas que producen anticuerpos contra el receptor de IL-6 soluble de ratón mediante el método ELISA utilizando un anticuerpo anti-receptor de IL-6 de ratón de conejo y anti-IgG de conejo de oveja marcado con fosfatasa alcalina. Los clones de hibridoma en los que se confirmó la producción de anticuerpos se sometieron a una subselección dos veces para obtener un único clon de hibridoma. Este clon se denominó MR16-1.

25 La actividad neutralizante del anticuerpo producido mediante este hibridoma contra la transducción de señales de IL-6 de ratón se investigó mediante la incorporación de ^3H -timidina utilizando células MH60.BSF2 (Matsuda *et al.*, J. Immunol., 18, 951-956, 1988). Se añadieron células MH60.BSF2 a una placa de 96 pocillos a 1×10^4 células/200 μl /pocillo, y después se añadió IL-6 de ratón (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y anticuerpo MR16-1 o anticuerpo RS12 a 12,3-1000 ng/ml antes de cultivar a 37 °C, en CO_2 al 5% durante 44 horas, tras lo cual se añadió ^3H -timidina (1 $\mu\text{Ci}/\text{pocillo}$) y se midió la captación después de 4 horas. Como resultado, se descubrió que el anticuerpo MR16-1 inhibe la captación de ^3H -timidina por las células MH60.BSF2.

30 **Experimento 1. Establecimiento de una línea de células sinoviales derivadas de la artritis reumatoide crónica**

(1) Preparación de células sinoviales

35 Se obtuvo tejido sinovial durante una operación quirúrgica en la articulación de un paciente con artritis reumatoide crónica. El tejido sinovial se picó con tijeras y después se sometió a una disociación enzimática mediante una incubación durante una hora a 37 °C con 5 mg/ml de colagenasa de tipo I (producto de Sigma Chemical Co.) y 0,15 mg/ml de ADNasa pancreática bovina (producto de Sigma Chemical Co.) en IMDM (medio de Dulbecco modificado de Iscove), y se hizo pasar a través de un tamiz para obtener células individuales. Estas células obtenidas entonces se cultivaron durante la noche en un matraz de cultivo utilizando IMDM que contenía FCS al 5%, tras lo cual las células no adherentes se retiraron para obtener las células sinoviales. Se realizaron 3 a 6 transferencias con las células sinoviales y se utilizaron en el siguiente experimento.

(2) Producción de IL-6 por las células sinoviales

45 Las células sinoviales obtenidas como se describió anteriormente se suspendieron en medio de cultivo IMDM que contenía FCS al 5% (producto de Hyclone Laboratories Inc.), 10 U/ml de penicilina G, y estreptomycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a una cantidad de 3×10^3 células/pocillo, y después se cultivaron en una placa de microvaloración de 96 pocillos (producto de Falcon Co.), a la que se le añadió interleuquina-1 β (IL-1 β) humana, factor de necrosis tumoral α (TNF α) humano, factor del crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) AB humano y factor del crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) humano, a unas concentraciones de 0,01 o 0,1, 0,1 o 1, 1 o 10, y 1 o 10 ng/ml , respectivamente, y tras cultivar a 37 °C durante 72 horas se recogieron los sobrenadantes del cultivo.

50 Se añadieron 100 μl de anticuerpo anti-IL-6 humana MH166 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) a una placa de ELISA de 96 pocillos (Immunoplate, producto de Nunc Co.) y se incubó a 4 °C durante 24 horas. Cada pocillo posteriormente se lavó con PBS que contenía Tween20 al 0,05%, y se bloqueó a 4 °C durante la noche con PBS que contenía BSA al 1%. Los sobrenadantes del cultivo obtenidos previamente entonces se diluyeron con PBS que contenía BSA al 1%, se añadieron a los pocillos, y después se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavar con PBS que contenía Tween20 al 0,05%, se añadieron 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de anticuerpo anti-IL-6 humana policlonal de conejo

purificado con una columna de proteína A de 100 µl (producto de Pharmacia).

Después de incubar a temperatura ambiente durante 2 horas, el anticuerpo anti-IL-6 policlonal de conejo unido a IL-6 en los sobrenadantes del cultivo se hace reaccionar con un anticuerpo anti-IgG de conejo unido a fosfatasa alcalina (producto de Tago Co.), y después se añadió 1 mg/ml de sustrato de fosfatasa alcalina Sigma104 (producto de Sigma Co.) según las instrucciones adjuntas, y se midió la absorbancia a 405-600 nm con un lector de microplacas MPR A4 (producto de Tosoh Co.).

Se prepararon curvas de calibración para la IL-6 recombinante durante cada ensayo para la conversión de los valores de DO de absorbancia a concentraciones de IL-6 humana. Los resultados se ofrecen en la tabla 1.

Tabla 1. Producción de IL-6 aumentada de células sinoviales

Tratamiento (ng/ml)	IL-6 (ng/ml)
No tratadas	0,096 ± 0,012
IL-1β	0,01
	0,1
	6,743 ± 0,178
	17,707 ± 0,259
TNFα	0,1
	1
	0,575 ± 0,008
	1,688 ± 0,034
PDGF-AB	1
	10
	0,163 ± 0,035
	0,165 ± 0,016
bFGF	1
	10
	0,181 ± 0,009
	0,230 ± 0,019

Nota: Las células sinoviales se cultivaron durante 3 días con IL-1β, TNFα, PDGF-AB o bFGF. Después del cultivo, las concentraciones de IL-6 de los sobrenadantes se midieron mediante ELISA.

Los resultados demuestran que IL-1β estimula en gran medida la producción de IL-6 por las células sinoviales.

Ejemplo 1

(1) Las células sinoviales obtenidas en el experimento 1 (3×10^3 /pocillo) se suspendieron en medio de cultivo IMDM que contenía FCS al 5% (producto de Hyclone Laboratories, Inc.), 10 U/ml de penicilina G, y 100 µg/ml de estreptomycin, y después se añadieron a una placa de microvaloración de 96 pocillos (nº 3072, producto de Falcon Co.) y se cultivaron durante 5 días en presencia de diversas concentraciones de IL-6 sola, de sIL-6R solo, o en presencia de ambos IL-6 y sIL-6R. A las 72 horas después de comenzar a cultivar se añadió ³H-timidina (producto de Amersham International plc) a cada pocillo a 1 µCi/pocillo, y después de completar el cultivo se midió la radiactividad en las células con un contador de centelleo. Los resultados se muestran en la figura 1.

Como resultado, la captación de ³H-timidina de las células sinoviales fue baja con IL-6 sola o con sIL-6R solo, y no se observó crecimiento de las células sinoviales. En contraste, en presencia de al menos una concentración de 10 ng/ml de IL-6 y una concentración 100 ng/ml de sIL-6R, se observó una captación significativa de ³H-timidina comparado con el grupo control. Así, aunque no apareció apenas un efecto de crecimiento en las células sinoviales con IL-6 sola, en presencia de ambos IL-6 y sIL-6R se produjo claramente un poderoso efecto de crecimiento de las células sinoviales.

(2) Se cultivaron células sinoviales (3×10^3 /pocillo) en presencia de una cantidad suficiente de IL-β para producir IL-6 (0,1 ng/ml), 100 ng/ml de sIL-6R y 25 µg/ml de anticuerpo de IL-6 o 25 µg/ml de anticuerpo de IL-6R. A las 72 horas después de iniciar el cultivo, se añadió ³H-timidina a cada pocillo hasta 1 µCi/pocillo, y después de completar el cultivo se midió la radiactividad en las células con un contador de centelleo. Los resultados se muestran en la figura 2. La adición de un anticuerpo de IL-6 o de un anticuerpo de IL-6R suprime completamente el crecimiento de células sinoviales aumentado por sIL-6R.

(3) Se cultivaron células sinoviales (3×10^3 /pocillo) en presencia de 100 ng/ml de IL-6 (producto de Genzyme Co.), 100 ng/ml de sIL-6R y 25 µg/ml de anticuerpo de IL-6 o de anticuerpo de IL-6R, que se obtuvieron en los ejemplos de referencia mencionados anteriormente. A las 72 horas después del inicio del cultivo, se añadió ³H-timidina a cada pocillo hasta 1 µCi/pocillo, y después de completar el cultivo se midió la radiactividad en las células con un contador de centelleo. Los resultados se muestran en la figura 3. La adición del anticuerpo de IL-6 o del anticuerpo del IL-6R suprime completamente el crecimiento de células sinoviales aumentado por sIL-6R.

Ejemplo 2

Se investigó el efecto supresor del anticuerpo del receptor de IL-6 sobre la aparición de la artritis utilizando un modelo de artritis de ratón.

5 Una disolución de colágeno de tipo II bovino (Collagen Technology Research Group) (4 mg/ml) disuelta en una disolución de ácido acético acuosa 0,1 N y adyuvante completo H37Ra (DIFCO) se mezclaron en cantidades equivalentes para preparar un adyuvante. Se inyectaron por vía subcutánea 100 µl del adyuvante en la base de la cola de ratones DBA/1J hembras de 8 a 9 semanas de edad (Charles River Japón). Se inyectaron 100 µl más 20 días después bajo la piel dorsal para inducir la artritis.

10 Se administró por vía intravenosa el anticuerpo del receptor de IL-6 de ratón MR16-1 a 2 mg por ratón tras la primera sensibilización con colágeno, y cada ratón recibió una inyección por vía subcutánea de 0,5 mg más (n = 5) cada semana a partir de entonces durante 7 semanas. Como control se utilizó el anticuerpo anti-DNP KH-5 (Chugai Seiyaku) del mismo isotipo (n = 5).

Se evaluó la gravedad de la artritis basándose en un índice de artritis. La evaluación se basó en una escala de 4 puntos para cada extremidad, con un total de 16 puntos por individuo. La pauta de evaluación fue la siguiente:

15 0,5: Eritema observado en un sitio de la articulación.

1: Eritema observado en dos sitios de la articulación, o enrojecimiento pero sin hinchamiento del dorso del pie.

2: Hinchamiento moderado observado.

3: Hinchamiento grave del dorso del pie, pero no alcanza a todos los dedos.

4: Hinchamiento grave del dorso del pie y de los dedos.

20 Los resultados se muestran en la figura 4. La aparición de la artritis desde una etapa temprana de artritis fue evidentemente suprimida en el grupo al que se le administra el anticuerpo del receptor de IL-6, comparado con el grupo al que se le administra el anticuerpo control.

25 Por otra parte, los resultados de la medición de la titulación de anticuerpos anti-colágeno de tipo II en la sangre de los ratones mostró una reducción significativa desde la artritis en etapa temprana en el grupo al que se le administra el anticuerpo del receptor de IL-6, comparado con el grupo al que se le administra el anticuerpo control (figura 5).

30 Los ratones se sacrificaron en el día 35 después de la inmunización con colágeno, y las patas traseras se fijaron con formaldehído al 20%. Después se sometieron a una desmineralización en una disolución de EDTA (pH 7,6) y una deshidratación con alcohol. Posteriormente se envolvieron en parafina y se cortaron en secciones de 2 µm de espesor. Las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina, y se observaron bajo un aumento de 125x (figura 6). Como resultado, la invasión del tejido de granulación hacia el cartílago y el hueso, es decir, la sinovitis proliferativa crónica, fue suprimida en el grupo al que se le administra el anticuerpo del receptor de IL-6, comparado con el grupo al que se le administra el anticuerpo control.

35 La IL-6 es una citoquina que induce la diferenciación de células B en células productoras de anticuerpos. La IL-6 también estimula la proliferación de células sinoviales en presencia del receptor de IL-6. Puesto que en los modelos de artritis por colágeno de ratón, el anticuerpo anti-receptor de IL-6 suprime significativamente las titulaciones de anticuerpos anti-colágeno de tipo II en los días 21 y 35 después de la sensibilización con colágeno, comparado con el grupo al que se le administra el anticuerpo control, se cree que la inhibición de la producción de anticuerpos por el anticuerpo anti-receptor de IL-6 es un factor responsable del efecto supresor sobre la artritis. Además, aunque no se observó supresión de la producción de anticuerpos a partir del 49º día después de la sensibilización con colágeno, debido al hecho de que se observa un efecto supresor adecuado sobre la aparición de la artritis incluso durante este periodo, y de que la tinción con HE del tejido que rodea el hueso del tarso muestra la supresión de la invasión del tejido de granulación hacia el cartílago y el hueso en el grupo al que se le administra el anticuerpo del receptor de IL-6, comparado con el grupo control, también se cree que el efecto supresor del crecimiento sinovial contribuye al efecto inhibidor de la artritis.

45 **Aplicabilidad industrial**

Las células sinoviales procedentes de pacientes con artritis reumatoide crónica proliferan en presencia de IL-6 y de sIL-6R. El hecho de que el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoide crónica contiene una cantidad suficiente de IL-6 y sIL-6R para inducir el crecimiento de células sinoviales sugiere que la transducción de señales por IL-6 está implicada en el crecimiento anómalo de las células sinoviales en la artritis reumatoide crónica.

50 Por tanto, se ha demostrado de modo concluyente que una terapia para la artritis reumatoide crónica cuyo componente eficaz sea un antagonista de IL-6 según la presente invención suprime el crecimiento de células sinoviales en pacientes con artritis reumatoide crónica en presencia de IL-6 y sIL-6R y, por tanto, tiene un efecto

terapéutico frente a la artritis reumatoide crónica. Por consiguiente, el antagonista de IL-6 de la invención es útil como agente terapéutico para la artritis reumatoide crónica en la que se produce un crecimiento anómalo de las células sinoviales.

REIVINDICACIONES

- 1.- El uso de un antagonista de interleuquina-6 para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir el crecimiento anómalo de células sinoviales, en el que el antagonista de interleuquina es un anticuerpo humanizado contra un receptor de interleuquina-6 humano.
- 5 2.- El uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo humanizado contra un receptor de interleuquina-6 humano es un PM-1 humanizado.
- 3.- Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo humanizado contra un receptor de interleuquina-6 para su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide crónica.

Fig.1

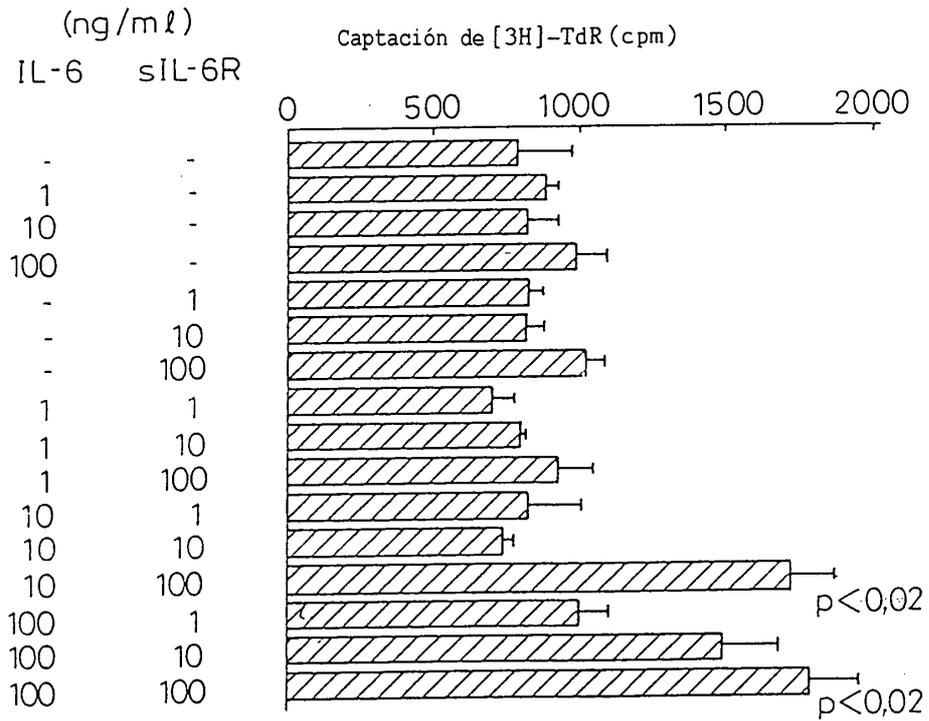


Fig. 2

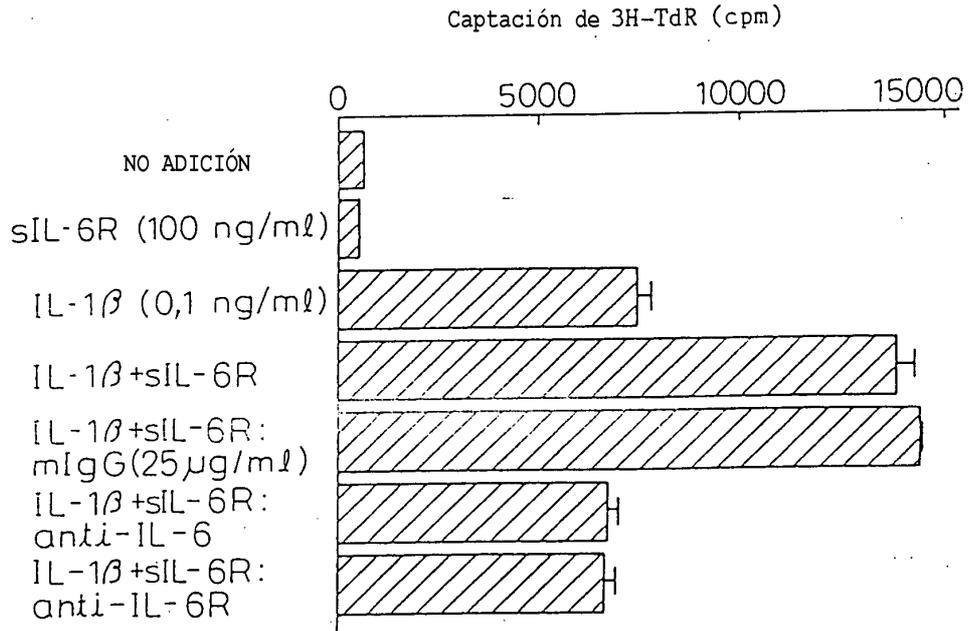


Fig.3

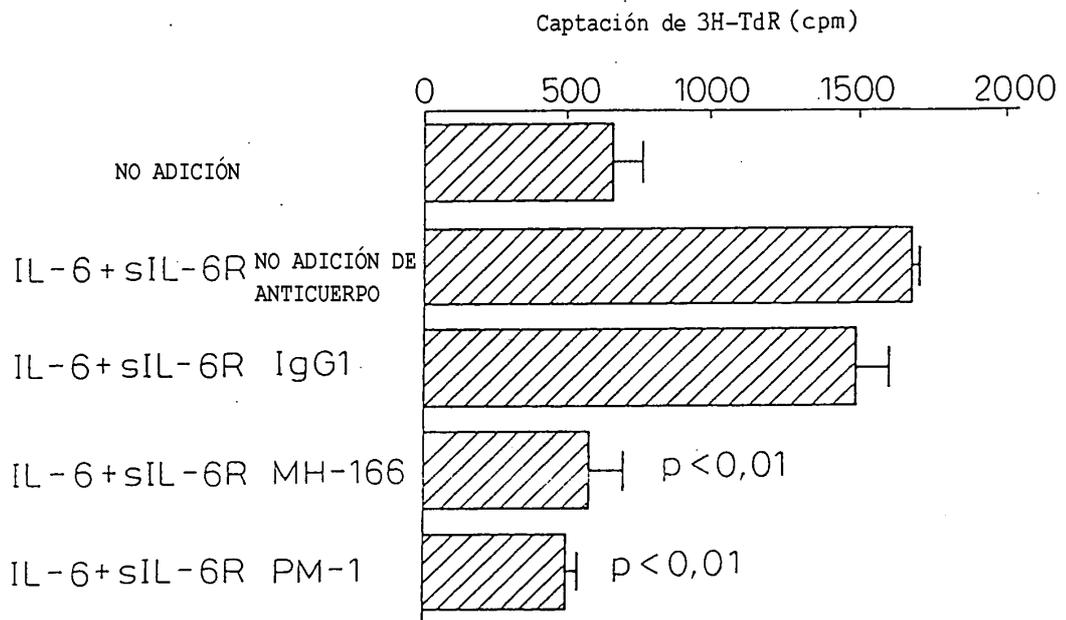


Fig.4

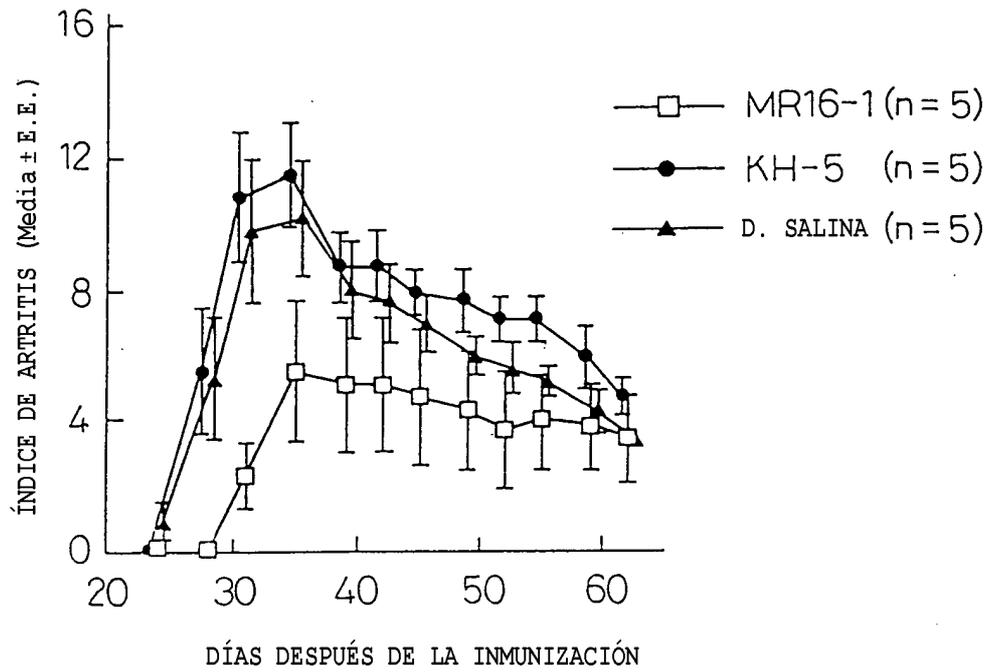


Fig. 5

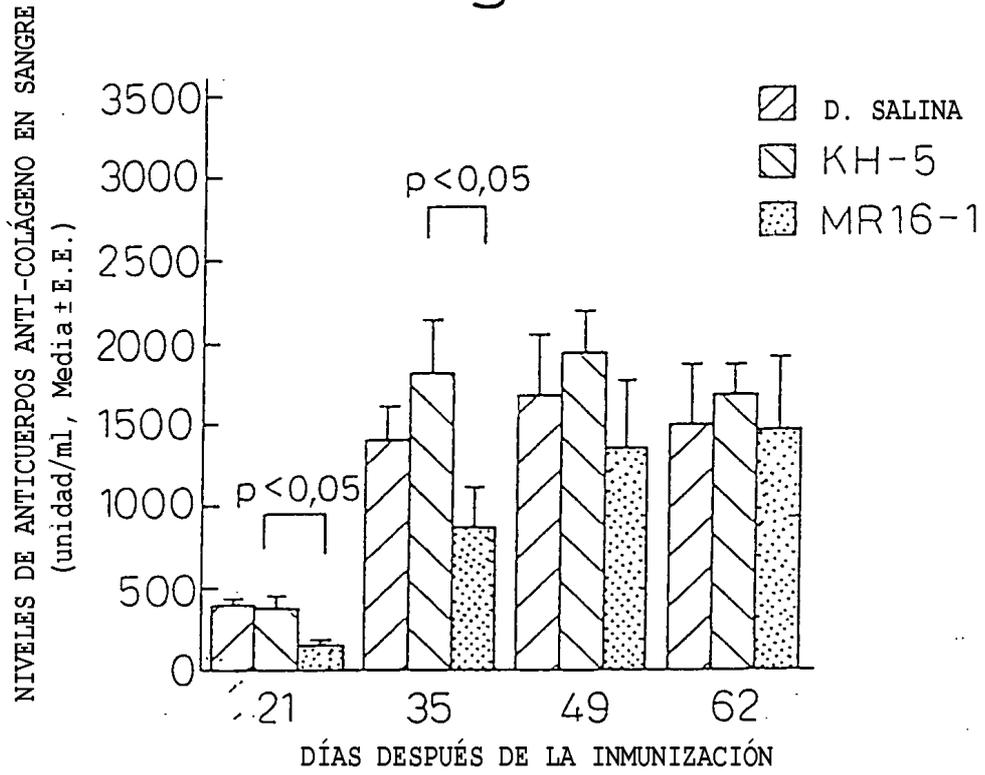
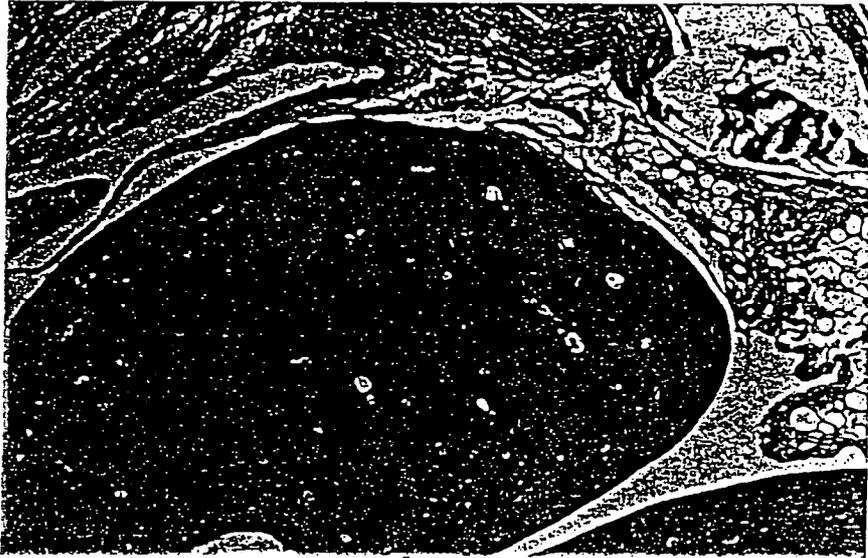


Fig. 6
(a)



(b)

