

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 824**

51 Int. Cl.:

**A61K 45/06** (2006.01)

**C07K 16/24** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04792816 .3**

96 Fecha de presentación: **15.10.2004**

97 Número de publicación de la solicitud: **1690550**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2006**

54 Título: **Agente terapéutico contra el mesotelioma**

30 Prioridad:

**17.10.2003 JP 2003358152**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**14.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**14.12.2012**

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)  
5-1, UKIMA 5-CHOME, KITA-KU  
TOKYO, 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

**NISHIMOTO, NORIHIRO;  
KISHIMOTO, TADAMITSU;  
ADACHI, YASUO y  
TAKAYAMA, KOICHI**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 392 824 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

Agente terapéutico contra el mesotelioma.

**Campo técnico**

5 El presente invento se refiere a un nuevo agente terapéutico para el mesotelioma e inhibidor de células de mesotelioma.

**Técnica fundamental**

10 El mesotelioma es un tumor que aparece en el mesotelio que cubre la superficie de la pleura, el peritoneo y el pericardio, que envuelven respectivamente los órganos de la cavidad torácica, tales como los pulmones y el corazón, y órganos abdominales tales como el tracto digestivo y el hígado. En el caso del mesotelioma pleural difuso, el dolor torácico es causado por la invasión de los nervios intercostales por el lado de la pleura de la pared torácica, y se pueden presentar trastornos respiratorios y circulatorios a causa del crecimiento tumoral y de la acumulación de líquido pleural en la pleura por el lado del órgano [Takagi, Journal of Clinical and Experimental Medicine (suplemento de marzo), "Respiratory Diseases", páginas 469-472, 1999]. Hay finalmente una proliferación en los órganos mediastínicos adyacentes, que progresa hasta la invasión directa del corazón o el desarrollo en la cavidad abdominal por medio del diafragma, o puede haber desarrollo fuera de la cavidad torácica como resultado de una metástasis linfática o circulatoria adicional (ibídem).

15 Se ha comunicado que en los EE.UU. aparecen al año 3000 personas con mesotelioma pleural difuso, casos que empezaron a aumentar notablemente en los años 1980 y que se observan frecuentemente en hombres de más de sesenta años, siendo la incidencia en hombres aproximadamente cinco veces mayor que en mujeres [Takagi, Journal of Clinical and Experimental Medicine (suplemento de marzo), "Respiratory Diseases", páginas 469-472, 1999]. De acuerdo con informes recientes en EE.UU. y Europa, la incidencia del mesotelioma está presentando una tendencia rápidamente creciente, y, basándose en estadísticas epidemiológicas del Reino Unido en 1995, se prevé que el número de muertes por mesotelioma continúe aumentando a lo largo de los próximos 25 años, y, en el peor escenario posible, existe el riesgo de que llegue a representar el 1% de todas las muertes entre los hombres nacidos en los años 1940 (Nakano, Respiration, volumen 18, nº 9, páginas 916-925, 1999).

20 Se han utilizado numerosas clasificaciones diferentes de las fases morbosas clínicas para el mesotelioma y, puesto que los métodos usados para clasificar la fase morbosa difieren, los informes terapéuticos previos sobre el mesotelioma han encontrado dificultades a la hora de comparar los resultados de un tratamiento (Nakano, Respiration, volumen 18, nº 9, páginas 916-925, 1999). Una clasificación TNM internacional para el mesotelioma pleural maligno en 1995 por el International Mesothelioma Interest Group (IMIG) (Nakano, Respiration, volumen 18, nº 9, páginas 916-925, 1999).

35 Además, el mesotelioma maligno presenta una relación causativa con la exposición al asbesto, y esto ha sido también demostrado en experimentos con animales [Tada, Journal of Clinical and Experimental Medicine (suplemento de marzo), "Respiratory Diseases", páginas 406-408, 1999]. El asbesto que ha sido inhalado por el tracto respiratorio alcanza una posición directamente debajo de la pleura, donde se desarrolla finalmente un tumor debido a la irritación crónica durante al menos aproximadamente 20 años, y este tumor se extiende en forma de capa delgada sobre la superficie completa de la pleura [Takagi, Journal of Clinical and Experimental Medicine (suplemento de marzo), "Respiratory Diseases", páginas 469-472, 1999]. En consecuencia, aunque el mesotelioma maligno es clasificado como una enfermedad relacionada con el asbesto, no todos los mesoteliomas malignos son causados por el asbesto y sólo se observa una exposición bien documentada en aproximadamente la mitad de todos los pacientes [Tada, Journal of Clinical and Experimental Medicine (suplemento de marzo), "Respiratory Diseases", páginas 406-408, 1999].

45 El mesotelioma pleural maligno es resistente al tratamiento, se asocia con un pronóstico sumamente malo y requiere que se tomen inmediatamente contramedidas (Nakano, Respiration, volumen 18, nº 9, páginas 916-925, 1999). Por ejemplo, aunque el metotrexato (MTX), un antagonista del ácido fólico, presenta un índice de eficacia satisfactorio del 37% en un solo tratamiento con grandes dosis en combinación con leucovina, su uso no se ha generalizado debido a la dificultad técnica asociada con la aplicación al mesotelioma, que causa la retención de una gran cantidad de líquido pleural [Nakano, Journal of Clinical and Experimental Medicine (suplemento de marzo), "Respiratory Diseases", páginas 570-573, 2003]. Además, aunque se llevan a cabo escisiones pleuropulmonares y pleurectomías para el mesotelioma pleural difuso, hay una susceptibilidad aumentada a una recaída después del tratamiento y, en particular, el índice de recaídas locales posquirúrgicas es elevado, de 35-43% [Takagi, Journal of Clinical and Experimental Medicine (suplemento de marzo), "Respiratory Diseases", páginas 469-472, 1999].

55 Se sabe que numerosas líneas celulares de mesotelioma humano y varias líneas celulares de mesotelioma de ratón expresan IL-6 in vitro y se ha comunicado que, en ratones a los que se ha trasplantado la línea celular AB22 de mesotelioma de ratón, que expresa un nivel elevado de IL-6, se detecta IL-6 en el suero antes del desarrollo de células cancerosas, síntomas clínicos y cambios en tejido con linfocitos de sangre periférica (Bielefeldt-Ohmann, Cancer Immunol. Immunother. 40: 241-250, 1995). Además, los niveles séricos de IL-6 en pacientes con mesotelioma pleural maligno son mayores en comparación con los niveles en pacientes con adenoma pulmonar complicado

- 5 con efusión pleural, y, con respecto a la trombocitosis, que es uno de los síntomas clínicos del mesotelioma pleural maligno, se sabe que hay una notable correlación entre los niveles séricos de IL-6 y los recuentos de plaquetas (Nakano, British Journal of Cancer 77 (6): 907-912, 1998). Además, las células tumorales de los pacientes con mesotelioma pleural expresan niveles elevados de IL-6, y se ha comunicado que los niveles de IL-6 en el suero aumentan antes de la muerte (Higashihara, Cancer, 15 de octubre de 1992, volumen 70, nº 8, páginas 2105-2108).
- 10 Como resultado de administrar anticuerpo (6B4) de rata anti-IL-6 de ratón a ratones a los que se había trasplantado AB22 al ritmo de dos veces a la semana, Bielefeldt-Ohmann et al. informaron de que se observaron efectos que disminuían considerablemente el inicio y el progreso de los síntomas clínicos (Bielefeldt-Ohmann, Cancer Immunol. Immunother. 40: 241-250, 1995). Sin embargo, de acuerdo con un informe de Bielefeldt, el anticuerpo anti-IL-6 no ejerce un efecto inhibitorio directo sobre el crecimiento de AB22 in vitro, no se observaron diferencias en los aspectos post mórtem entre los ratones tratados con anticuerpo anti-IL-6 y aquellos no tratados con dicho anticuerpo, y se observaron masas tumorales de considerable tamaño incluso en los ratones tratados (Bielefeldt-Ohmann, Cancer Immunol. Immunother. 40: 241-250, 1995).
- 15 Monti et al., Cancer Research, volumen 54, nº 16, 4419-4423, 1994, informan de que la adición de mAb anti-IL-6 neutralizante en elevadas concentraciones no afecta a la proliferación de líneas celulares de mesotelioma humano.
- Naka et al., Arthritis Res. 2002, 4 (supl. 3), S233-S242, describen la construcción de un anticuerpo anti-IL-6R humanizado a partir de PM-1 de ratón, un anticuerpo monoclonal específico contra IL-6R humano.
- Mihara et al., Immunology Letters 84 (2002), 223-229, examinan el efecto de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 (MR16-1) sobre las respuestas inmunes humorales y celulares en ratones.
- 20 En el Documento WO 2001 042484 se describe el uso de antagonistas de péptidos y polinucleótidos de tipo IL-6 para el tratamiento de cánceres.
- Adachi et al. informan de que células de mesotelioma maligno expresan IL-6R y receptor soluble de IL-6, aunque la cantidad de expresión es baja.
- 25 En el Documento JP 8245414 se describe una composición farmacéutica para trastornos caracterizados por niveles aumentados de IL-6.
- Suzuki et al., Eur. J. Immunol., volumen 22, 1992, páginas 1989-1993, informan de que un anticuerpo anti-receptor de interleucina 6 humano inhibe in vivo el crecimiento de mieloma humano.
- Sin embargo, no se conoce la inhibición del crecimiento del mesotelioma por un anticuerpo anti-IL-6 ni in vitro ni in vivo.
- 30 Takagi, Journal of Clinical and Experimental Medicine (suplemento de marzo), "Respiratory Diseases", páginas 469-472, 1999.
- Nakano, Respiration, volumen 18, nº 9, páginas 916-925, 1999.
- Tada, Journal of Clinical and Experimental Medicine (suplemento de marzo), "Respiratory Diseases", páginas 406-408, 1999.
- 35 Nakano, Journal of Clinical and Experimental Medicine (suplemento de marzo), "Respiratory Diseases", páginas 570-573, 2003.
- Bielefeldt-Ohmann, Cancer Immunol. Immunother. 40: 241-250, 1995.
- Higashihara, Cancer, 15 de octubre de 1992, volumen 70, nº 8, páginas 2105-2108.

#### Revelación del invento

- 40 No se sabía que los antagonistas de IL-6 actuaran directamente sobre el mesotelioma y presentaran efectos inhibitorios del crecimiento. Un objeto del presente invento es proporcionar un nuevo agente terapéutico para el mesotelioma (inhibidor del crecimiento de células de mesotelioma) que contiene como ingrediente activo un anticuerpo anti-receptor de IL-6.
- 45 Como resultado de llevar a cabo extensos estudios para desarrollar un nuevo agente terapéutico para el mesotelioma que inhibiera el crecimiento de células de mesotelioma, el inventor del presente invento obtuvo el nuevo hallazgo de que el crecimiento de células de mesotelioma puede ser inhibido al inhibir o interrumpir la transmisión de señales relativa a IL-6, lo que condujo a la compleción del presente invento.
- De este modo, el presente invento proporciona un agente terapéutico para el mesotelioma, que contiene como ingrediente activo un anticuerpo anti-receptor de la interleucina 6 (IL-6).
- 50 Específicamente, el presente invento también proporciona un inhibidor del crecimiento de células de mesotelioma,

que contiene un anticuerpo anti-receptor de la interleucina 6 (IL-6) como ingrediente activo.

El susodicho mesotelioma es, por ejemplo, mesotelioma pleural y, más específicamente, mesotelioma pleural maligno. El mesotelioma pleural difuso está incluido en el mesotelioma pleural maligno.

5 El susodicho anticuerpo anti-receptor de IL-6 es preferiblemente un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6. Particularmente, el susodicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es preferiblemente un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano, tal como el anticuerpo PM-1, o un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón, tal como el anticuerpo MR16-1. El susodicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es preferiblemente un anticuerpo recombinante.

10 El susodicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. En el presente invento, un anticuerpo particularmente preferible es el anticuerpo PM-1 humanizado.

En un aspecto, el presente invento se refiere a un anticuerpo contra el receptor de IL-6 para uso en el tratamiento del mesotelioma, en que dicho anticuerpo inhibe el crecimiento de células de mesotelioma.

### Breve descripción de los dibujos

15 La Figura 1 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 1 al indicar las productividades de IL-6 por diversas líneas celulares de mesotelioma maligno.

La Figura 2 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 2 al indicar las productividades (falta de las mismas) de receptor de IL-6 (IL-6R) por diversas líneas celulares de mesotelioma maligno. Además, GAPDH indica la cantidad de mRNA de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), usado como un testigo interno.

20 La Figura 3 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 3, en que se induce, mediante IL-6 e IL-6R, la producción de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF; del inglés, vascular endothelial growth factor) por las líneas celulares H2052 y H2452 de mesotelioma maligno.

25 La Figura 4 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 4, en que se llevó a cabo un experimento similar al del Ejemplo 3 para la línea celular H28 de mesotelioma maligno, que indica que esta línea celular produce factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) sin necesitar la inducción por parte de IL-6/IL-6R.

La Figura 5 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 5, en que, por contraste con la fosforilación de STAT3 debida a la estimulación por IL-6 que se promueve en la línea celular H2025, en que IL-6 induce la producción de VEGF, no se promueve la fosforilación de STAT3 debida a la estimulación por IL-6 en la línea celular H28, en que IL-6 no induce la producción de VEGF.

30 La Figura 6 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 6, en que, por contraste con la expresión de SOCS3 debida a la estimulación por IL-6 e IL-6R que se induce en la línea celular H2025, en que IL-6 induce la producción de VEGF, no se expresa inductivamente SOCS3 en la línea celular H28, en que IL-6 no induce la producción de VEGF.

35 La Figura 7 es un dibujo que muestra la estructura de un promotor de los plásmidos pGL3-VEGF y pGL3-VEGFmut junto con sus inmediaciones, usados en el Ejemplo 7.

La Figura 8 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 7, en que en un sistema en que se une un promotor de VEGF con el gen informador de luciferasa, en el caso de que se altere el sitio ligante de p-STAT3 en el promotor de VEGF, no tiene lugar la activación del promotor de VEGF por IL-6.

40 La Figura 9 es un dibujo esquemático que muestra el mecanismo de la inducción del promotor de VEGF (producción de VEGF) debida a la estimulación por IL-6 en la línea celular H2052, como se pronostica a partir de los resultados de los Ejemplos 5 a 7.

La Figura 10 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 8, en que aumenta el crecimiento de la línea celular H2052, dependientemente de la concentración de IL-6, en presencia de IL-6R.

45 La Figura 11 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 9, en que la promoción del crecimiento de la línea celular H2052 por IL-6 e IL-6R es inhibida por MRA.

La Figura 12 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 10, en que aumenta el crecimiento de la línea celular H226, dependientemente de la concentración de IL-6, en presencia de IL-6R, y que MRA presenta efectos inhibitorios sobre ese crecimiento.

50 La Figura 13 es un gráfico que muestra los resultados del Experimento 8, al indicar que aumenta el crecimiento de la línea celular H226, dependientemente de la concentración de IL-6, en presencia de IL-6R.

La Figura 14 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 11, en que la activación del crecimiento de las líneas celulares H2052 y H226 de mesotelioma maligno por IL-6 y el receptor soluble de IL-6 es inhibida por el anticuerpo PM-1 humanizado.

5 La Figura 15 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 12, en que la inducción de la producción de VEGF en las líneas celulares MSTO, H226, H2052 y H2452 de mesotelioma maligno por estimulación con IL-6 es inhibida por el anticuerpo PM-1 humanizado.

La Figura 16 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 13, en que la fosforilación de STAT3 inducida mediante estimulación con IL-6/IL-6R soluble en las líneas celulares H2052 y H2452 es inhibida por el anticuerpo PM-1 humanizado.

10 La Figura 17 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 14, en que la activación del crecimiento de las líneas celulares H2052 y H226 mediante estimulación con IL-6 e IL-6R soluble no es inhibida por un anticuerpo anti-VEGF.

### Mejor modo de llevar el invento a cabo

15 IL-6 es una citocina a la que también se hace referencia como factor 2 estimulador de células B (BSF2; del inglés, B cell stimulating factor 2) o interferón  $\beta$ 2. Se descubrió inicialmente que IL-6 era un factor de diferenciación implicado en la activación de células linfocíticas B [T. Hirano et al., *Nature* (1986) 324, 73-76], después de lo cual se determinó que era una citocina multifuncional que ejercía efectos sobre las funciones de diversas células [S. Akira et al., *Adv. In Immunology* (1993) 54, 1-78]. También se ha comunicado que IL-6 induce la maduración de células linfocíticas T [M. Lotz et al., *J. Exp. Med.* (1988) 167, 1253-1258].

20 IL-6 transmite su actividad biológica por medio de diversas proteínas presentes en células. Una de éstas es la proteína de receptores de IL-6, que se une a ligandos, que tiene un peso molecular de aproximadamente 80 kDa [T. Taga et al., *J. Exp. Med.* (1987) 166, 967-981; K. Yamasaki et al., *Science* (1987) 241, 825-828]. Además de existir en una forma unida a la membrana que se expresa en la membrana celular al penetrar en la membrana celular, los receptores de IL-6 también existen como receptores de IL-6 solubles principalmente compuestos de una región extracelular.

25 Otra de éstas es una proteína de membrana, gp130, que tiene un peso molecular de aproximadamente 130 kDa, que está implicada en la transmisión de señales de una unión sin ligando. La IL-6 y los receptores de IL-6 forman un complejo de IL-6/receptor de IL-6 y, como resultado de la subsiguiente unión con gp130, se transmite la actividad biológica de IL-6 a las células [T. Taga et al., *Cell* (1989) 58, 573-581].

30 Los antagonistas de IL-6 son sustancias que inhiben la transmisión de la actividad biológica de IL-6. Los ejemplos conocidos de estos antagonistas de IL-6 incluyen un anticuerpo contra IL-6 (anticuerpo anti-IL-6), un anticuerpo contra receptores de IL-6 (anticuerpo anti-receptor de IL-6), un anticuerpo contra gp130 (anticuerpo anti-gp130), una variante de IL-6, y un péptido parcial de IL-6 o del receptor de IL-6.

35 Hay varios informes relativos a un anticuerpo anti-receptor de IL-6 [D. Novick et al., *Hybridoma* (1991) 10, 137-146; Y. W. Huang et al., *Hybridoma* (1993) 12, 621-630; Publicación de Patente Internacional No Revisada n° WO 95-09873; Publicación de Patente Francesa No Revisada n° FR 2694767; y Patente de EE.UU. n° US 521628]. Se sabe que el anticuerpo PM-1 humanizado es obtenido al trasplantar la región determinante de complementariedad (CDR; del inglés, complementarity determining region) de uno de estos en forma de anti-PM-1 de ratón [Y. Hirata et al., *J. Immunol.* (1989), 143, 2900-2906], a un anticuerpo humano (Publicación de Patente Internacional No Revisada n° WO 92-19759).

45 El susodicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es preferiblemente un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano o un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón. Un ejemplo del susodicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano es el anticuerpo PM-1, mientras que un ejemplo de un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón es el anticuerpo MR16-1. El susodicho anticuerpo es preferiblemente un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano, un ejemplo del cual es el anticuerpo PM-1 humanizado.

Hay limitaciones particulares en cuanto al origen, el tipo o la forma del anticuerpo anti-receptor de IL-6 utilizado en el presente invento con tal de que inhiba el crecimiento de células de mesotelioma y sea útil como ingrediente activo de un agente terapéutico para el mesotelioma.

50 Los antagonistas de IL-6 son sustancias que inhiben la actividad biológica de IL-6 al interrumpir la transmisión de señales por IL-6. Los antagonistas de IL-6 son preferiblemente sustancias que ejercen una acción inhibitoria sobre la unión de IL-6, el receptor de IL-6 y gp130. Los ejemplos de antagonistas de IL-6 incluyen un anticuerpo anti-IL-6, un anticuerpo anti-receptor de IL-6, un anticuerpo anti-gp130, variantes de IL-6, variantes del receptor soluble de IL-6, péptidos parciales del receptor de IL-6 y sustancias de bajo peso molecular que presentan una actividad similar.

55 El anticuerpo anti-IL-6 puede ser obtenido como un anticuerpo policlonal o monoclonal utilizando métodos conoci-

- dos. El anticuerpo monoclonal procedente de mamífero es particularmente preferible para el anticuerpo anti-IL-6 utilizado en el presente invento. Los ejemplos de anticuerpos monoclonales procedentes de mamífero incluyen los producidos por hibridomas y los producidos por huéspedes transformados con un vector de expresión que contiene el gen del anticuerpo, usando técnicas de ingeniería genética. Este anticuerpo interrumpe la transmisión de la actividad biológica de IL-6 a las células como resultado de la inhibición, al unirse a IL-6, de la unión de IL-6 a los receptores de IL-6.
- Los ejemplos de estos anticuerpos incluyen MH166 [T. Matsuda et al., Eur. J. Immunol. (1998) 18, 951-956] y el anticuerpo SK2 [K. Sato et al., 21st General Meeting of the Japanese Society for Immunology, Academic Record (1991) 21, 166].
- Se puede producir básicamente un hibridoma productor de anticuerpos anti-IL-6 del modo descrito más adelante, usando una tecnología conocida. A saber, se puede producir este anticuerpo utilizando IL-6 como antígeno sensibilizador, inmunizando con éste de acuerdo con métodos de inmunización ordinarios, fusionando los inmunocitos resultantes con células huésped conocidas de acuerdo con métodos de fusión celular ordinarios, y explorando luego en cuanto a las células que producen el anticuerpo monoclonal de acuerdo con métodos de exploración ordinarios.
- Más específicamente, la producción de un anticuerpo anti-IL-6 se debería llevar a cabo del modo descrito más adelante. La IL-6 humana utilizada como antígeno sensibilizador para conseguir el anticuerpo se obtiene utilizando la secuencia génica/de aminoácidos de IL-6 descrita en Eur. J. Biochem. (1987) 168, 543-550; J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541; o Agr. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688].
- Después de insertar la secuencia génica de IL-6 en un sistema vector de expresión conocido y transformar células huésped adecuadas, la proteína diana de IL-6 es purificada mediante métodos conocidos a partir de las células huésped o del sobrenadante del cultivo, lo que va seguido de la utilización de esta proteína de IL-6 purificada como un antígeno sensibilizador. Además, como antígeno sensibilizador también se puede utilizar una proteína fusionada que consista en la proteína de IL-6 y otra proteína.
- El anticuerpo anti-receptor de IL-6 utilizado en el presente invento puede ser obtenido en forma de un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal usando medios conocidos. El anticuerpo monoclonal procedente de mamífero es particularmente preferible para el anticuerpo anti-receptor de IL-6 usado en el presente invento. Los ejemplos de anticuerpos monoclonales procedentes de células de mamífero incluyen los producidos por hibridomas y los producidos en un huésped transformado con un vector de expresión que contiene el gen del antígeno, mediante técnicas de ingeniería genética. Como resultado de esta unión del anticuerpo con receptores de IL-6, se inhibe la unión de IL-6 con receptores de IL-6, interrumpiéndose de este modo la transmisión de la actividad biológica de IL-6 a las células.
- Los ejemplos de estos anticuerpos incluyen el anticuerpo MR16-1 [T. Tamura et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11.924-11.928], el anticuerpo PM-1 [Y. Hirata et al., J. Immunol. (1989), 143, 2900-2906], el anticuerpo AUK12-20, el anticuerpo AUK64-7 y el anticuerpo AUK146-15 (Publicación de Patente Internacional No Revisada nº WO 92-19759). De entre estos, el anticuerpo PM-1 es particularmente preferible para uso como anticuerpo.
- Además, basándose en el Tratado de Budapest, se ha depositado internacionalmente una línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo PM-1, bajo la denominación FERM BP-2998, el 12 de julio de 1989 en el "International Patent Organism Depository of the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology" (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) como PM-1. Además, basándose en el Tratado de Budapest, se ha depositado internacionalmente una línea celular de hibridoma que produce el anticuerpo MR16-1, bajo la denominación FERM BP-5875, el 13 de marzo de 1997 en el "International Patent Organism Depository of the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology" (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) como hibridoma MR16-1 de rata-ratón.
- Se puede producir básicamente un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales anti-receptor de IL-6 del modo descrito más adelante, usando una tecnología conocida. A saber, se puede producir este hibridoma utilizando el receptor de IL-6 como antígeno sensibilizador, inmunizando con éste de acuerdo con métodos de inmunización ordinarios, fusionando los inmunocitos resultantes con células huésped conocidas de acuerdo con métodos de fusión celular ordinarios, y explorando en cuanto a las células que producen el anticuerpo monoclonal de acuerdo con métodos de exploración conocidos.
- Más específicamente, el anticuerpo anti-receptor de IL-6 se debería producir de la manera descrita más adelante. Por ejemplo, el receptor de IL-6 humano utilizado como antígeno sensibilizador para la adquisición del anticuerpo se obtiene utilizando la secuencia génica/de aminoácidos del receptor de IL-6 descrita en la Publicación de Patente Europea No Revisada nº EP 325474, mientras que el receptor de IL-6 de ratón se obtiene utilizando la secuencia génica/de aminoácidos del receptor de IL-6 descrita en la Publicación de Patente Japonesa No Revisada nº 3-155795.
- Hay dos tipos de proteína de receptor de IL-6, que consisten en la que se expresa en la membrana celular y la que se libera de la membrana celular (receptor soluble de IL-6) [K. Yasukawa et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676]. El anticuerpo para receptor soluble de IL-6 está sustancialmente compuesto de la región extracelular del receptor de IL-

6 que se une a la membrana celular, y difiere del receptor de IL-6 unido a la membrana en que falta una región que penetra en la membrana celular o una región que penetra en la membrana celular y una región intracelular. La proteína de receptor de IL-6 puede utilizar cualquier receptor de IL-6 con tal de que pueda ser utilizado como agente sensibilizador para producir el anticuerpo anti-receptor de IL-6 utilizado en el presente invento.

5 Después de insertar la secuencia génica del receptor de IL-6 en un sistema vector de expresión conocido para transformar células huésped adecuadas, el receptor de IL-6 diana es purificado mediante métodos conocidos a partir de las células huésped o del sobrenadante del cultivo, lo que va seguido de la utilización de la proteína de receptor de IL-6 purificada como un antígeno sensibilizador. Además, como antígeno sensibilizador también se puede utilizar una proteína fusionada que consista en células que expresan el receptor de IL-6 o la proteína de receptor de IL-6 y otra proteína.

10 Basándose en el Tratado de Budapest, se ha depositado internacionalmente una *Escherichia coli* (*E. coli*) que contiene el plásmido pIBBSF2R que contiene cDNA que codifica el receptor de IL-6 humano, bajo el número de depósito FERM BP-2232, el 9 de enero de 1989 en el "International Patent Organism Depository of the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology" (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) como HB101-pIBBSF2R.

15 Se puede obtener un anticuerpo anti-gp130 en forma de anticuerpo policlonal o anticuerpo monoclonal usando medios conocidos. El anticuerpo monoclonal procedente de mamífero es particularmente preferible para el anticuerpo anti-gp130 usado en el presente invento. Los anticuerpos monoclonales procedentes de mamífero incluyen los producidos por hibridomas y los producidos en un huésped transformado con un vector de expresión que contiene el gen del anticuerpo, mediante técnicas de ingeniería genética. Este anticuerpo inhibe la unión del complejo de IL-6/receptor de IL-6 con gp130 e interrumpe la transmisión de la actividad biológica de IL-6 a las células mediante la unión con gp130.

20 Los ejemplos de estos anticuerpos incluyen el anticuerpo AM64 (Publicación de Patente Japonesa No Revisada nº 3-219894), el anticuerpo 4B11, el anticuerpo 2H4 (Patente de EE.UU. nº 5571513) y el anticuerpo B-P8 (Publicación de Patente Japonesa No Revisada nº 8-291199).

25 Usando una tecnología conocida, se puede producir básicamente un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal anti-gp130 de la manera descrita más adelante. A saber, se puede producir este hibridoma usando gp130 como antígeno sensibilizador, inmunizando con éste de acuerdo con métodos de inmunización ordinarios, fusionando los inmunocitos resultantes con células huésped conocidas de acuerdo con métodos de fusión celular ordinarios, y explorando en cuanto a las células que producen el anticuerpo monoclonal de acuerdo con métodos de exploración ordinarios.

30 Más específicamente, el anticuerpo monoclonal se debería producir de la manera descrita más adelante. Por ejemplo, el gp130 utilizado como antígeno sensibilizador para la adquisición del anticuerpo se obtiene utilizando la secuencia génica/de aminoácidos de gp130 descrita en la Publicación de Patente Europea No Revisada nº EP 411946.

35 Después de insertar la secuencia génica de gp130 en un sistema vector de expresión conocido para transformar células huésped adecuadas, la proteína diana de gp130 es purificada mediante métodos conocidos a partir de las células huésped o del sobrenadante del cultivo, lo que va seguido de la utilización de la proteína de receptor gp130 purificada como antígeno sensibilizador. Además, como antígeno sensibilizador también se puede utilizar una proteína fusionada que consista en células que expresan gp130 o proteína de gp130 y otra proteína.

40 Aunque no hay limitaciones particulares en cuanto al mamífero inmunizado con el antígeno sensibilizador, es preferiblemente seleccionado teniendo en cuenta la compatibilidad con las células huésped utilizadas para la fusión celular, siendo roedores tales como ratones, ratas y hámsteres ejemplos típicos del mismo.

45 La inmunización del animal con el antígeno sensibilizador se lleva a cabo de acuerdo con métodos conocidos. Como ejemplo típico de dicho método, se lleva preferiblemente a cabo la inmunización inyectando el antígeno sensibilizador en la cavidad abdominal o debajo de la piel de un mamífero. Más específicamente, una suspensión de antígeno sensibilizador diluida hasta una cantidad adecuada con disolución salina tamponada con fosfato (PBS; del inglés, phosphate buffered saline) o disolución salina fisiológica es mezclada con una cantidad adecuada de un agente adyuvante ordinario, tal como adyuvante completo de Freund, según se desee, lo que va seguido del emulsiónamiento de la mezcla y de su administración varias veces al mamífero cada 4 a 21 días. Además, cuando se inmuniza con el antígeno sensibilizador, se puede utilizar un vehículo adecuado.

50 Una vez que se ha confirmado que se ha llevado a cabo la inmunización de esta manera y que el nivel de anticuerpo en el suero ha ascendido hasta un nivel deseado, se extraen inmunocitos del mamífero y se utilizan para la fusión celular. Las células esplénicas son un ejemplo particularmente preferible de inmunocitos usados para la fusión celular.

55 Ya se usan adecuadamente diversas líneas celulares conocidas, tales como P3X6Ag8.653 [J. F. Kernaey et al., J. Immunol (1979) 123, 1548-1550], P3X63Ag8U.1 [Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7], NS-1 [G. Kohler y C. Milstein, Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519], MPC-11 [D. H. Margulies et al., Cell (1976) 8,

405-415], SP2/0 [M. Shulman et al., *Nature* (1978) 276, 269-270], F0 [S. F. de St. Groth et al., *J. Immunol. Methods* (1980) 35, 1-21], S194 [I. S. Trowbridge, *J. Exp. Med.* (1978) 148, 313-323] y R210 [G. Galfre et al., *Nature* (1979) 277, 131-133], como células de mieloma de mamífero que sirven como las otras células huésped fusionadas con los inmunocitos anteriormente mencionados.

- 5 La fusión de los inmunocitos anteriormente mencionados y las células de mieloma puede ser llevada básicamente a cabo de acuerdo con métodos conocidos tales como el método de Milstein et al. [G. Kohler y C. Milstein, *Methods Enzymol.* (1981) 73, 3-46].

Más específicamente, la fusión celular anteriormente mencionada se lleva a cabo, por ejemplo, en un líquido nutritivo ordinario de cultivo en presencia de un promotor de la fusión celular. Los ejemplos de promotores de fusión que se utilizan incluyen polietilenglicol (PEG) y virus Sendai (HVJ), y también se puede añadir un agente auxiliar tal como dimetilsulfóxido para potenciar la eficacia de la fusión, según se desee.

10 La relación entre inmunocitos y células de mieloma utilizada es preferiblemente de 1 a 10 veces más inmunocitos que células de mieloma. Los ejemplos de líquidos de cultivo que se pueden utilizar para la fusión celular anteriormente mencionada incluyen el líquido de cultivo RPMI 1640, preferible para el crecimiento de las susodichas células de mieloma, el líquido de cultivo MEM y otros líquidos de cultivo ordinarios usados para este tipo de cultivo celular. Además, también se puede utilizar un suplemento sérico, tal como suero de ternera fetal (FCS; del inglés, fetal calf serum), en combinación con el susodicho líquido de cultivo.

15 La fusión celular se lleva a cabo mezclando a fondo cantidades predeterminadas de los susodichos inmunocitos y células de mieloma en el susodicho líquido de cultivo, añadiendo una disolución de PEG, tal como una disolución de PEG que tenga un peso molecular medio de aproximadamente 1000 a 6000, disolución previamente calentada a 37 °C y normalmente con una concentración de 30 a 60% (peso/volumen), y mezclando luego para formar las células fusionadas diana (hibridoma). A continuación, los agentes para fusión celular y demás que son perjudiciales para el desarrollo del hibridoma pueden ser eliminados repitiendo el procedimiento que consiste en añadir secuencialmente un líquido de cultivo adecuado y centrifugar luego para separar el sobrenadante.

20 El hibridoma es seleccionado mediante cultivo en un líquido selectivo ordinario de cultivo tal como el líquido de cultivo HAT (líquido de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). Se continúa el cultivo en dicho líquido de cultivo HAT durante un periodo de tiempo, que es normalmente de varios días a varias semanas, que es suficiente para destruir aquellas células distintas del hibridoma diana (células no fusionadas). A continuación, el hibridoma que produce el anticuerpo diana es explorado y clonado llevando a cabo métodos ordinarios de dilución limitante.

25 Además de la obtención del susodicho hibridoma al inmunizar animales distintos de seres humanos con un antígeno, se puede obtener un deseado anticuerpo humano que presente actividad ligante con un antígeno deseado o con células que expresan el antígeno deseado, sensibilizando *in vitro* linfocitos humanos con una proteína antigénica deseada o con células que expresan el antígeno deseado y fusionando luego los sensibilizados linfocitos B con células de mieloma tales como U266 (véase la Publicación de Patente Japonesa Revisada nº 1-59878). Además, también se puede conseguir un deseado anticuerpo humano de acuerdo con el susodicho método administrando el antígeno o células que expresan el antígeno a un animal transgénico que tiene un repertorio de genes de anticuerpos humanos (véanse las Publicaciones de Patente Internacional No Revisadas números WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 y WO 96/33735).

30 El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal producido de esta manera puede ser subcultivado en un líquido de cultivo ordinario y ser almacenado en nitrógeno líquido durante un largo periodo de tiempo.

35 Para conseguir un anticuerpo monoclonal a partir del hibridoma, se puede emplear un método mediante el cual el hibridoma se cultiva de acuerdo con métodos ordinarios y se obtiene en forma de sobrenadante del cultivo, o un método mediante el cual el hibridoma se desarrolla por administración a un mamífero que es compatible con él y se obtiene luego en forma de líquido ascítico. El primer método es adecuado para obtener un anticuerpo de elevada pureza, mientras que el segundo método es adecuado para producir el anticuerpo en gran volumen.

40 Por ejemplo, la producción de un hibridoma que produzca anticuerpos anti-receptor de IL-6 puede ser llevada a cabo de acuerdo con el método descrito en la Publicación de Patente Japonesa No Revisada nº 3-139293. Esto se puede llevar a cabo usando un método mediante el cual se inyecta el hibridoma productor de PM-1, internacionalmente depositado, basándose en el Tratado de Budapest, bajo la denominación FERM BP-2998 el 12 de julio de 1989 en el "International Patent Organism Depository of the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology" (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón), en la cavidad abdominal de ratones BALB/c para obtener líquido ascítico, lo que va seguido de la purificación del anticuerpo PM-1 a partir del líquido ascítico, o un método mediante el cual se cultiva dicho hibridoma en un medio tal como suero de ternera fetal al 10%, medio RPMI 1640 que contiene BM-Condimed H1 (Boehringer-Mannheim) al 5%, medio SFM para hibridomas (Gibco-BRL) o medio PFHM-11 (Gibco-BRL), lo que va seguido de la purificación del anticuerpo PM-1 a partir del sobrenadante del cultivo.

45 El anticuerpo recombinante producido, usando tecnología de recombinación génica, al clonar un gen de anticuerpo procedente de un hibridoma, incorporarlo a un vector adecuado e insertarlo luego en un huésped puede ser utilizado



como anticuerpo monoclonal en el presente invento (véase, por ejemplo, C. A. K. Borrebaeck y J. W. Larrick, Therapeutic Monoclonal Antibodies, publicado en el Reino Unido por MacMillan Publishers Ltd., 1990).

Más específicamente, el mRNA que codifica la región variable (V) del anticuerpo es aislado de células tales como un hibridoma que produce el anticuerpo diana. El aislamiento del mRNA se lleva a cabo preparando el RNA total de acuerdo con un método conocido, tal como el de la centrifugación con guanidina [J. M. Chirgwin et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299] o el del AGPC [P. Chomczynski et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159], y preparando luego el mRNA usando un kit para purificación de mRNA (Pharmacia), etc. Además, el mRNA puede ser directamente preparado usando el kit QuickPrep para purificación de mRNA (Pharmacia).

El cDNA de la región V del anticuerpo es sintetizado a partir del mRNA resultante usando la transcriptasa inversa. La síntesis del cDNA puede ser llevada a cabo usando, por ejemplo, el kit AMV para síntesis de cDNA de primera cadena con transcriptasa inversa. Además, para sintetizar y multiplicar el cDNA, se puede utilizar el kit 5'-Ampli Finder Race (Clontech) y el método 5'-RACE usando PCR [M. A. Frohman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002]. El fragmento de DNA diana es purificado a partir del producto de PCR resultante y es copulado con DNA vector. Además, se produce luego un vector recombinante a partir de éste y se inserta en *E. coli*, etc., lo que va seguido de la selección de una colonia para preparar el vector recombinante deseado. Luego se confirma la secuencia de bases del DNA diana mediante un método conocido, tal como el método desoxi.

Una vez que se ha obtenido el DNA que codifica la región V del anticuerpo diana, es luego copulado con un DNA que codifica una región constante (región c) de anticuerpo deseada, lo que va seguido de la incorporación a un vector de expresión. Alternativamente, el DNA que codifica la región V del anticuerpo puede ser incorporado a un vector de expresión que contiene el DNA de la región C de anticuerpo.

Con objeto de producir el anticuerpo utilizado en el presente invento, un gen de anticuerpo como el descrito más adelante es incorporado a un vector de expresión que expresa bajo el control de, por ejemplo, un potenciador o un promotor. A continuación, se transforman células huésped con este vector de expresión para permitir la expresión del anticuerpo.

En el presente invento, se puede utilizar un anticuerpo génicamente recombinante que ha sido artificialmente alterado con el fin de reducir la antigenicidad interespecies para seres humanos; los ejemplos de dicho anticuerpo incluyen un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo humano. Estos anticuerpos alterados pueden ser producidos usando métodos conocidos.

Se obtienen anticuerpos quiméricos al copular el DNA que codifica la región V de anticuerpo, obtenida de la manera anteriormente descrita, con DNA que codifica la región C de anticuerpo humano, lo que va seguido de la incorporación del producto copulado a un vector de expresión y la producción por inserción en un huésped (véase la Publicación de Patente Europea No Revisada nº EP 125023 o la Publicación de Patente Internacional No Revisada nº WO 92-19759). Utilizando este método conocido, se puede obtener un anticuerpo quimérico que sea útil en el presente invento.

Por ejemplo, plásmidos que contienen DNAs que codifican las regiones V de la cadena L y la cadena H del anticuerpo PM-1 quimérico han sido denominados pPM-k3 y pPM-h1, respectivamente, y unas *Escherichia coli* que conservan estos plásmidos han sido internacionalmente depositadas, basándose en el Tratado de Budapest, bajo las denominaciones NCIMB 40366 y NCIMB 40362, respectivamente, el 12 de febrero de 1991 en National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (23 St. Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Escocia, Commonwealth de Gran Bretaña e Irlanda del Norte).

Se obtienen anticuerpos humanizados, a los que también se hace referencia como anticuerpos reformados, al trasplantar la región determinante de la complementariedad (CDR) de mamíferos distintos de seres humanos, tales como ratones, a la región determinante de la complementariedad de un anticuerpo humano, y se conocen sus técnicas de recombinación génica típicas (véase la Publicación de Patente Europea No Revisada nº EP 125023 o la Publicación de Patente Internacional No Revisada nº WO 92-19759).

Más específicamente, se sintetiza por PCR una secuencia de DNA diseñada para unir el CDR de anticuerpo de ratón con la región estructural (FR; del inglés, framework region) de anticuerpo humano a partir de una pluralidad de oligonucleótidos producidos para que tengan porciones solapantes en sus extremos. El DNA resultante es luego unido con un DNA que codifica la región C de anticuerpo humano, lo que va seguido de la incorporación a un vector de expresión y la inserción en un huésped para producir el DNA en ese huésped (véase la Publicación de Patente Europea No Revisada nº EU 239400 o la Publicación de Patente Internacional No Revisada nº WO 92-19759).

Para la FR del anticuerpo humano unida por medio del CDR, se selecciona una FR para la cual la región determinante de la complementariedad forma un satisfactorio sitio ligante de antígenos. Los aminoácidos de la región estructural de la región variable de anticuerpo pueden ser sustituidos para que la región determinante de la complementariedad del anticuerpo humano reconfigurado forme un adecuado sitio ligante de antígenos [K. Sato et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856].

Para el anticuerpo quimérico y el anticuerpo humanizado se utiliza la región C de anticuerpo humano. Un ejemplo de

una región C de anticuerpo humano es C $\gamma$  y, por ejemplo, se puede utilizar C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3 o C $\gamma$ 4. Además, la región C de anticuerpo humano puede ser modificada para mejorar la estabilidad del anticuerpo o su producción.

Los anticuerpos quiméricos están compuestos de una región variable de un anticuerpo procedente de un mamífero distinto de un ser humano y una región C procedente de un anticuerpo humano, mientras que los anticuerpos humanizados están compuestos de una región determinante de la complementariedad de un anticuerpo procedente de un mamífero distinto de un ser humano y una región estructural y una región C que proceden de un anticuerpo humano, y, puesto que su antigenicidad en seres humanos está disminuida, son útiles como anticuerpos utilizados en el presente invento.

Un ejemplo específico preferible de un anticuerpo humanizado usado en el presente invento es el anticuerpo PM-1 humanizado (véase la Publicación de Patente Internacional No Revisada n° WO 92-19759).

Además del método previamente descrito, otra tecnología conocida para obtener un anticuerpo humano consiste en obtener un anticuerpo humano mediante inmunoselección ("panning") usando un banco de anticuerpos humanos. Por ejemplo, también se puede seleccionar un fago que se une a un antígeno, usando una región variable de anticuerpo humano como un anticuerpo de cadena sencilla (scFV) y haciendo que se exprese en la superficie de un fago usando el método de presentación en fago. Analizando los genes del fago seleccionado, se puede determinar luego la secuencia de DNA que codifica la región variable de anticuerpo humano que se une al antígeno. Una vez que se ha identificado la secuencia de DNA del scFv que se une al antígeno, se puede producir un vector de expresión que sea equivalente a esa secuencia para obtener el anticuerpo humano. Estos métodos son ya comúnmente conocidos, y se puede hacer referencia a los Documentos WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388.

El gen de anticuerpo construido de la manera anteriormente descrita se puede expresar y obtener mediante métodos conocidos. En el caso de células de mamífero, se puede expresar el gen de anticuerpo con un DNA o vector que contiene dicho DNA, en el que están funcionalmente unidos un promotor útil comúnmente utilizado, el gen de anticuerpo que se va a expresar, y una señal de poliA cadena abajo del lado 3'. Un ejemplo de un promotor/potenciador es el promotor/potenciador precoz inmediato de citomegalovirus humano.

Además, otros ejemplos de promotores/potenciadores que se deberían utilizar para que se expresara el anticuerpo utilizado en el presente invento incluyen promotores/potenciadores víricos tales como los de retrovirus, poliomavirus, adenovirus o virus 40 de simios (SV40; del inglés, simian virus 40), así como promotores/potenciadores procedentes de células de mamífero, tal como el factor 1 $\alpha$  de elongación humano (HEF1 $\alpha$ ; del inglés, human elongation factor 1 $\alpha$ ).

Por ejemplo, en el caso de utilizarse el promotor/potenciador de SV40, se puede hacer que se exprese fácilmente el anticuerpo de acuerdo con el método de Mulligan et al. [R. C. Mulligan et al., Nature (1979) 277, 108-114], o, en el caso del promotor/potenciador de HEF1 $\alpha$ , se puede hacer que se exprese fácilmente el anticuerpo de acuerdo con el método de Mizushima et al. [S. Mizushima y S. Nagata, Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322].

En el caso de *Escherichia coli*, se puede hacer que se exprese el anticuerpo al unir funcionalmente un promotor útil comúnmente utilizado, una secuencia señal para la secreción del anticuerpo, y el gen de anticuerpo que se va a expresar. Los ejemplos de promotores incluyen el promotor lacZ y el promotor araB. En el caso de que se utilice el promotor lacZ, el anticuerpo se debería expresar de acuerdo con el método de Ward et al. [E. S. Ward et al., Nature (1989) 341, 544-546; E. S. Ward et al., FASEB J. (1992) 6, 2422-2427], o, en el caso de que se utilice el promotor araB, el anticuerpo se debería expresar de acuerdo con el método de Better et al. [M. Better et al., Science (1988) 240, 1041-1043].

En el caso de producción en el periplasma de *E. coli*, se debería utilizar la secuencia señal pelB [S. P. Lei et al., J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383] para la secuencia señal para secreción del anticuerpo. Después de la separación del anticuerpo producido en el periplasma, se usa el anticuerpo después de que se vuelva a plegar adecuadamente la estructura del anticuerpo (véase, por ejemplo, el Documento WO 96/30394).

Los ejemplos de fuentes de replicación que se pueden usar incluyen aquéllas que se originan en SV40, poliomavirus, adenovirus o virus del papiloma bovino (BPV; del inglés, bovine papilloma virus), y, con objeto de aumentar el número de copias génicas en el sistema de células huésped, el vector de expresión puede contener un marcador de selección tal como el gen de la aminoglicósido fosfotransferasa (APH; del inglés, aminoglycoside phosphotransferase), el gen de la timidina cinasa (TK; del inglés, thymidine kinase), el gen de la xantina-guanina fosforribosil transferasa de *E. coli* (Ecogpt; del inglés, *E. coli* xanthine-guanine phosphoribosyl transferase) o el gen de la dihidrofolato reductasa (dhfr).

Para producir el anticuerpo usado en el presente invento se puede utilizar cualquier sistema arbitrario de producción. El sistema de producción para la producción del anticuerpo puede ser un sistema in vitro o un sistema in vivo. Los ejemplos de sistemas de producción in vitro incluyen sistemas de producción en que se usan células eucarióticas y sistemas de producción en que se usan células procarióticas.

En el caso de que se utilicen células eucarióticas, en el sistema de producción se pueden usar células animales,

células vegetales o células fúngicas. Los ejemplos conocidos de células animales incluyen: (1) células de mamífero tales como células CHO, COS, de mieloma, renales de cría de hámster (BHK; del inglés, baby hamster kidney), Hela y Vero, (2) células de anfibio tales como células foliculares de rana arbórea africana, y (3) células de insecto tales como células sf9, sf21 y Tn5. Los ejemplos conocidos de células vegetales incluyen células procedentes de *Nicotiana tabacum*, y se deberían cultivar en callos. Los ejemplos conocidos de células fúngicas incluyen células de levaduras tales como especies de *Saccharomyces*, incluyendo *Saccharomyces cerevisiae*, y hongos tales como especies de *Aspergillus*, incluyendo *Aspergillus niger*.

En el caso de que se utilicen células procarióticas, se utiliza un sistema de producción en que se usan células bacterianas. Los ejemplos conocidos de células bacterianas incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*.

Se obtiene el anticuerpo insertando el gen de anticuerpo diana en estas células por transformación y cultivando luego in vitro las células transformadas. El cultivo se lleva a cabo de acuerdo con métodos conocidos. Por ejemplo, se puede utilizar DMEM, MEM, RPMI 1640 o IMDM como líquido de cultivo y se puede usar también un complemento sérico, tal como suero de ternera fetal (FCS), en combinación. Además, se puede producir también el anticuerpo in vivo al transferir células en las que se ha insertado el gen de anticuerpo, a la cavidad abdominal, etc., de un animal.

Por otra parte, los ejemplos de sistemas de producción in vivo incluyen sistemas de producción en que se usan animales y sistemas de producción en que se usan plantas. En el caso de que se utilice un animal, los ejemplos de sistemas de producción incluyen aquellos en que se usan mamíferos o insectos.

Los ejemplos de mamíferos que se pueden utilizar incluyen cabras, cerdos, ovejas, ratones y conejos (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). En el caso de insectos se pueden utilizar gusanos de seda. En el caso de que se utilicen plantas, se pueden utilizar, por ejemplo, plantas de tabaco.

El gen de anticuerpo es insertado en estos animales o plantas, lo que va seguido de la producción y recuperación del anticuerpo presente en los cuerpos de los animales o plantas. Por ejemplo, se inserta un gen de anticuerpo en una posición intermedia de un gen que codifica una proteína únicamente producida en la leche, tal como  $\beta$ -caseína de cabra, para preparación en forma de una proteína fusionada. Luego se inyecta en un embrión de cabra un fragmento de DNA que contiene la proteína fusionada en que se ha insertado el gen de anticuerpo y se introduce después este embrión en una hembra de cabra. Luego se obtiene el anticuerpo deseado a partir de la leche producida por una cabra transgénica o la progenie que ha nacido de la cabra que ha recibido el embrión. Se puede utilizar una hormona adecuada en la cabra transgénica para aumentar la cantidad de leche que contiene el deseado anticuerpo producido por la cabra transgénica [K. M. Ebert et al., *Bio/Technology* (1994) 12, 699-702].

Además, en el caso de que se utilicen gusanos de seda, se infecta un gusano de seda con un baculovirus en el que se ha insertado el gen de anticuerpo diana, lo que va seguido de la obtención del anticuerpo deseado a partir del fluido corporal del gusano de seda [S. Maeda et al., *Nature* (1985) 315, 592-594]. Además, en el caso de que se utilice una planta de tabaco, se inserta el gen de anticuerpo diana en un vector de expresión vegetal tal como pMON 530, después de lo cual se inserta este vector en una bacteria tal como *Agrobacterium tumefaciens*. Luego se utiliza esta bacteria para infectar una planta de tabaco, tal como *Nicotiana tabacum*, para obtener de las hojas de tabaco el anticuerpo deseado [Julian K.-C. Ma et al., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24, 131-138].

Como se describió anteriormente, en el caso de que se produzca el anticuerpo con un sistema de producción in vitro o in vivo, se puede transfectar simultáneamente un huésped incorporando separadamente en vectores de expresión separados unos DNAs que codifican la cadena pesada (cadena H) y la cadena ligera (cadena L) de anticuerpo, o se puede transformar un huésped incorporando en un único vector de expresión un DNA que codifica la cadena H y la cadena L (véase la Publicación de Patente Internacional No Revisada nº WO 94-11523).

El anticuerpo utilizado en el presente invento puede ser un fragmento de anticuerpo o un producto modificado del mismo con tal de que pueda ser preferiblemente utilizado en el presente invento. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen Fab,  $F(ab')_2$ , Fv o cadena H y Fv de cadena sencilla (scFv) en que Fv o Fv o cadena H y cadena L están unidos con un conector adecuado.

Más específicamente, una vez formado un fragmento de anticuerpo al tratar un anticuerpo con una enzima tal como papaína o pepsina o construir un gen que codifica estos fragmentos de anticuerpo e insertarlo en un vector de expresión, se expresa en células huésped adecuadas [véanse, por ejemplo, M. S. Co et al., *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976; M. Better y A. H. Horwitz, *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496; A. Plueckthun y A. Skerra, *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496; E. Lamoyi, *Methods in Enzymology* (1989) 121, 652-663; J. Rousseaux et al., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 663-666; y R. E. Bird et al., *TIBTECH* (1991) 9, 132-137].

El susodicho scFv se obtiene al unir una región V de cadena H de anticuerpo con una región V de cadena L. En este scFv, la región V de cadena H y la región V de cadena L están unidas por un conector, y preferiblemente por un conector peptídico [J. S. Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) 85, 5879-5883]. En cuanto sus orígenes, la región V de cadena H y la región V de cadena L del scFv pueden tener cualesquiera de los orígenes descritos para los anticuerpos anteriormente mencionados. Un ejemplo de un conector peptídico usado para unir las regiones V es un péptido arbitrario de cadena sencilla compuesto por 12-19 restos de aminoácido.

El DNA que codifica el scFv se obtiene usando como moldes un DNA que codifica la susodicha cadena H o región V de cadena H de anticuerpo y un DNA que codifica la cadena L o región V de cadena L, multiplicando una porción de DNA que codifica una deseada secuencia de aminoácidos entre estas secuencias mediante una PCR en que se usa un par de cebadores que define ambos extremos, y multiplicando luego por combinación con una pareja de cebadores que define el DNA que codifica la porción conectora peptídica así como sus dos extremos para que cada cadena H y cada cadena L esté conectada.

Además, una vez que se ha producido el DNA que codifica el scFv, se pueden obtener, de acuerdo con métodos ordinarios, vectores de expresión que los contienen así como huéspedes que han sido transformados mediante dichos vectores de expresión. Además, el scFv puede ser obtenido de acuerdo con métodos ordinarios utilizando esos huéspedes.

Estos fragmentos de anticuerpo pueden ser producidos a partir de un huésped obteniendo y expresando sus genes de una manera igual a la previamente descrita. El "anticuerpo" al que se hace referencia en el presente invento incluye estos fragmentos de anticuerpo.

En cuanto a los productos de anticuerpo modificados, se pueden utilizar anticuerpos unidos con diversos tipos de moléculas, tal como el polietilenglicol (PEG). El "anticuerpo" al que se hace referencia en el presente invento incluye estos productos de anticuerpo modificados. Estos productos de anticuerpo modificados pueden ser obtenidos al llevar a cabo una modificación química en un anticuerpo resultante. Estos métodos han sido ya establecidos en este campo.

Como se describió previamente, el anticuerpo expresado puede ser separado del interior o exterior de células o de un huésped y ser purificado hasta uniformidad. La separación y purificación del anticuerpo utilizado en el presente invento se pueden llevar a cabo mediante cromatografía de afinidad. Los ejemplos de columnas usadas para la cromatografía de afinidad incluyen una columna de proteína A y una columna de proteína G. Los ejemplos de soportes utilizados para una columna de proteína A incluyen Hyper D, POROS y Sepharose F.F. También se pueden utilizar otros métodos de separación y purificación usados con proteínas ordinarias, y no hay limitaciones para los mismos.

El anticuerpo usado en el presente invento puede ser separado y purificado seleccionando y combinando adecuadamente, por ejemplo, una cromatografía distinta de la cromatografía de afinidad anteriormente mencionada, filtración, ultrafiltración, precipitación por adición de sales, o diálisis. Los ejemplos de otros tipos de cromatografía incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba y filtración en gel. Estos tipos de cromatografía pueden ser aplicados a la cromatografía de alta eficacia en fase líquida (HPLC; del inglés, high-performance liquid chromatography). Además, también se puede utilizar HPLC en fase inversa.

La concentración del anticuerpo obtenido del modo anteriormente descrito puede ser medida por medición de la absorbancia óptica, ELISA, etc. A saber, en el caso de medición de la absorbancia óptica, después de diluir adecuadamente con PBS (-), se mide la absorbancia óptica a 280 nm y luego se calcula la concentración basándose en que 1,35 unidades de densidad óptica (DO) representan 1 mg/ml. Además, la medición de la concentración por ELISA puede ser llevada a cabo de la manera descrita a continuación. A saber, se añaden 100 µl de anticuerpo de cabra anti-IgG humana (TAG), diluido hasta 1 µg/ml con tampón de bicarbonato 0,1 M (pH de 9,6), a una placa de 96 pocillos (Nunc), lo que va seguido de una incubación durante la noche a 4 °C para inmovilizar el anticuerpo en la placa. Después del bloqueo, se añaden 100 µl del anticuerpo usado en el presente invento, adecuadamente diluido, la muestra que contiene anticuerpo o un patrón de IgG humana (Cappel), lo que va seguido de una incubación durante 1 hora a temperatura ambiental.

Después del lavado de la placa, se añaden 100 µl de anticuerpo anti-IgG humana marcado con fosfatasa alcalina (BIOSOURCE), diluido a 5000x, lo que va seguido de una incubación durante 1 hora a temperatura ambiental. Después del lavado de la placa, se añade la disolución de sustrato, lo que va seguido de una incubación y luego la medición de la absorbancia óptica a 405 nm usando un dispositivo lector de microplacas, Modelo 3550 (BioRad), para calcular la concentración del anticuerpo objetivo.

Una variante de IL-6 es una sustancia que presenta actividad ligante con el receptor de IL-6 pero no trasmite la actividad biológica de IL-6. Es decir, aunque la variante de IL-6 compite con IL-6 por unirse al receptor de IL-6, puesto que no trasmite la actividad biológica de IL-6, la transmisión de señales por IL-6 queda interrumpida.

Se produce una variante de IL-6 al introducir una mutación por sustitución de un resto de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de IL-6. Aunque no hay limitación alguna en cuanto al origen del IL-6 que sirve como base de la variante de IL-6, es preferible la IL-6 humana en cuanto a antigenicidad, etc.

Más específicamente, esto se lleva a cabo pronosticando la estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos de IL-6 usando un conocido programa de modelado molecular, tal como WHATIF [Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56], y evaluando luego los efectos de la sustitución de todos los restos de aminoácido. Una vez determinado un adecuado resto de aminoácido a sustituir, al utilizar entonces como molde un vector que contiene una secuencia de bases que codifica el gen de IL-6 humano e introducir una mutación para que se sustituya el aminoácido mediante una PCR llevada a cabo del modo normal, se obtiene un gen que codifica la variante de IL-6. Éste pue-

de ser luego incorporado a un vector de expresión adecuado, según sea necesario, para obtener una variante de IL-6 de acuerdo con los métodos de expresión, producción y purificación de anticuerpos recombinantes anteriormente mencionados.

5 En Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93, Savino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367, y los Documentos WO 96-18648 y WO 96-17869, se describen ejemplos específicos de variantes de IL-6.

10 Un péptido parcial de IL-6 o un péptido parcial del receptor de IL-6 es una sustancia que presenta actividad ligante con el receptor de IL-6 o con IL-6, respectivamente, y no trasmite la actividad biológica de IL-6. Es decir, el péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 inhiben específicamente la unión de IL-6 con el receptor de IL-6 al capturar el receptor de IL-6 o IL-6 uniéndose a ellos. Como resultado, se interrumpe la transmisión de señales por IL-6 ya que no se transmite la actividad biológica de IL-6.

El péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 es un péptido que está compuesto de una secuencia de aminoácidos de una porción o la totalidad de la región implicada en la unión entre IL-6 y el receptor de IL-6 en la secuencia de aminoácidos de IL-6 o del receptor de IL-6. Dicho péptido está normalmente compuesto de 10 a 80, preferiblemente de 20 a 50, y más preferiblemente de 20 a 40, restos de aminoácido.

15 El péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 puede ser producido mediante un método mediante el cual se identifica la región implicada en la unión entre IL-6 y el receptor de IL-6 en la secuencia de aminoácidos de IL-6 o del receptor de IL-6, y se conoce normalmente una porción o la totalidad de esa secuencia de aminoácidos; los ejemplos de dicho método incluyen técnicas de ingeniería genética y métodos de síntesis peptídica.

20 El péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 puede ser producido utilizando técnicas de ingeniería genética al incorporar en un vector de expresión un DNA que codifica un péptido deseado y obtener el péptido deseado de acuerdo con los métodos de expresión, producción y purificación de anticuerpos recombinantes anteriormente mencionados.

25 El péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 puede ser producido utilizando métodos de síntesis peptídica, usando un método normalmente utilizado en la síntesis peptídica tal como un método de síntesis en fase sólida o un método de síntesis en fase líquida.

30 Más específicamente, esto se debería llevar a cabo de acuerdo con el método descrito en Zokuiyakuhiin-no-Kaihatsu, volumen 14, Peptide Synthesys, redactado por N. Yajima, Hirokawa Shoten Publishing (1991). En el caso de la síntesis en fase sólida, se utiliza un método en el que, por ejemplo, se alarga una cadena peptídica repitiendo alternamente una reacción en la que un aminoácido que corresponde al extremo C del péptido que se va a sintetizar es unido a un soporte que es insoluble en disolvente orgánico, y se unen secuencialmente, en orden del extremo C al extremo N, unos aminoácidos cuyos grupos  $\alpha$ -amino y grupos funcionales de cadena lateral están protegidos con grupos protectores adecuados, y se lleva a cabo una reacción en que se eliminan dichos grupos protectores de grupos  $\alpha$ -amino de aminoácidos o el péptido unido a la resina. Los métodos de síntesis peptídica en fase sólida se dividen en términos generales en el método Boc y el método Fmoc, dependiendo del tipo de grupos protectores usados.

35 Una vez sintetizado el péptido objetivo de este modo, se llevan a cabo una reacción de desprotección y una reacción para separar la cadena peptídica del soporte. En la reacción para separar la cadena peptídica, en el método Boc se utiliza normalmente fluoruro de hidrógeno o ácido trifluorometanosulfónico, mientras que en el método Fmoc se usa normalmente TFA. En el método Boc, por ejemplo, la susodicha resina con péptido protegido es tratada con fluoruro de hidrógeno en presencia de anisol. A continuación, se eliminan los grupos protectores y se separa el péptido del soporte, lo que va seguido de la recuperación del péptido. Luego se obtiene un péptido crudo sometiendo el producto a liofilización. Por otro lado, en el método Fmoc, por ejemplo, se pueden llevar a cabo una reacción de desprotección y una reacción para separar la cadena peptídica del soporte usando en TFA un procedimiento igual al anteriormente descrito.

40 El péptido crudo resultante puede ser separado y purificado por aplicación de HPLC. La elución se debería llevar a cabo bajo las condiciones óptimas usando un disolvente basado en agua-acetonitrilo, normalmente utilizado para la purificación de proteínas. La fracción que corresponde al pico del perfil cromatográfico resultante es luego separada y liofilizada. La fracción peptídica purificada de esta manera es luego identificada mediante análisis del peso molecular usando espectrometría de masas, análisis de la composición de aminoácidos o análisis de la secuencia de aminoácidos.

45 En la Publicación de Patente Japonesa No Revisada nº 2-188600, la Publicación de Patente Japonesa No Revisada nº 7-324097, la Publicación de Patente Japonesa No Revisada nº 8-311098 y la Patente de EE.UU. nº US 5210075 se describen ejemplos específicos de péptidos parciales de IL-6 y péptidos parciales del receptor de IL-6.

50 La actividad de un antagonista de IL-6 en cuanto a inhibir la transmisión de señales de IL-6 puede ser evaluada mediante métodos normalmente utilizados. Más específicamente, se cultiva una línea de mieloma humano dependiente de IL-6 (S6B45, KPMM2), la línea celular KT3 humana de linfoma T de Lennert o la línea celular MH60 o BSF2 dependiente de IL-6, lo que va seguido de la adición de IL-6 simultáneamente en presencia del antagonista de

IL-6 y la medición de la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina por las células dependientes de IL-6.

Además, se mide IL-6 marcada con  $^{125}\text{I}$ , unida a células que expresan el receptor de IL-6, cultivando células que expresan el receptor de IL-6 en forma de células U266, lo que va seguido de la adición de IL-6 marcada con  $^{125}\text{I}$  y la adición simultánea del antagonista de IL-6. En el sistema de ensayo anteriormente mencionado, además del grupo en que está presente el antagonista de IL-6, se proporciona un grupo testigo negativo que no contiene antagonista de IL-6, y, la comparación de los resultados obtenidos con los dos grupos hace posible evaluar la actividad inhibitoria de IL-6 por el antagonista de IL-6.

Como se indicará en los ejemplos que se describen más adelante, puesto que se han observado efectos inhibitorios del crecimiento sobre células de mesotelioma por parte de un anticuerpo anti-receptor de IL-6, un anticuerpo anti-receptor de IL-6 y otros antagonistas de IL-6, sugerimos que estos son útiles como agentes terapéuticos para el mesotelioma.

En el presente invento, el objetivo del tratamiento es un mamífero. El mamífero del objetivo del tratamiento es preferiblemente un ser humano.

El agente terapéutico para el mesotelioma o el inhibidor del crecimiento de células de mesotelioma del presente invento se puede administrar sistémica o localmente, sea oralmente o sea parenteralmente. Por ejemplo, se puede seleccionar la infusión intravenosa u otra forma de inyección intravenosa, la inyección intramuscular, la inyección intratorácica, la inyección intraperitoneal, la inyección subcutánea, supositorios, un enema, píldoras orales entéricamente revestidas, etc., y el método de administración puede ser adecuadamente seleccionado de acuerdo con la edad y los síntomas del paciente. La dosis eficaz es seleccionada en el intervalo de 0,01 mg a 100 mg por kilogramo de peso corporal por administración. Alternativamente, se puede seleccionar una dosis de 1 a 1000 mg, y preferiblemente de 5 a 50 mg, por paciente.

En el caso de un anticuerpo anti-receptor de IL-6, por ejemplo, la dosis y el método de administración preferibles son tales que la cantidad de anticuerpo libre presente en la sangre es la dosis eficaz, un ejemplo específico de los cuales es un método mediante el cual se administra usando un método tal como goteo intravenoso u otra forma de inyección intravenosa o inyección subcutánea, etc., de acuerdo con un programa de administración tal como dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas o una vez cada cuatro semanas, en una sola administración o dividida entre varias administraciones en una dosis de 0,5 mg a 40 mg, y preferiblemente de 1 mg a 20 mg, por mes (4 semanas) por 1 kilogramo de peso corporal. El programa de administración puede ser ajustado, tal como mediante prolongación del intervalo de administración de dos veces por semana o una vez por semana a una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas, mientras se observan el estado del paciente y las tendencias en los valores de pruebas sanguíneas.

El agente terapéutico para el mesotelioma o el inhibidor del crecimiento de células de mesotelioma del presente invento puede contener un vehículo o aditivo farmacéuticamente aceptable dependiendo de la vía de administración. Los ejemplos de dichos vehículos y aditivos incluyen agua, disolventes orgánicos farmacéuticamente aceptables, colágeno, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, polímero carboxivinílico, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilato sódico, arginato sódico, dextrano soluble en agua, carboximetilalmidón sódico, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma xantana, goma arábica, caseína, gelatina, agar, diglicerol, propilenglicol, polietilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido estearico, albúmina sérica humana (HSA; del inglés, human serum albumin), manitol, sorbitol, lactosa y agentes tensioactivos aceptables para uso como aditivos farmacéuticos. Aunque los aditivos utilizados son adecuadamente seleccionados o combinados de acuerdo con la forma farmacológica de entre los aditivos anteriormente mencionados, no se limitan a los anteriormente indicados.

### Ejemplos

Aunque lo siguiente proporciona una explicación detallada del presente invento a través de sus ejemplos y ejemplos de referencia, el presente invento no se limita a los mismos.

#### Ejemplo 1 – Producción de IL-6 por líneas celulares de mesotelioma maligno

Se inició el cultivo de las líneas celulares MSTO, H2052, H28, H226 y H2452 de mesotelioma maligno en una concentración celular de  $5 \times 10^4$ /pocillo en una placa de 24 pocillos que contenía líquido de cultivo [RPMI que contenía suero de ternera fetal (FCS) al 10%] y se sustituyó el líquido de cultivo celular el día siguiente, después de lo cual se cultivaron las células durante 3 días más, lo que fue seguido de la medición de las concentraciones de IL-6 en el sobrenadante del cultivo utilizando un sistema de inmunoensayo enzimático quimioluminiscente totalmente automatizado (Fujirebio, Lumipulse) y corrigiendo en cuanto a la cantidad de proteína celular. Los resultados se muestran en la Figura 1. Se repitió el experimento tres veces. Aunque la línea celular H28 no producía IL-6, las otras cuatro líneas producían IL-6. Las líneas celulares H2052 y H226 producían niveles particularmente elevados de IL-6.

#### Ejemplo 2 – Expresión de IL-6R en líneas celulares de mesotelioma maligno

Se midieron los niveles de expresión de receptor de IL-6 en cinco líneas celulares de mesotelioma maligno a nivel de mRNA. Se utilizaron células KT-3 como testigo positivo y se utilizaron sinoviocitos como testigo negativo. Se cultiva-

ron estas células durante 48 horas en RPMI que contenía FCS al 10% y se midió el mRNA que codifica el receptor de IL-6 (IL-6R) en las células mediante una reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR; del inglés, reverse transcription polymerase chain reaction) usando el sistema de PCR GeneAmp (Applied Biosystems) como dispositivo de detección. Los resultados se muestran en la Figura 2. En la Figura 2 (parte inferior) se indica la cantidad de mRNA de la GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) usada como testigo interno.

De acuerdo con estos resultados, se cree que las células de mesotelioma maligno apenas expresan receptor de IL-6. Puesto que el líquido pleural consiste en líquido pleural sanguinolento en los casos de mesotelioma pleural maligno, se supone que está presente el receptor soluble de IL-6 en grandes cantidades y se cree que éste está implicado en la transmisión de la irritación por IL-6.

#### Ejemplo 3 – Inducción de la producción de VEGF mediante estimulación por IL-6 (1)

Se cultivaron células tumorales de las líneas celulares H2052 y H2452 de mesotelioma maligno, en tres series, en placas de 24 pocillos con una concentración celular inicial de  $5 \times 10^4$ /pocillo en medio RPMI 1640. Al día siguiente, se sustituyó el líquido de cultivo celular, lo que fue seguido del inicio de la estimulación mediante (1) IL-6 recombinante (10 ng/ml), (2) IL-6 recombinante (10 ng/ml) + IL-6R soluble recombinante (100 ng/ml), y (3) inhibición mediante un anticuerpo anti-receptor de IL-6, el anticuerpo PM-1 humanizado (25 µg/ml) (véase el Documento WO 92/19759) (se usó RPMI como testigo de medio). Después de un cultivo durante 3 días más, se midieron las concentraciones del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en los sobrenadantes de los cultivos usando el kit de inmunoensayo Quantikine para VEGF humano (R & D Systems) y se corrigieron en cuanto a la cantidad de proteína celular.

Los resultados se muestran en la Figura 3. Como resulta evidente de estos gráficos, se indujo la producción de VEGF mediante estimulación por IL-6 en ambas líneas celulares, H2052 y H2452.

#### Ejemplo 4 – Inducción de la producción de VEGF mediante estimulación por IL-6 (2)

Se repitió el experimento del Ejemplo 3 usando la línea celular H28 de mesotelioma maligno. Los resultados se muestran en la Figura 4. Como resulta evidente de estos resultados, aunque la línea celular H28 produce niveles elevados de VEGF, no responde a la estimulación por IL-6.

#### Ejemplo 5 – Fosforilación de STAT3 mediante estimulación por IL-6

Se incubaron la línea celular H2025, en la que IL-6 induce la producción de VEGF, y la línea celular H28, en la que IL-6 no induce la producción de VEGF, en presencia de IL-6 recombinante (10 ng/ml) y receptor soluble recombinante de IL-6 (100 ng/ml) junto con el transductor de señales y activador de transcripción 3 (STAT3; del inglés, signal transducer and activator of transcription 3), lo que fue seguido del análisis de la fosforilación de STAT3 a p-STAT3 mediante transferencia Western tras 0 horas, 0,5 horas y 1 hora de incubación. Los resultados se muestran en la Figura 5.

Como resulta evidente de la Figura 5, se observó una notable fosforilación de STAT3 con la línea celular H2052 a los 30 minutos después de la estimulación por IL-6. Por contraste, con la línea celular H28 sólo se observó una ligera fosforilación de STAT3 en respuesta a la estimulación por IL-6. Además, en la Figura 5, p-STAT3 indica STAT3 fosforilado, mientras que STAT3 indica la suma de STAT3 fosforilado y STAT3 no fosforilado.

#### Ejemplo 6 – Inducción de SOCS3 mediante estimulación por IL-6

Se estimularon la línea celular H2025, en la que IL-6 induce la producción de VEGF, y la línea celular H28, en la que IL-6 no induce la producción de VEGF, por incubación en presencia de IL-6 recombinante (10 ng/ml) y receptor soluble recombinante de IL-6 (100 ng/ml), lo que fue seguido de la medición de los niveles de expresión del supresor 3 de la señalización de citocinas (SOCS3; del inglés, suppressor of cytokine signaling 3) y la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) inducidos, midiendo los niveles del mRNA que los codifica después de una multiplicación por RT-PCR tras 0 horas, 2 horas y 4 horas de incubación. Los resultados se muestran en la Figura 6.

Como resulta evidente de la Figura 6, se observó inducción de mRNA de SOCS3 2 horas después de la estimulación por IL-6 en la línea celular H2052. En la línea celular H28 se observó una expresión continuamente elevada de SOCS3.

#### Ejemplo 7 – Ensayo del promotor de VEGF

Se produjeron el plásmido pGL3-VEGF, que controla la expresión del gen de luciferasa por el promotor de VEGF, y el plásmido pGL3-VEGFmut, que controla la expresión del gen de luciferasa por un promotor de VEGF mutado (Figura 7).

Se transfectaron 50.000 células H2052 con 1 µg de pGL3-VEGF o pGL3-VEGFmut y se estimularon las células transfectadas con IL-6 recombinante (10 ng/ml) y receptor soluble recombinante de IL-6 (100 ng/ml). Después de estimular durante 2 días, se examinó la actividad luciferasa inducida por el promotor de VEGF y el promotor de VEGF mutado. Los resultados se muestran en la Figura 8.

Como resulta evidente de la Figura 8, en el caso de haber sido eliminado el sitio ligante de STAT3 fosforilado del promotor de VEGF, ya no se observa más la activación del promotor de VEGF a causa de la estimulación por IL-6. Basándose en los resultados de los Ejemplos 5, 6 y 7 anteriormente mencionados, se cree que la producción aumentada de VEGF en la línea celular H2052 a causa de la estimulación por IL-6 es mediada por un sistema de JAK-STAT. Este previsto sistema se muestra en la Figura 9.

Ejemplo 8 – Promoción del crecimiento de H2052 y H226 mediante la adición de IL-6 y receptor soluble de IL-6

Se diseminaron células de la línea celular H2052 en una placa de 96 pocillos que contenía medio RPMI que contenía FCS al 10%, en la cantidad de 500 células/pocillo, lo que fue seguido del cultivo en cinco series durante 6 a 7 días en presencia o ausencia de receptor recombinante soluble de IL-6 en una concentración de 100 ng/ml y en presencia de IL-6 en distintas concentraciones (0, 1, 10 y 100 ng/ml). Los resultados se muestran en la Figura 10 y la Figura 13. Como resulta evidente de estos gráficos, la línea celular H2052 y la línea celular H226 crecen dependientemente de la concentración de IL-6 en presencia de receptor recombinante soluble de IL-6 (100 ng/ml).

Ejemplo 9 – Inhibición de la promoción del crecimiento de células H2052 a causa de la adición de IL-6 e IL-6R, mediante un anticuerpo contra IL-6R (anticuerpo anti-IL-6R)

Con objeto de determinar si la promoción del crecimiento de las células H2052 por IL-6 y el receptor de IL-6 es inhibida o no por un anticuerpo anti-IL-6R, se diseminaron células H2052 en una placa de 96 pocillos que contenía medio RPMI que contenía FCS al 10%, en la cantidad de 500 células/pocillo, lo que fue seguido del cultivo en tres series durante 7 días en presencia de IL-6 recombinante soluble en una concentración de 10 ng/ml y receptor recombinante soluble de IL-6 en una concentración de 100 ng/ml y en presencia de anticuerpo PM-1 humanizado en diferentes concentraciones (0,1 y 25 µg/ml). Después del cultivo, se midió la cantidad de crecimiento de las células H2052 (DO 450) mediante el ensayo basado en MTS. Los resultados se muestran en la Figura 11. Como resultado, se determinó que el anticuerpo anti-IL-6 inhibe el crecimiento dependientemente de la concentración. Por otro lado, no se observaron efectos inhibitorios en el caso de añadir, como testigo, IgG1 humana en lugar de MRA en la misma concentración.

Ejemplo 10 – Promoción del crecimiento de células H226 mediante la adición de IL-6 y receptor soluble de IL-6, e inhibición mediante un anticuerpo anti-IL-6R

Se diseminaron células de la línea celular H226 en una placa de 96 pocillos que contenía medio RPMI que contenía FCS al 10%, en la concentración de 500 células/pocillo, lo que fue seguido del cultivo en tres series durante 7 días en presencia de receptor recombinante soluble de IL-6 en una concentración de 100 ng/ml y en presencia de IL-6 en diversas concentraciones (0, 1, 10 y 100 ng/ml). Los resultados se muestran en la Figura 12. Como resulta evidente del gráfico, las células H226 que producen niveles elevados de IL-6 crecieron dependientemente de la concentración de IL-6 en presencia de receptor recombinante soluble de IL-6 (100 ng/ml), mientras que su crecimiento fue inhibido por un anticuerpo anti-IL-6R del mismo modo que con las células H2052 que producen niveles elevados de IL-6.

Ejemplo 11 – Inhibición mediante un anticuerpo anti-receptor de IL-6, de la promoción del crecimiento de la línea celular H2052 y la línea celular H226, inducida mediante la adición de IL-6 y receptor soluble de IL-6

Se diseminaron células de la línea celular H2052 y la línea celular H225 en una placa de 96 pocillos en una cantidad de 200 células/pocillo, en medio RPMI que contenía FCS al 10%, lo que fue seguido del cultivo en cinco series durante 6 días en presencia de IL-6 (10 ng/ml) y receptor soluble de IL-6 (100 ng/ml) y en presencia de anticuerpo PM-1 humanizado en diversas concentraciones (0, 1 µg/ml y 5 µg/ml). Después del cultivo, se midieron los índices de crecimiento celular de la línea celular H2052 y la línea celular H226 mediante el ensayo basado en MTS. Los índices de crecimiento celular indicaban cuántas veces aumentaba el crecimiento celular en comparación con la ausencia de adición de IL-6/sIL-6R. Los resultados se muestran en la Figura 14. Como resultado, el anticuerpo anti-receptor de IL-6 inhibía completamente la acción promotora del crecimiento inducida en la línea celular H2052 y la línea celular H226 mediante la adición de IL-6/sIL-6R. Por otro lado, no se observaron efectos inhibitorios del crecimiento en el caso de añadir IgG1 humana (Sigma) en las mismas concentraciones, como testigo, en lugar del anticuerpo anti-receptor de IL-6.

Ejemplo 12 – Inhibición mediante un anticuerpo anti-receptor de IL-6, de la inducción de la producción de VEGF inducida por estimulación con IL-6

Se realizó un estudio sobre la inhibición de la inducción de la producción de VEGF inducida por estimulación con IL-6 en las líneas celulares MSTO, H226, H2052 y H2452 de mesotelioma maligno, por medio de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 3 con la excepción de las concentraciones del anticuerpo PM-1 humanizado (0,1 µg/ml y 5 µg/ml). Los resultados se muestran en la Figura 15. Como resultado, el anticuerpo anti-receptor de IL-6 inhibía completamente la inducción de la producción de VEGF inducida por estimulación con IL-6/sIL-6R. Por otro lado, no se observó acción inhibitoria sobre la inducción de la producción de VEGF en el caso de añadir IgG1 humana (Sigma) en las mismas concentraciones, como testigo, en lugar del anticuerpo anti-receptor de IL-6.



## Ejemplo 13 – Inhibición de la fosforilación de STAT3 mediante un anticuerpo anti-receptor de IL-6

Se realizó un estudio para determinar si la fosforilación de STAT3 inducida mediante estimulación por IL-6 (10 ng/ml) y receptor soluble de IL-6 (100 ng/ml) es inhibida por 5 µg/ml de anticuerpo anti-receptor de IL-6 en la línea celular H2052 y la línea celular H2452 que producen VEGF. Los resultados se muestran en la Figura 16. Como resultado, el anticuerpo anti-receptor de IL-6 inhibía significativamente el STAT3 fosforilado (p-STAT3) inducido mediante estimulación por IL-6/sIL-6R en células de mesotelioma maligno. Por otro lado, no se observó una significativa inhibición de la fosforilación de STAT3 en el caso de añadir IgG1 humana (Sigma) en la misma concentración, como testigo, en lugar del anticuerpo anti-receptor de IL-6.

## Ejemplo 14 – Efecto de un anticuerpo anti-VEGF sobre el crecimiento de células de mesotelioma maligno

Se diseminaron células de la línea celular H2052 y la línea celular H226 en una placa de 96 pocillos, en una cantidad de 500 células/pocillo, en medio RPMI que contenía FCS al 10%, lo que fue seguido de un cultivo en cinco series durante 6-7 días en presencia de IL-6 (10 ng/ml) y receptor recombinante soluble de IL-6 (100 ng/ml) y en presencia de 1 µg/ml de anticuerpo anti-VEGF. Después del cultivo, se examinaron las cantidades de crecimiento mediante el ensayo basado en MTS. Como testigo, se usó IgG1 humana (Sigma) en la misma concentración en lugar del anticuerpo anti-VEGF. Los resultados se muestran en la Figura 17. Como resultado, el anticuerpo anti-VEGF no inhibía el crecimiento celular inducido mediante estimulación por IL-6/sIL-6R. Basándose en este resultado, se determinó claramente que la acción de crecimiento sobre células de mesotelioma maligno inducida mediante estimulación por IL-6/sIL-6R no es mediada por VEGF.

## Ejemplo 1 de Referencia – Preparación de receptor soluble humano de IL-6

Se produjo receptor soluble de IL-6 por PCR usando el plásmido pBSF2R.236 que contiene un DNA que codifica el receptor de IL-6, obtenido de acuerdo con el método de Yamasaki et al. [K. Yamasaki et al., *Science* (1988) 241, 825-828]. Luego se sometió el plásmido pBSF2R.236 a digestión con la restrictasa SphI para obtener cDNA de receptor de IL-6 que fue insertado después en mp18 (Amersham). Se introdujo una mutación en el cDNA de receptor de IL-6 por PCR con el *In Vitro Mutagenesis System* (Amersham) usando un oligocebador sintético diseñado para insertar un codón de parada en el cDNA de receptor de IL-6. Como resultado de este procedimiento, se insertó un codón de parada en la posición del aminoácido 345 y se obtuvo un cDNA que codifica receptor soluble de IL-6.

Con objeto de que se expresara en células CHO el cDNA que codifica el receptor soluble de IL-6, se unió con el plásmido pSV (Pharmacia) para obtener el plásmido pSVL344. El cDNA de receptor soluble de IL-6, cortado con HindIII-Sall, fue luego insertado en el plásmido pECEdhfr que contiene cDNA de dhfr para obtener el plásmido de expresión pECEdhfr344 de células CHO.

Luego se usaron 10 µg del plásmido pECEdhfr344 para transfectar la línea DXB-11 de células dhfr-CHO [G. Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1980) 77, 4216-4220] de acuerdo con el método de precipitación con fosfato cálcico [C. Chen et al., *Mol. Cell. Biol.* (1987) 7, 2745-2751]. Las células CHO transfectadas fueron luego cultivadas durante 3 semanas en líquido de cultivo selectivo αMEM, exento de nucleósidos, que contenía glutamina 1 mM, FCS dializado al 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin.

Las células CHO seleccionadas fueron luego exploradas mediante un método de dilución limitante para obtener un único clon de células CHO. Este clon de células CHO fue multiplicado con metotrexato en una concentración de 20 nM a 200 nM para obtener la línea 5E27 de células CHO, productora de receptor soluble humano de IL-6. La línea 5E27 de células CHO fue cultivada en medio de Dulbecco modificado de Iscove [IMDM; del inglés, Iscove's modified Dulbecco's medium (Gibco)] que contenía FBS al 5%. Una vez recuperado el sobrenadante del cultivo, se midió mediante ELISA la concentración de receptor soluble de IL-6 en el sobrenadante del cultivo. Como resultado, se confirmó que estaba presente receptor soluble de IL-6 en el sobrenadante del cultivo.

## Ejemplo 2 de Referencia – Preparación de anticuerpo anti-IL-6 humana

Se inmunizó un ratón BALB/c con 10 µg de IL-6 recombinante [T. Hirano et al., *Immunol. Lett.* (1988) 17, 41] junto con adyuvante completo de Freund, y se continuó esta operación una vez a la semana hasta que se pudo detectar anticuerpo anti-IL-6 en el suero. Se extrajeron inmunocitos de ganglios linfáticos locales y se fusionaron con la línea celular P3U1 de mieloma usando polietilenglicol 1500. Se seleccionó un hibridoma de acuerdo con el método de Oi et al. usando líquido de cultivo HAT (Selective Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980), para establecer un hibridoma que producía anticuerpo anti-IL-6 humana.

Se llevó a cabo un ensayo de unión de IL-6 de la manera descrita más adelante sobre el hibridoma que producía anticuerpo anti-IL-6 humana. Es decir, una microplaca polivinílica flexible de 96 pocillos (Dynatech Laboratories, Alexandria, Virginia, EE.UU.) fue revestida durante la noche, a 4 °C, con 100 µl de anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón (10 µg/ml, Cooper Biomedical, Malvern, Pennsylvania, EE.UU.) en tampón 0,1 M de carbonato-hidrogenocarbonato (pH de 9,6). A continuación, la placa fue tratada durante 2 horas a temperatura ambiental con 100 µl de PBS que contenía albúmina sérica bovina (BSA; del inglés, bovine serum albumin) al 1%.

Una vez lavada la placa con PBS, se añadieron 100 µl de sobrenadante del cultivo de hibridomas a cada pocillo, lo

que fue seguido de incubación durante la noche a 4 °C. Se lavó la placa y se añadió IL-6 recombinante marcada con <sup>125</sup>I a cada pocillo, en una cantidad de 2000 cpm/0,5 ng/pocillo, lo que fue seguido de la medición de la radiactividad de cada pocillo después de un lavado usando un contador de radiación gamma (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, California, EE.UU.). 32 de 216 clones de hibridoma fueron positivos de acuerdo con el ensayo de unión de IL-6. De estos clones se obtuvo finalmente MH166.BSF2 estable. El anticuerpo MH166 anti-IL-6 producido por dicho hibridoma tenía el subtipo IgG1κ.

A continuación, se investigó la actividad neutralizante del anticuerpo MH166 sobre el crecimiento de hibridomas usando el clon MH60.BSF2 de hibridoma de ratón, dependiente de IL-6. Se repartieron células MH60.BSF2 entre los pocillos de una microplaca en una cantidad de 1 x 10<sup>4</sup>/200 µl/pocillo, lo que fue seguido de la adición de una muestra que contenía el anticuerpo MH166 y un cultivo durante 48 horas, y luego un cultivo adicional durante 6 horas después de la adición de <sup>3</sup>H-timidina (New England Nuclear, Boston, Massachusetts, EE.UU.) en una cantidad de 18.500 Bq/pocillo. Las células se colocaron luego sobre papel filtrante de fibra de vidrio y se trataron con un dispositivo recolector automático (Labo Mash Science, Tokio, Japón). Como testigo se usó anticuerpo de conejo anti-IL-6.

Como resultado, el anticuerpo MH166 inhibía, dependientemente del volumen, la incorporación de <sup>3</sup>H-timidina por células MH60.BSF2, inducida por IL-6. De este modo, se demostró claramente que el anticuerpo MH166 neutraliza la actividad de IL-6.

#### Ejemplo 3 de Referencia – Preparación de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humano

Se unió el anticuerpo MT18 anti-receptor de IL-6, producido de acuerdo con el método de Hirata et al. [Y. Hirata et al., J. Immunol. (1989), 143, 2900-2906], a Sepharose 4B activada (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, New Jersey, EE.UU.) de acuerdo con el protocolo adjunto para purificar el receptor de IL-6 [K. Yamasaki et al., Science (1989) 241, 825-828]. Se solubilizó la línea celular U266 de mieloma humano con hidrócloruro de fluoruro de (p-aminofenil)-metanosulfonilo (Wako Chemicals) que contenía digitonina (Wako Chemicals) al 1%, trietanolamina 10 mM (pH de 7,8) y NaCl 0,15 M (tampón de digitonina), y luego se mezcló con anticuerpo MT18 unido a glóbulos de Sepharose 4B. Los glóbulos fueron luego lavados seis veces con tampón de digitonina para obtener el receptor de IL-6 parcialmente purificado para inmunización.

Se inmunizó un ratón BALB/c, cuatro veces cada 10 días, con el susodicho receptor de IL-6 parcialmente purificado, obtenido de 3 x 10<sup>9</sup> células U266, lo que fue seguido de la producción del hibridoma de acuerdo con métodos ordinarios. Se investigó la actividad ligante del sobrenadante del cultivo de hibridomas de los pocillos de crecimiento positivo hacia el receptor de IL-6, de acuerdo con el método descrito más adelante. Se marcaron 5 x 10<sup>7</sup> células U266 con <sup>35</sup>S-metionina (92.500 kBq) y se solubilizaron con el tampón de digitonina anteriormente mencionado. Las células U266 solubilizadas fueron luego mezcladas con anticuerpo MT18 unido a glóbulos de Sepharose 4B que tenían un volumen de 0,04 ml, lo que fue seguido de seis lavados con tampón de digitonina, elución del receptor de IL-6 marcado con <sup>35</sup>S-metionina con 0,25 ml de tampón de digitonina (pH de 3,4) y neutralización con 0,025 ml de Tris 1 M (pH de 7,4).

Se mezclaron 0,05 ml de sobrenadante del cultivo de hibridomas con 0,01 ml de Sepharose-proteína G (Pharmacia). Después del lavado, se incubó la Sepharose con 0,005 ml de disolución de receptor de IL-6 marcado con <sup>35</sup>S-metionina, preparada del modo anteriormente descrito. Luego se analizó el inmunoprecipitado mediante SDS-PAGE y se investigó el sobrenadante del cultivo de hibridomas que reaccionaba 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 por el hibridoma PM-1 tiene el subtipo IgG1κ.

Se investigó la actividad del anticuerpo producido por el hibridoma PM-1 sobre el receptor de IL-6 humano en cuanto a inhibir la unión de IL-6, usando la línea celular U266 de mieloma humano. Se preparó IL-6 recombinante humana a partir de *E. coli* [T.Hirano et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41-45] y se marcó con <sup>125</sup>I usando el reactivo de Bolton-Hunter (New England Nuclear, Boston, Massachusetts, EE.UU.) [T. Taga et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981].

Se cultivaron 4 x 10<sup>5</sup> células U266 con sobrenadante del cultivo del hibridoma PM-1 al 70% (volumen/volumen) y 14.000 cpm de IL-6 marcado con <sup>125</sup>I, durante 1 hora. Se dispuso una capa de 70 µl de muestra sobre 300 µl de FCS en un tubo de polietileno para microcentrifuga, de 400 µl de capacidad, lo que fue seguido de centrifugación y medición de la radiactividad de las células.

Como resultado, se determinó claramente que el anticuerpo producido por el hibridoma PM-1 inhibe la unión de IL-6 con el receptor de IL-6.

#### Ejemplo 4 de Referencia – Preparación de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 de ratón

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

Se cultivaron células CHO que producían receptor soluble de IL-6 de ratón, en líquido de cultivo IMDM que contenía FCS al 10%, lo que fue seguido de la purificación del receptor soluble de IL-6 de ratón a partir del sobrenadante del cultivo usando una columna de afinidad en la que el anticuerpo RS12 anti-receptor de IL-6 de ratón (véase el suso-

dicho documento de T. Saito et al.) estaba inmovilizado en gel Affigel 10 (BioRad).

5 Se mezclaron 50 µg del resultante receptor soluble de IL-6 de ratón con adyuvante completo de Freund y se inyectó la mezcla en el abdomen de una rata Wistar. Se inmunizó adicionalmente la rata con adyuvante incompleto de Freund, comenzando dos semanas más tarde. Luego se recolectaron células esplénicas de la rata el día 45 y, después de fusionar  $2 \times 10^8$  células con  $1 \times 10^7$  células de la línea celular P3U1 de mieloma de ratón usando PEG1500 (Boehringer-Mannheim) al 50% de acuerdo con métodos ordinarios, se exploraron las células fusionadas en cuanto a hibridomas con medio HAT.

10 Después de añadir el sobrenadante del cultivo de hibridomas a una placa revestida con anticuerpo de conejo anti-IgG de rata (Cappel), se dejó que reaccionara el receptor soluble de IL-6 de ratón. A continuación, el hibridoma que producía anticuerpo contra el receptor soluble de IL-6 de ratón fue explorado por ELISA usando anticuerpo de conejo anti-receptor de IL-6 de ratón y anticuerpo de oveja anti-IgG de conejo, marcado con fosfatasa alcalina. Los clones de hibridoma en que se confirmó la producción de anticuerpo fueron subexplorados dos veces para obtener un solo clon de hibridoma. Ese clon fue denominado MR16-1.

15 Se investigó la actividad neutralizante de este hibridoma productor de anticuerpo durante la transmisión de información por IL-6 de ratón, de acuerdo con la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina usando células MH60.BSF2 [T. Matsuda et al., J. Immunol. (1988) 18, 951-956]. Se prepararon  $1 \times 10^4$  células MH60.BSF2/200 µl/pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 10 pg/ml de IL-6 de ratón y de 12,3 a 1000 ng/ml de anticuerpo MR16-1 o anticuerpo RS12 a esta placa y se cultivó durante 44 horas a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%, lo que fue seguido de la adición de 37.000 Bq de  $^3\text{H}$ -timidina/pocillo. 4 horas más tarde se midió la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina. Como resultado, el anticuerpo MR16-1  
20 inhibía la incorporación de  $^3\text{H}$ -timidina por células MH60.BSF2.

De este modo, se determinó claramente que el anticuerpo producido por el hibridoma MR16-1 (FERM BP-5875) inhibía la unión de IL-6 con el receptor de IL-6.

**REIVINDICACIONES**

1. Un anticuerpo contra el receptor de IL-6 para uso en el tratamiento del mesotelioma, en que dicho anticuerpo inhibe el crecimiento de células de mesotelioma.
- 5 2. Un anticuerpo de acuerdo con la Reivindicación 1 para el uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el mesotelioma es mesotelioma pleural.
3. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para el uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el mesotelioma pleural es mesotelioma pleural maligno.
4. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para el uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6.
- 10 5. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para el uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano.
6. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para el uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón.
- 15 7. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para el uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo recombinante.
8. Un anticuerpo de acuerdo con la Reivindicación 5 para el uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano es el anticuerpo PM-1, en que el anticuerpo PM-1 se produce a partir de una línea celular de hibridoma que ha sido internacionalmente depositada, basándose en el Tratado de Budapest, bajo la denominación FERM BP-5875 el 12 de julio de 1989 en el International Patent Organism Depository of the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japón.
- 20 9. Un anticuerpo de acuerdo con la Reivindicación 6 para el uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón es el anticuerpo MR16-1, en que el anticuerpo MR16-1 se produce a partir de una línea celular de hibridoma que ha sido internacionalmente depositada, basándose en el Tratado de Budapest, bajo la denominación FERM BP-5875 el 13 de marzo de 1997 en el International Patent Organism Depository of the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japón.
- 25 10. Un anticuerpo de acuerdo con cualquier reivindicación precedente para el uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 30 11. Un anticuerpo de acuerdo con la Reivindicación 10 para el uso de acuerdo con la Reivindicación 1, en que el anticuerpo humanizado contra el receptor de IL-6 es el anticuerpo PM-1 humanizado, en que el anticuerpo PM-1 se produce a partir de una línea celular de hibridoma que ha sido internacionalmente depositada, basándose en el Tratado de Budapest, bajo la denominación FERM BP-5875 el 12 de julio de 1989 en el International Patent Organism Depository of the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Japón.

FIGURA 1

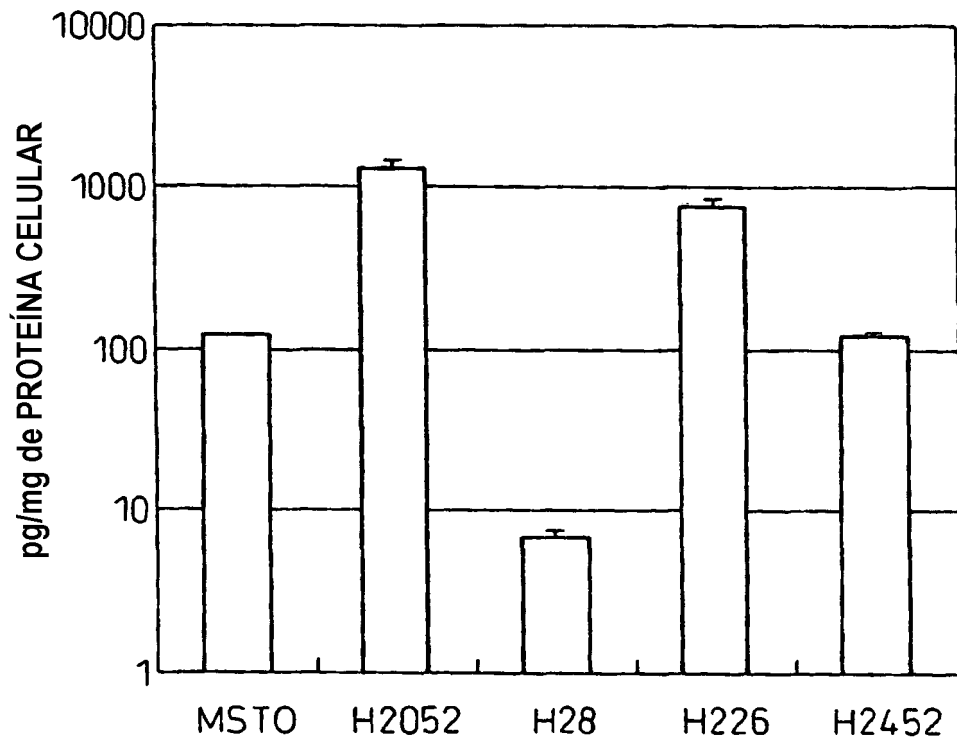


FIGURA 2

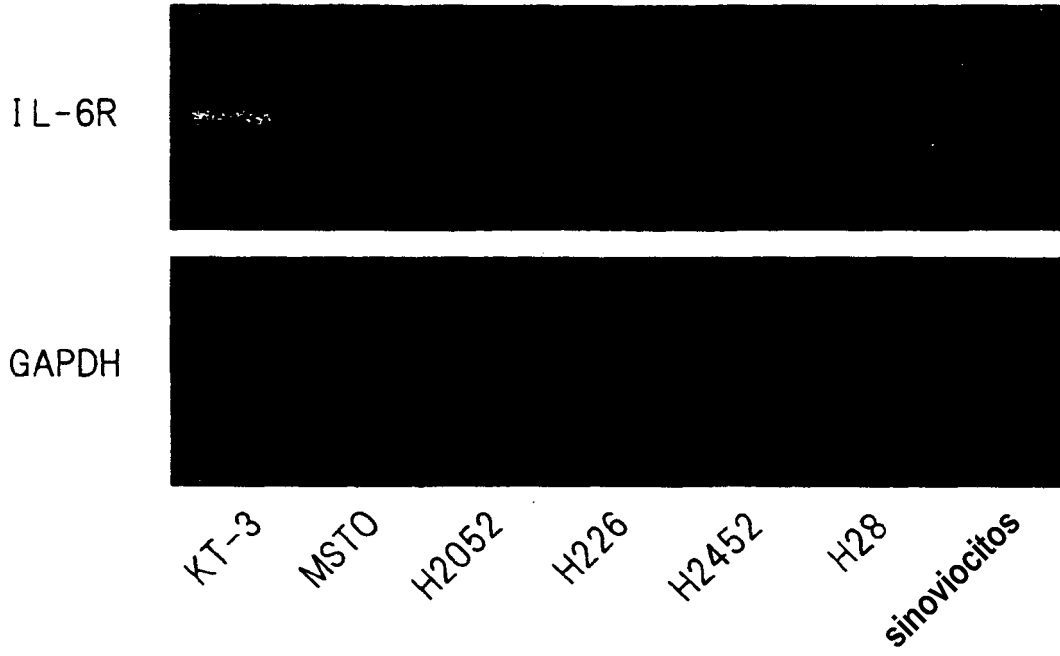
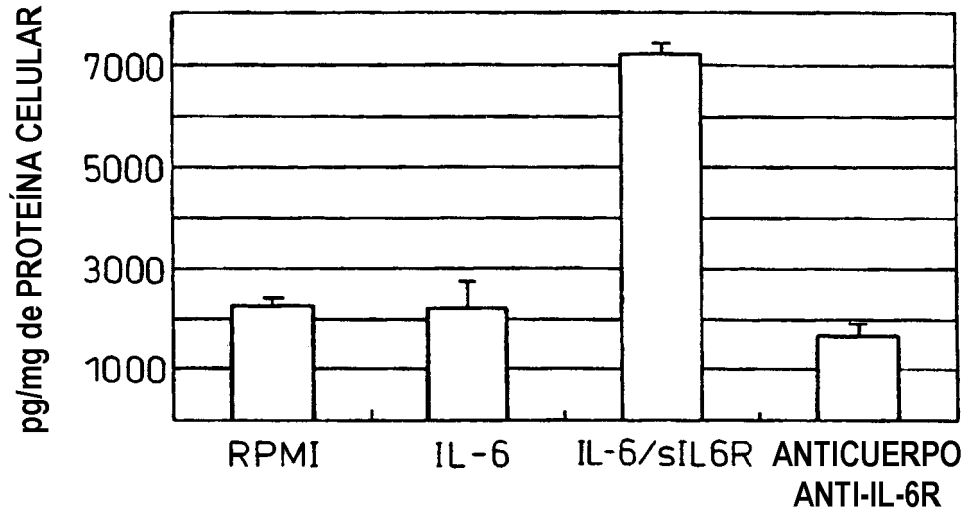


FIGURA 3

(A)



(B)

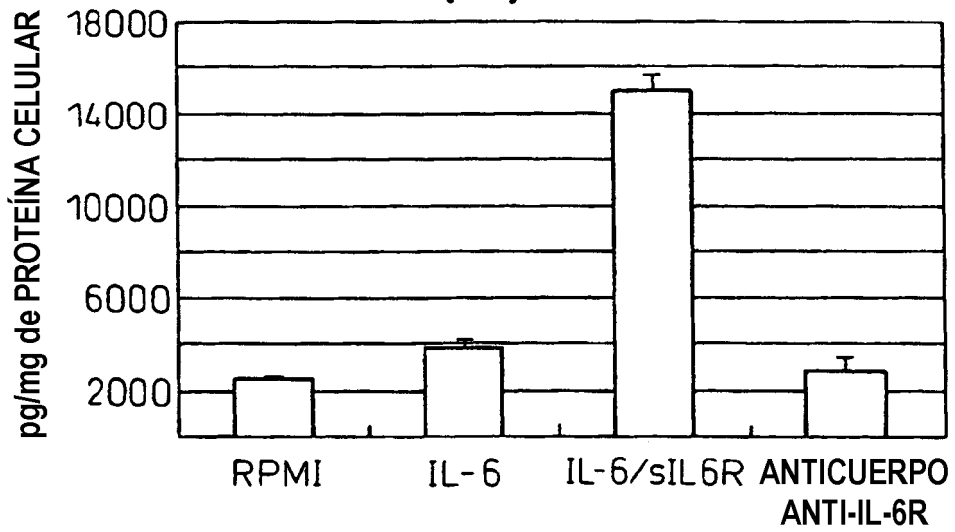


FIGURA 4

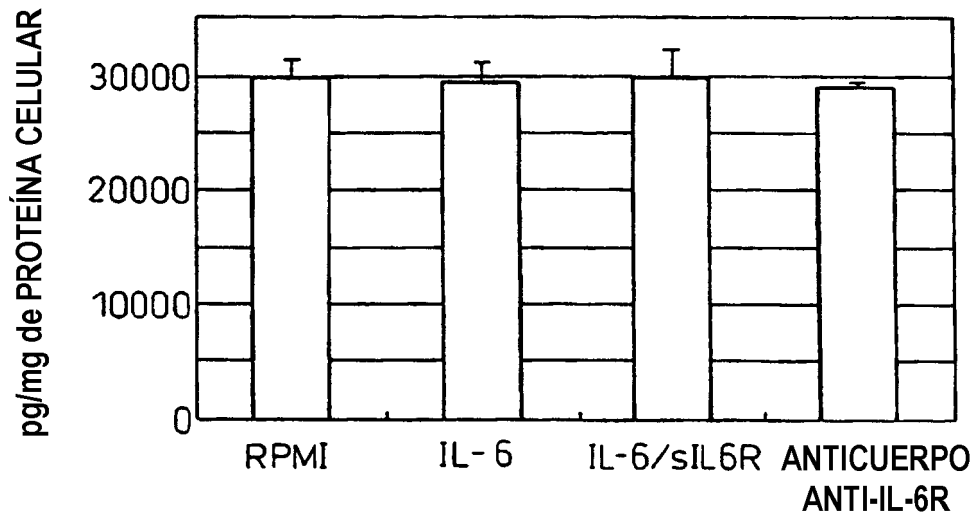




FIGURA 5

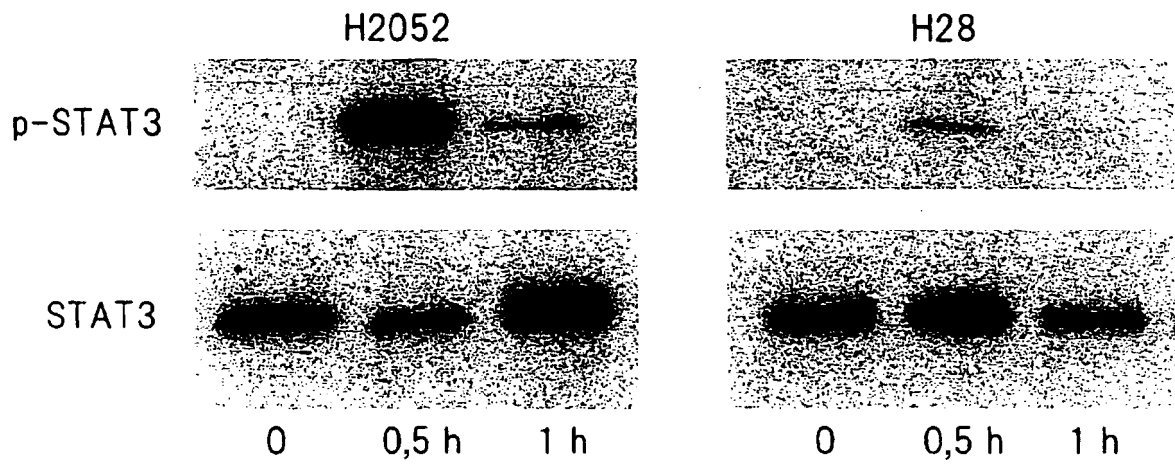


FIGURA 6

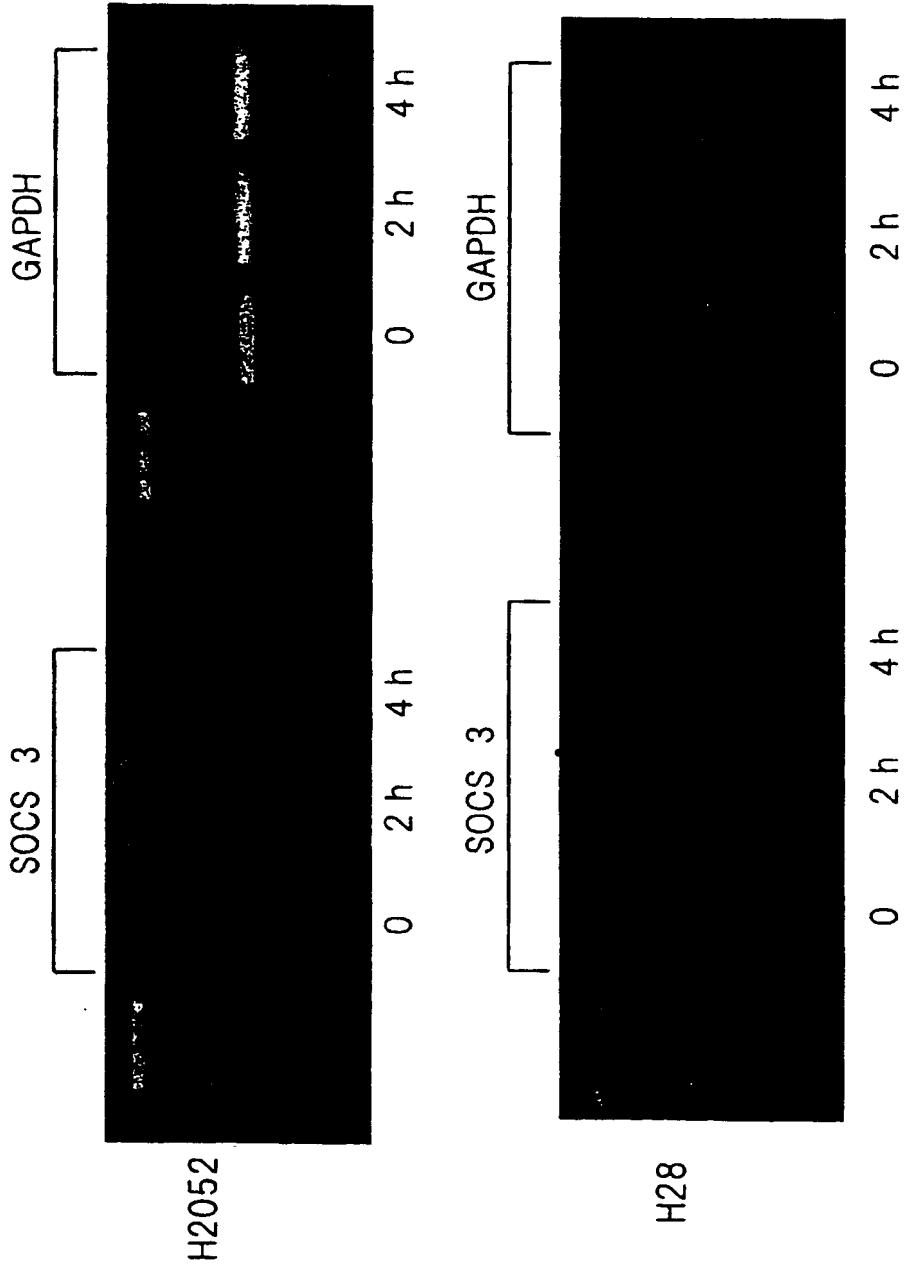


FIGURA 7

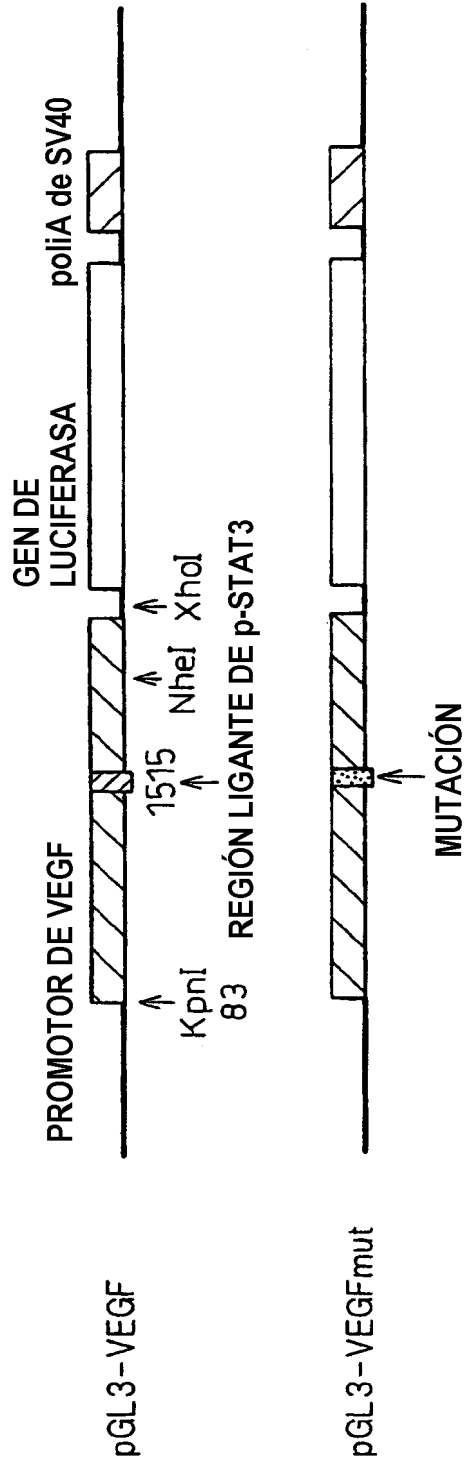


FIGURA 8

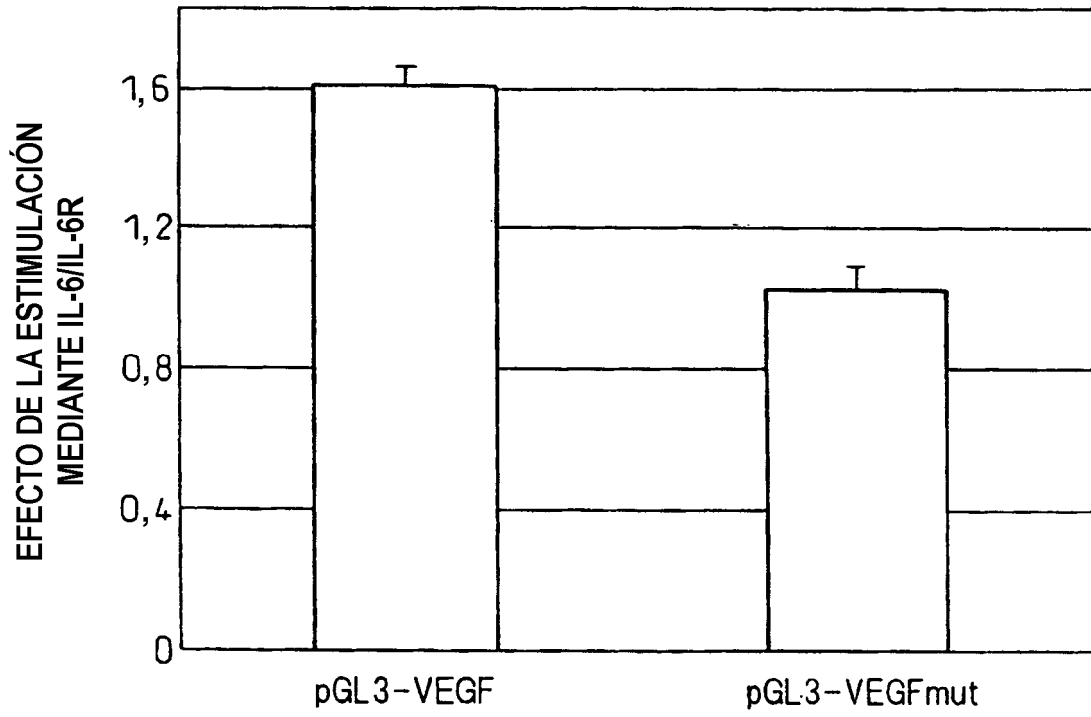


FIGURA 9

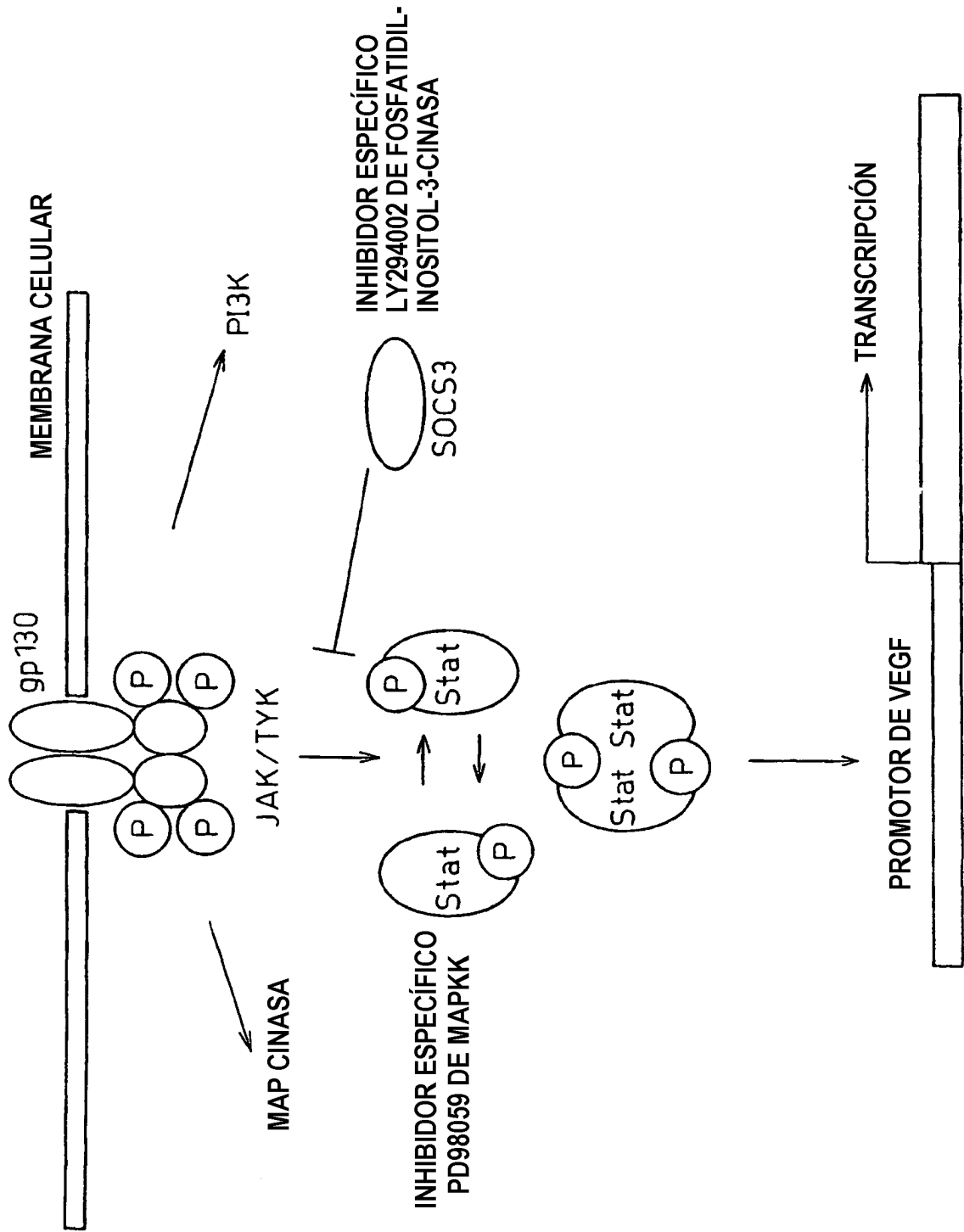
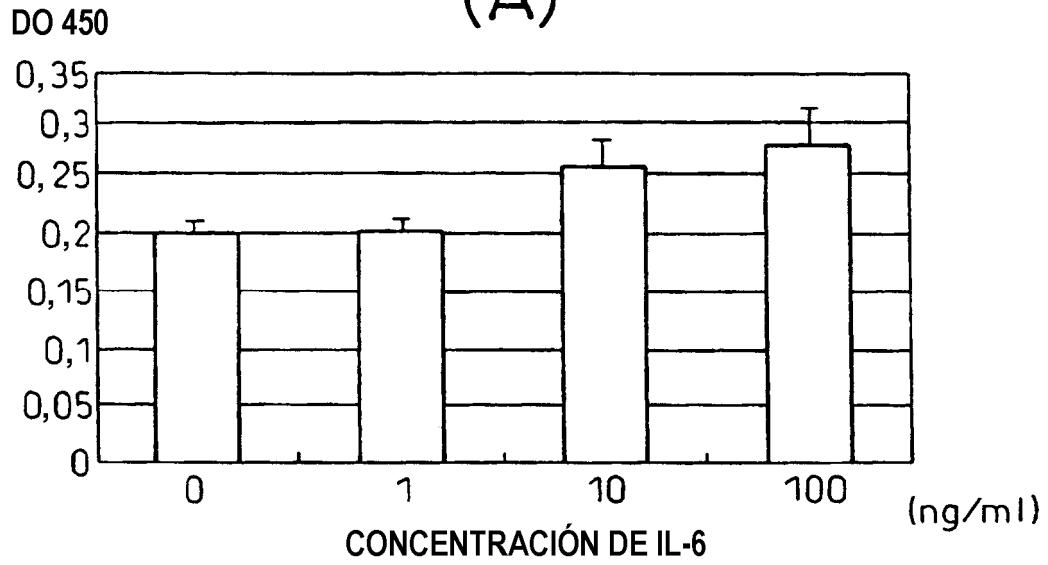


FIGURA 10

(A)



(B)

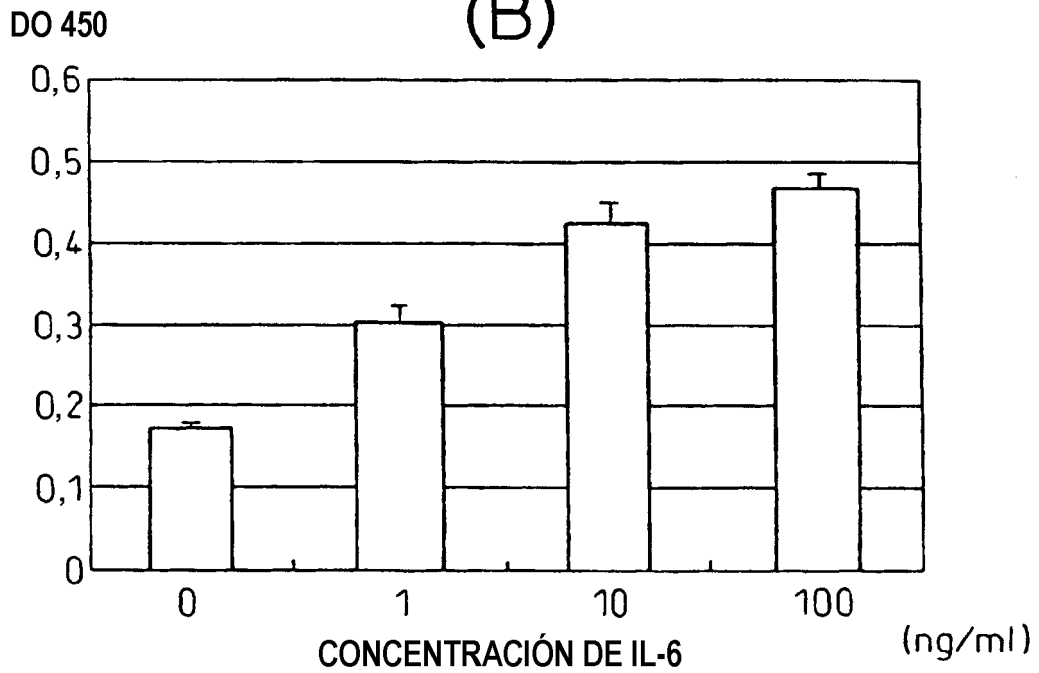
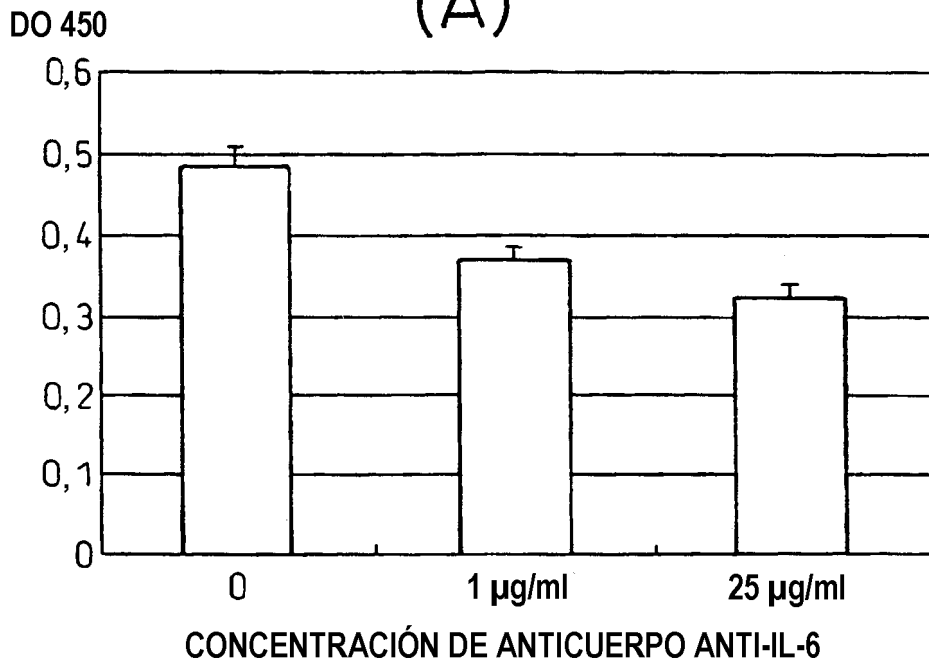


FIGURA 11

(A)



(B)

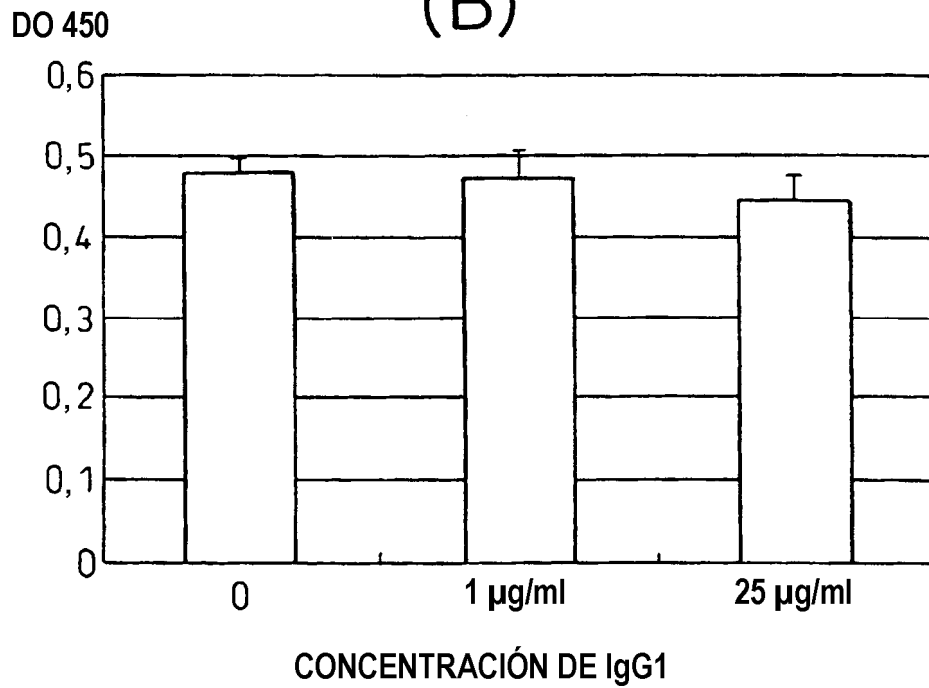


FIGURA 12

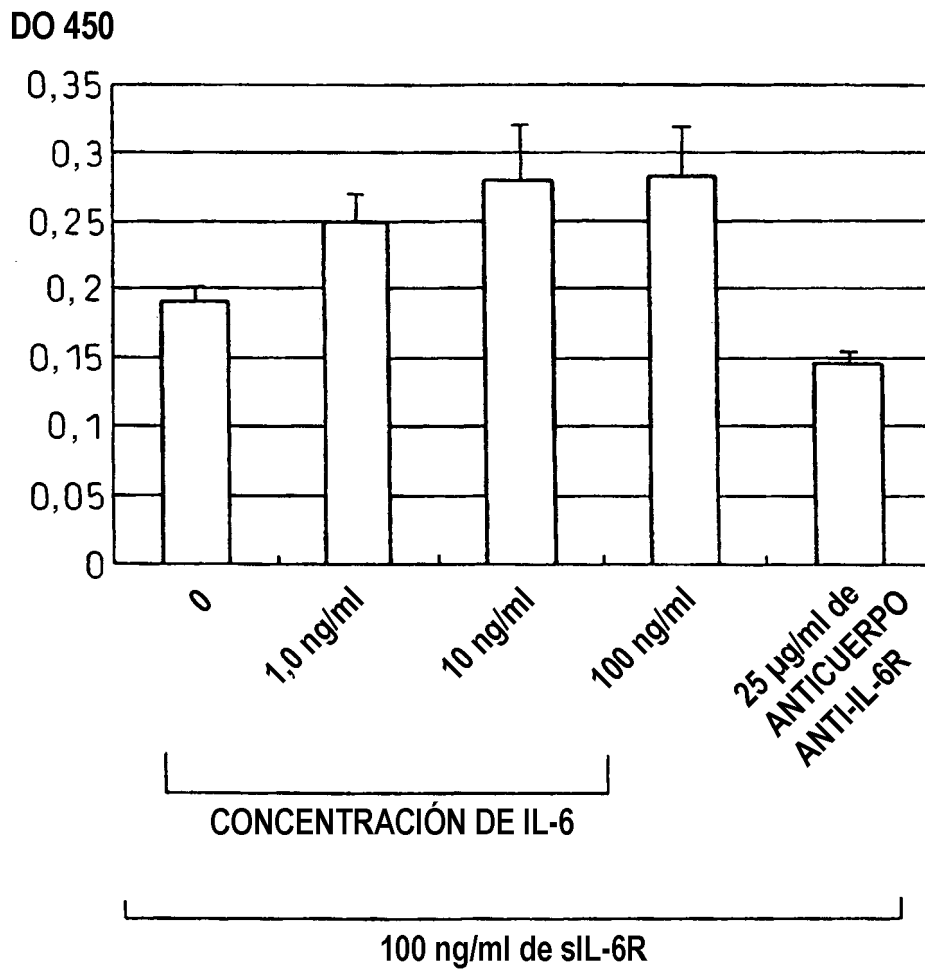




FIGURA 13

H226

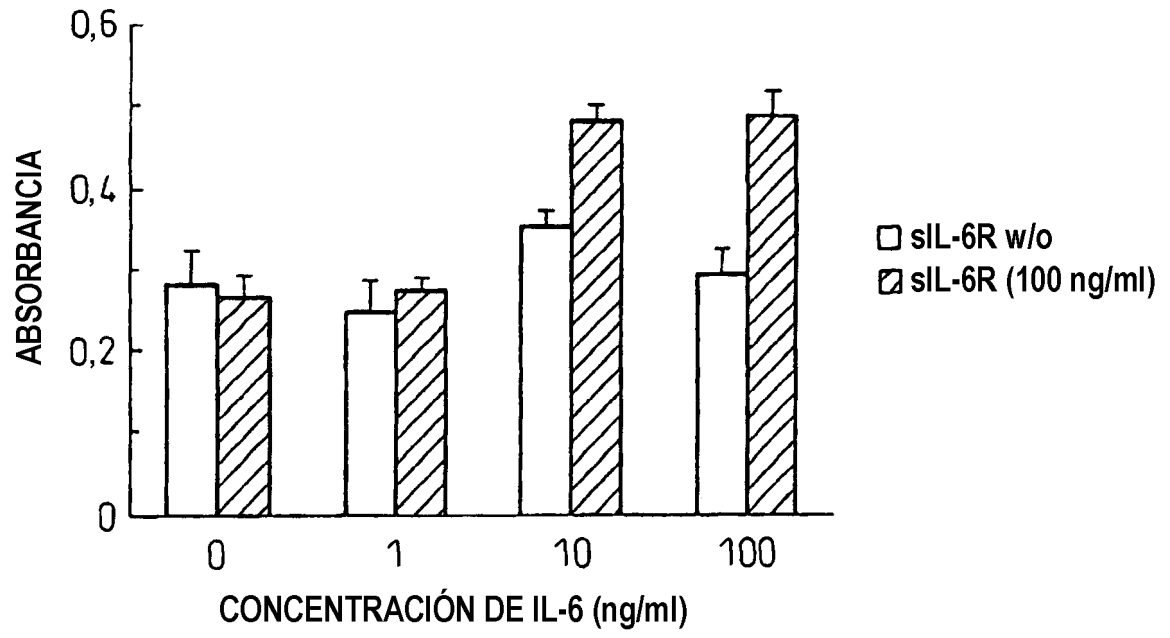
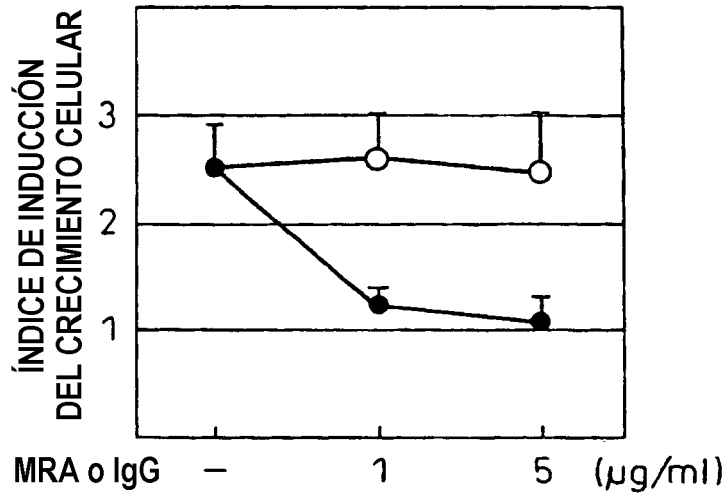


FIGURA 14

H2052



- ANTICUERPO PM-1 HUMANIZADO (MRA)
- IgG HUMANA

H226

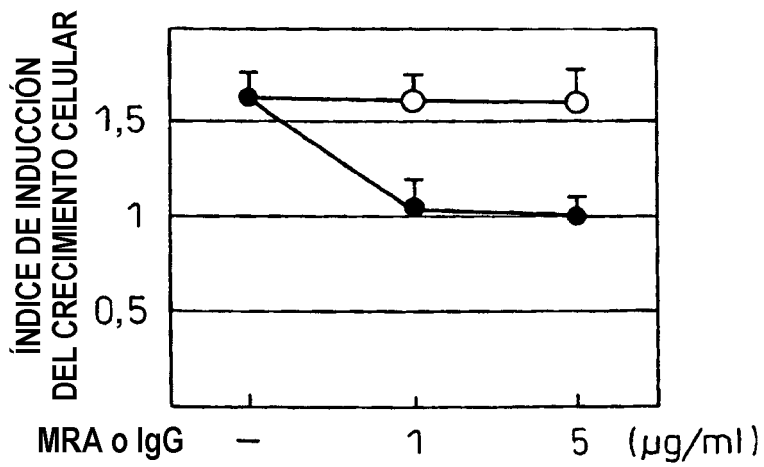


FIGURA 15

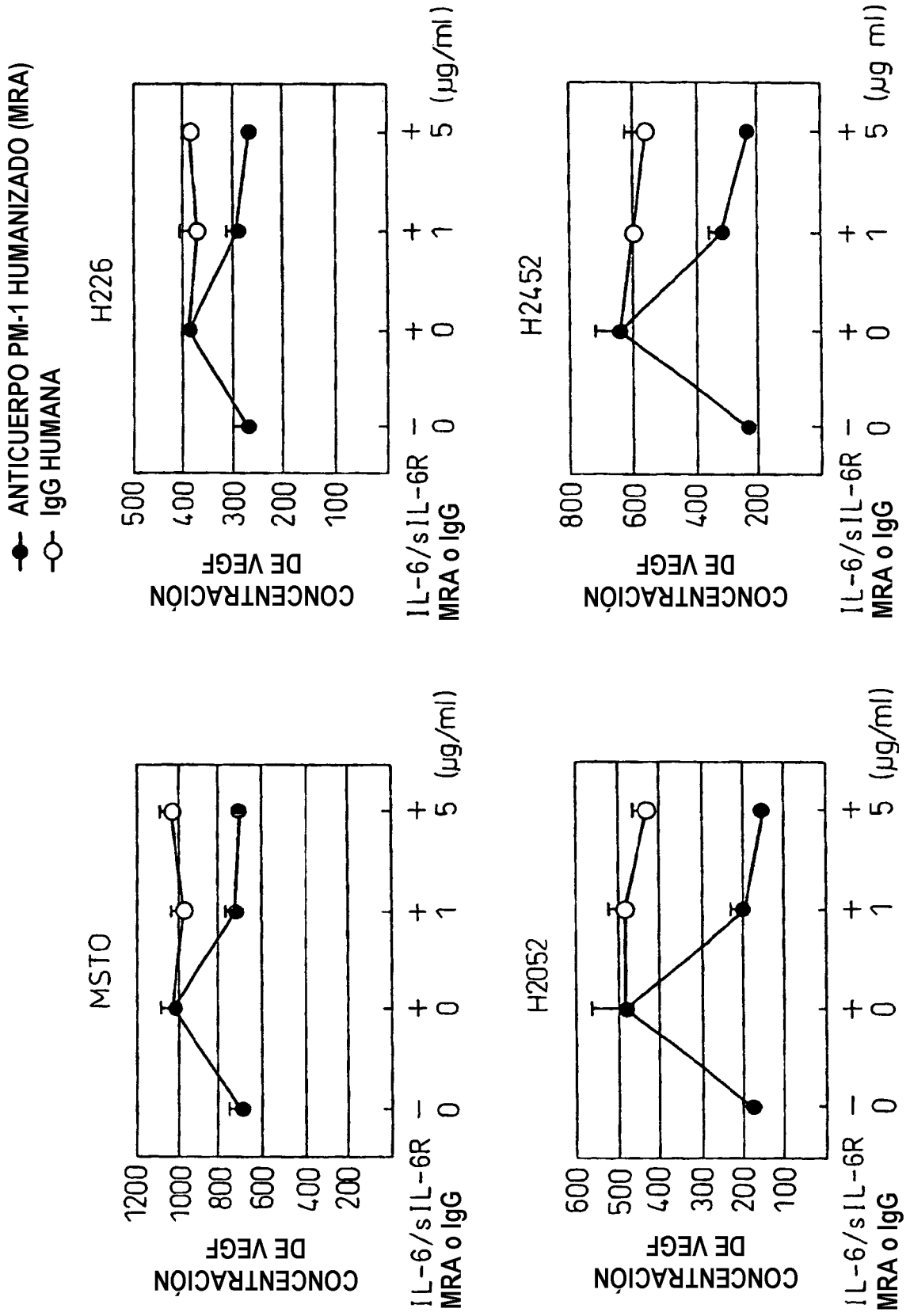


FIGURA 16

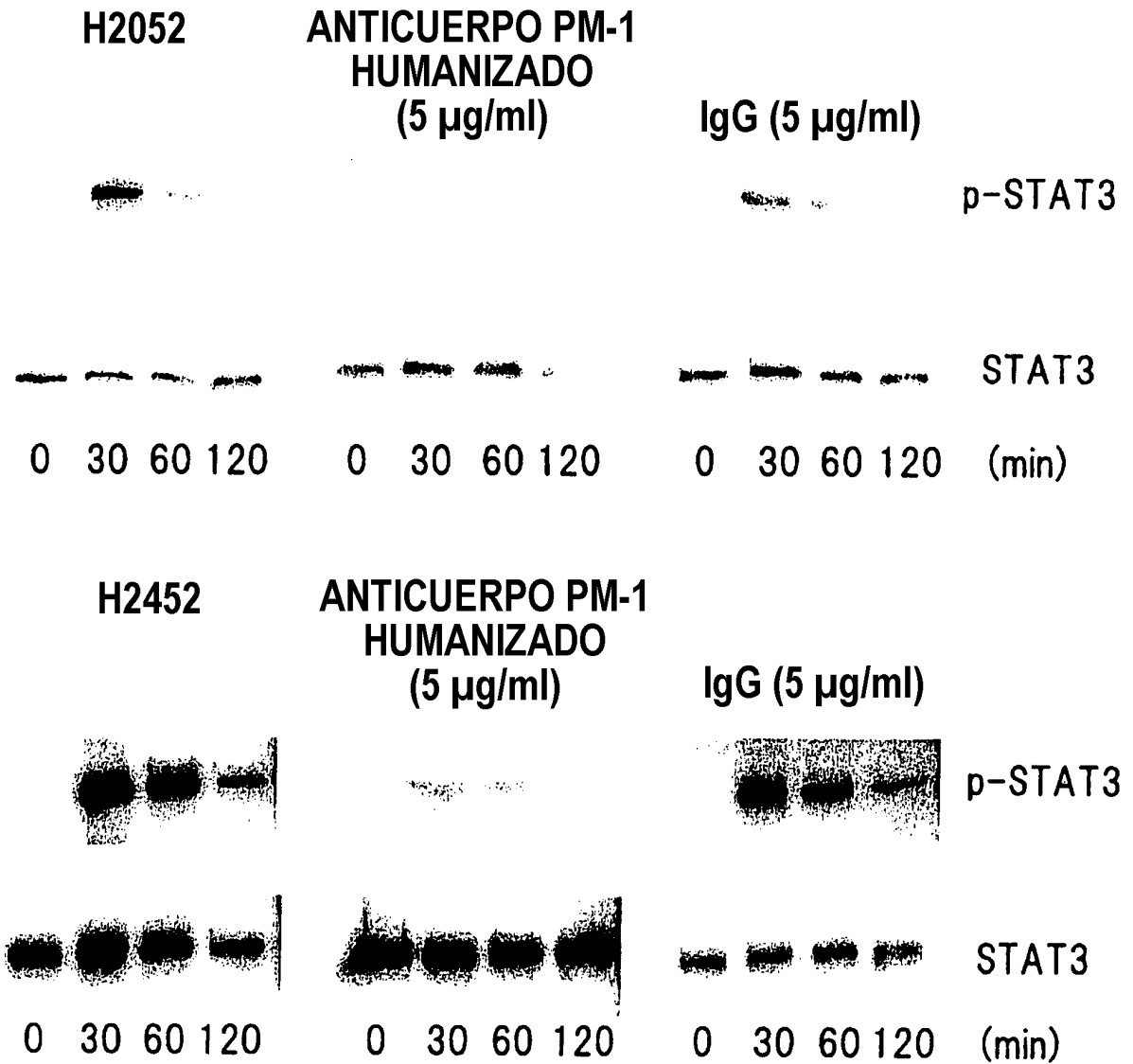


FIGURA 17

