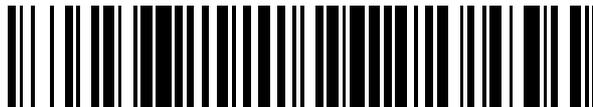


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 429 445**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2008** **E 08806216 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2013** **EP 2197915**

54 Título: **Método para el tratamiento de la glomerulonefritis**

30 Prioridad:

06.09.2007 GB 0717337

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.11.2013

73 Titular/es:

**UCB PHARMA S.A. (100.0%)
INTELLECTUAL PROPERTY DEPARTMENT
ALLÉE DE LA RECHERCHE 60
1070 BRUSSELS, BE**

72 Inventor/es:

**MARSHALL, DIANE y
SHAW, STEVAN**

74 Agente/Representante:

PÉREZ BARQUÍN, Eliana

ES 2 429 445 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

Método para el tratamiento de la glomerulonefritis

5 La presente invención se refiere a un nuevo uso terapéutico de agentes de anticuerpo que interactúan con o modulan la expresión o la actividad de IL-6. Más particularmente, la invención se refiere al uso de tales agentes en la terapia de la glomerulonefritis asociada con el síndrome de Goodpasture.

10 Se ha mostrado que IL-6 desempeña un papel central en la regulación inmunitaria, inflamación, hematopoyesis y oncogénesis. Dentro del sistema inmunitario, IL-6 induce la producción de anticuerpo por las células B aumentando la cantidad de inmunoglobulina policlonal. También induce la expresión del receptor de interleucina-2 (IL-2) en células T (Nomo *et al.*, 1987, Immunol. letters, 15, 3, 249-253) y promueve la producción de IL-2 en células T activadas induciendo de ese modo tanto el crecimiento como la diferenciación de células T citotóxicas (Okada *et al.*, 1988 J. Immunol, 141, 5, 1543-1549). También se sabe que IL-6 determina la diferenciación de monocitos a macrófagos (Chomarat *et al.*, 2000 Nature Immunol., 6:510-514).

15 La función de IL-6 no se limita a la respuesta inmunitaria ya que actúa en la hematopoyesis, trombopoyesis, formación de osteoclastos, provoca una respuesta de fase aguda hepática que da como resultado el aumento de proteína C reactiva (CRP) y proteína amiloide A del suero (SAA). Se sabe que es un factor de crecimiento para queratinocitos epidérmicos, células mesangiales renales, células de plasmacitoma y mieloma (Grossman *et al.*, 1989 Proc. Natl. Acad. Sci., 86, (16) 6367-6371; Horii *et al.*, 1989, J. Immunol, 143, 12, 3949-3955; Kawano *et al.*, 1988, Nature 332, 6159, 83-85). IL-6 se produce mediante una amplia gama de tipos celulares incluyendo monocitos/macrófagos, fibroblastos, queratinocitos epidérmicos, células endoteliales vasculares, células mesangiales renales, células gliales, condrocitos, células T y B y algunas células tumorales (Akira *et al.*, 1990, FASEB J., 4, 11, 2860-2867). Excepto para las células tumorales que producen de manera constitutiva IL-6, las células normales no expresan IL-6 a menos que se estimulen de manera apropiada.

20 El receptor de IL-6, IL-6R, se une a IL-6 con baja afinidad. Debido a que IL-6R no tiene un dominio intracelular de transducción de señales, la ligación sola de IL-6 a IL-6R no conduce a activación celular ya que también se requiere el elemento de transducción de señales, gp130. De manera similar, la expresión en la superficie celular de IL-6R no significa que la célula sea sensible a la estimulación por IL-6. La escisión proteolítica conduce a la liberación de IL-6R soluble (sIL-6R; sgp80) que puede unirse a IL-6 circulante y aumenta la semivida de IL-6. Tanto IL-6R soluble como unido a células contribuyen a la activación celular. La señalización de IL-6 a través de IL-6R unido a células se ha denominado señalización cis mientras que la activación celular a través de IL-6R soluble se ha descrito como señalización trans. Las células que expresan gp130 pero no IL-6R pueden estimularse mediante IL-6 a través de sIL-6R.

25 Se conocen anticuerpos neutralizantes y bloqueantes frente a IL-6 (Kalai *et al.*, 1997, Eur. J. Biochem. 249, 690-700; Brakenhoff *et al.*, 1990, Journal of Immunology, 145, 561-568; Wendling *et al.*, 1993, J. Rheumatology, 29, 259-262; patente estadounidense 5.856.135) así como autoanticuerpos neutralizantes (Hansen *et al.*, Eur. J. Immunol, 1995, 25, 348-354). También se han descrito anticuerpos terapéuticos frente a IL-6R (documento WO 2004039826 y Kishimoto, 2005, Ann. Rev. Immunol. 23:1-21), describiendo esta última referencia la eficacia en artritis reumatoide. También se ha notificado que el mismo anticuerpo ha mostrado eficacia en un estudio de fase II de enfermedad de Crohn. También se ha demostrado eficacia tanto con anticuerpos anti-IL-6 como anti-IL-6R en enfermedad similar a lupus en ratones NZB/W F1 (Fink *et al.*, 1994 J. Clin. Invest. 94, 585; Mihara *et al.*, 1998, Clin. Exp. Immunol. 112, 397) y el anticuerpo neutralizante frente al receptor de IL-6 murino suprimió colitis en un modelo de transferencia adoptiva de enfermedad (Yamamoto *et al.*, 2000, J. Immunol. 164, 4878; Atreya *et al.*, 2000 Nature Med. 6, 583). Liang *et al.* Immunology 119, 296-305 dan a conocer un anticuerpo monoclonal anti-IL6 que inhibe respuestas autoinmunitarias en un modelo murino de lupus eritematoso sistémico.

30 El síndrome de Goodpasture es una enfermedad autoinmunitaria que se caracteriza por la deposición de anticuerpos en la membrana basal glomerular (gbm) junto con complemento, una glomerulonefritis progresiva y a menudo insuficiencia renal. La reacción cruzada con la membrana basal en los pulmones provoca hemorragia pulmonar. El síndrome de Goodpasture afecta sobre todo a hombres blancos jóvenes con una preponderancia masculina de entre 2 y 9 a 1. Afecta a ambos sexos por igual en niños. La clasificación puede ser difícil porque algunas veces se ven afectados o bien los pulmones o bien los riñones, pero no ambos. Sin embargo, la presencia de autoanticuerpos en la membrana basal glomerular es el rasgo de diagnóstico siendo el rasgo patológico característico una glomerulonefritis rápidamente progresiva, mostrando la mayoría de los glomérulos semilunares de una fase similar (Salama y Pusey, 2002, Curr. Opin. Nephrology and Hypertension, 11:279-286).

35 En general, se usan tres tipos de tratamiento para el síndrome de Goodpasture. El tratamiento no farmacológico incluye intubación, ventilación asistida y hemodiálisis, que a menudo se requieren en la fase aguda. La plasmaféresis repetida elimina anticuerpos anti-membrana basal glomerular de la circulación. Sin embargo, la mayoría de los casos progresan hasta insuficiencia renal terminal en el plazo de algunos meses. La enfermedad renal terminal puede tratarse mediante hemodiálisis a largo plazo. El tratamiento farmacológico incluye corticosteroides a dosis alta con ciclofosfamida o azatioprina. La duración de la terapia inmunosupresora varía de

manera considerable y puede ser necesaria durante más de 12 a 18 meses en algunos pacientes. Con respecto a los tratamientos quirúrgicos, se ha descrito el cese de hemorragia pulmonar tras nefrectomía bilateral. El trasplante renal también se ha usado para tratar la enfermedad terminal. Debido a la naturaleza grave de estos remedios, son necesarias terapias más específicas y dirigidas para el tratamiento de la glomerulonefritis asociada con el síndrome de Goodpasture.

Hasta ahora no se conocía si IL-6 desempeñaba algún papel en la patogénesis del síndrome de Goodpasture, enfermedad de Wegener o nefropatía por IgA.

La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que IL-6 representa una diana terapéutica para el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con el síndrome de Goodpasture. La invención demuestra que inhibidores de la actividad de IL-6 son activos en un modelo animal de síndrome de Goodpasture. Específicamente, se ha demostrado que un anticuerpo anti-IL-6 que inhibe la actividad de IL-6 es activo en modelos animales de síndrome de Goodpasture.

Por consiguiente, la invención proporciona el uso de un anticuerpo o fragmento funcionalmente activo, que interacciona de manera selectiva con polipéptido de IL-6 o polipéptido de IL-6R para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con el síndrome de Goodpasture.

En la presente solicitud, el término "síndrome de Goodpasture" incluye púrpura pulmonar con síndrome de nefritis, nefritis por anticuerpos anti-gbm y nefritis por anticuerpos anti-gbm con hemorragia pulmonar. Por consiguiente, los métodos de tratamiento descritos en el presente documento también incluyen un método para el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con púrpura pulmonar, nefritis por anticuerpos anti-gbm y/o nefritis por anticuerpos anti-gbm con hemorragia pulmonar.

Los agentes que interaccionan con o modulan la expresión o la actividad de la actividad de IL-6 se denominan a continuación en el presente documento "inhibidores" de actividad de IL-6, en particular la actividad o expresión de IL-6.

Se conocen ampliamente en la técnica diversos inhibidores de la actividad de IL-6, así como métodos para identificar y producir tales inhibidores. Tales inhibidores pueden ser, sin limitación, anticuerpos, ácidos nucleicos (por ejemplo ADN, ARN, ARN antisentido y ARNip), hidratos de carbono, lípidos, proteínas, polipéptidos, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas y otros fármacos. Ejemplos de inhibidores adecuados incluyen, pero no se limitan a, un fragmento funcional sintético de la IL-6R que se une a IL-6 e interfiere con la unión a la IL-6 nativa, un anticuerpo que se une a IL-6 o a la IL-6R e interfiere con la interacción de ligando a IL-6R, un anticuerpo que se une a IL-6 e interfiere con la interacción de IL-6-gp130, una molécula de ácido nucleico antisentido que se hibrida específicamente con ARNm que codifica para IL-6 o IL-6R o una molécula pequeña, por ejemplo NCE, u otro fármaco que inhibe la actividad de IL-6 o IL-6R.

El agente empleado en la presente descripción es un anticuerpo que preferiblemente reconoce de manera específica IL-6 o IL-6R. Por tanto, el agente para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con el síndrome de Goodpasture es de manera adecuada un anticuerpo que interacciona con (es decir se une a o reconoce) o modula la actividad de IL-6. En un ejemplo, los anticuerpos interaccionan de manera selectiva con IL-6. Los más preferidos son anticuerpos que interaccionan específicamente con IL-6, preferiblemente IL-6 humana. Interaccionar de manera específica con (por ejemplo reconocer o unirse a) significa que los anticuerpos tienen una afinidad mayor por IL-6 que por otros polipéptidos. Ejemplos de anticuerpos adecuados son aquéllos que inhiben la actividad de IL-6 mediante la unión a IL-6 de tal manera que impidan que sea biológicamente activa, por ejemplo impidiendo la unión de IL-6 a su receptor.

En otro ejemplo, los anticuerpos interaccionan de manera selectiva con el receptor de IL-6, IL-6R. Interaccionar de manera selectiva con (por ejemplo reconocer o unirse a) significa que los anticuerpos tienen una afinidad mayor por el polipéptido de IL-6R que por otros polipéptidos. Ejemplos de anticuerpos adecuados son aquéllos que impiden la unión de IL-6 al receptor de IL-6. Por consiguiente, se proporciona mediante la presente invención el uso de un anticuerpo anti-IL-6R para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con el síndrome de Goodpasture.

Pueden usarse polipéptidos de IL-6 o de IL-6R o células que expresan dichos polipéptidos para producir anticuerpos, por ejemplo que reconocen específicamente dichos polipéptidos de IL-6 o de IL-6R. Los polipéptidos de IL-6 y de IL-6R pueden ser polipéptidos "maduros" o fragmentos biológicamente activos o derivados de los mismos. Los polipéptidos de IL-6 y de IL-6R pueden prepararse mediante procedimientos ampliamente conocidos en la técnica a partir de células huésped modificadas mediante ingeniería genética que comprenden sistemas de expresión o pueden recuperarse de fuentes biológicas naturales. En la presente solicitud, el término "polipéptidos" incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Éstos se usan de manera intercambiable a menos que se especifique lo contrario. Los polipéptidos de IL-6 y de IL-6R en algunos casos pueden ser parte de una proteína más grande tal como una proteína de fusión por ejemplo fusionada con una etiqueta de afinidad. Los anticuerpos generados frente a un polipéptido de IL-6 o de IL-6R pueden obtenerse administrando los polipéptidos a un animal, preferiblemente un

animal no humano, usando protocolos de rutina y ampliamente conocidos, véase por ejemplo Handbook of Experimental Immunology, D.M.Weir (ed.), Vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Inglaterra, 1986. Pueden inmunizarse muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, pollos, vacas o cerdos. Sin embargo, en general se prefieren ratones, conejos, cerdos y ratas.

5 El término "anticuerpo" tal como se usa en el presente documento incluye anticuerpos completos y fragmentos funcionalmente activos o derivados de los mismos y pueden ser, pero no se limitan a anticuerpos policlonales, monoclonales, multivalentes, multiespecíficos, humanizados o quiméricos, anticuerpos de cadena sencilla, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y F(ab')₂, fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab,
10 anticuerpos antiidiotípicos (anti-Id), y fragmentos de unión a epítipo de cualquiera de los anteriores (véase por ejemplo Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136). Los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulina y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulina, es decir moléculas que contienen un sitio de unión a antígeno que se une específicamente a un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo IgG, IgE, IgM, IgD o IgA) o subclase de
15 molécula de inmunoglobulina.

Los anticuerpos para su uso en la invención pueden producirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica. Tales anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos policlonales, monoclonales, humanizados, derivados de presentación en fago o anticuerpos quiméricos.

20 Los anticuerpos monoclonales pueden prepararse mediante cualquier método conocido en la técnica tal como la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, Nature, 1975, 256:495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de células B humanas (Kozbor *et al.*, Immunology Today, 1983, 4, 72) y la técnica de EBV-hibridoma (Cole *et al.*, "Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy", págs. 77-96, Alan R Liss, Inc., 1985).

25 También pueden generarse anticuerpos para su uso en la invención usando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales mediante la clonación y expresión de ADNc de región variable de inmunoglobulina generados a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos mediante, por ejemplo, los métodos descritos por Babcook, J. *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93(15), 7843-7848, documentos WO 92/02551, WO 2004/051268 y WO 2004/106377.

Los anticuerpos quiméricos son los anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulina que se han modificado mediante ingeniería genética de modo que los genes de la cadena ligera y pesada están compuestos por segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a especies diferentes.

35 Los anticuerpos humanizados son moléculas de anticuerpo que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una especie no humana y una región de entramado de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, el documento US 5.585.089).

40 Se conocen ampliamente en la técnica métodos para crear y fabricar anticuerpos recombinantes (véase por ejemplo, Boss *et al.*, documento US 4.816.397; Cabilly *et al.*, documento US 6.331.415; Simmons *et al.*, 2002, Journal of Immunological Methods, 263, 133-147; Shrader *et al.*, documento WO 92/02551; Orlandi *et al.*, 1989, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 86, 3833; Riechmann *et al.*, 1988, Nature, 322, 323; Queen *et al.*, documento US 5.585.089; Adair, documento WO 91/09967; Mountain y Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev, 10, 1-142; Verma *et al.*, 1998, J. Immunol. Methods, 216:165-181; Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech. 23(9):1126-1136).

Los anticuerpos para su uso en la presente invención también pueden generarse usando diversos métodos de presentación en fago conocidos en la técnica e incluyen los dados a conocer por Brinkman *et al.*, 1995, J. Immunol. Methods, 182:41-50; Ames *et al.*, 1995, J. Immunol. Methods, 184, 177-186; Kettleborough *et al.* 1994, Eur. J. Immunol., 24, 952-958; Persic *et al.*, 1997, Gen, 187, 9-18; y Burton *et al.*, 1994, Advances in Immunol., 57, 191-280; documentos WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; y WO 95/20401; y documentos US 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743; y 5.969.108.

55 Además, pueden usarse ratones transgénicos, u otros organismos, incluyendo otros mamíferos, para producir anticuerpos (véase por ejemplo el documento US 6.300.129).

Se conocen ampliamente en la técnica fragmentos de anticuerpo y métodos para producirlos, véase por ejemplo Verma *et al.*, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181.

60 Ejemplos particulares de fragmentos de anticuerpo para su uso en la presente invención son fragmentos Fab' que tienen una región bisagra nativa o modificada. Ya se han descrito varias regiones bisagra modificadas, por ejemplo, en los documentos US 5.677.425, WO 9915549 y WO 9825971.

65 Los ejemplos adicionales de fragmentos de anticuerpo particulares para su uso en la presente invención incluyen los descritos en las solicitudes de patente internacional WO 2005003169, WO 2005003170 y WO 2005003171. En

particular, se prefieren los fragmentos Fab de anticuerpo modificado descritos en el documento WO 2005003169.

Los anticuerpos para su uso en la invención incluyen análogos y derivados que se modifican, por ejemplo pero sin limitación, mediante el enlace covalente de cualquier tipo de molécula. Preferiblemente, dicho enlace no perjudica la unión inmuno-específica. Por tanto, un anticuerpo para su uso en la presente invención puede conjugarse con una o más moléculas efectoras. Preferiblemente, una molécula efectora puede aumentar la semivida del anticuerpo *in vivo*, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o potenciar la administración de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunitario. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de ese tipo incluyen polímeros, dextrano, hidroxipropilmetacrilamida (HPMA), albúmina, proteínas de unión a albúmina o compuestos de unión a albúmina tales como los descritos en el documento WO 2005117984.

Cuando la molécula efectora es un polímero, en general, puede ser un polímero sintético o que se produce de manera natural, por ejemplo un polímero de polialquileno, polialquilenilo o polioxialquileno de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituido o un polisacárido ramificado o no ramificado, por ejemplo un homo o heteropolisacárido. Véanse por ejemplo, Veronese y Pasut, 2005, *Drug Discovery Today*, 10(21):1451-1458; Pasut *et al.*, 2004, *Expert Opinion in Therapeutic Patents*, 14(6):859-894.

Los sustituyentes opcionales particulares que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente incluyen uno o más grupos hidroxilo, metilo o metoxilo.

Los ejemplos particulares de polímeros sintéticos incluyen poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos o derivados de los mismos, especialmente poli(etilenglicol) opcionalmente sustituido tal como metoxipoli(etilenglicol) o derivados del mismo.

Los polímeros que se producen de manera natural particulares incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de los mismos.

“Derivados” tal como se usa en el presente documento pretende incluir derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos selectivos de tiol tales como maleimidias y similares. El grupo reactivo puede unirse directamente o a través de un segmento de ligador al polímero. Se apreciará que el residuo de un grupo de ese tipo en algunos casos formará parte del producto como grupo de unión entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

El tamaño del polímero puede variarse según se desee, pero en general estará en un intervalo de peso molecular promedio de desde 500 Da hasta 50000 Da, preferiblemente desde 5000 hasta 40000 Da y más preferiblemente desde 20000 hasta 40000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse en particular basándose en el uso pretendido del producto, por ejemplo, capacidad para localizarse en determinados tejidos tales como tumores o extender la semivida circulante (para una revisión véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Por tanto, por ejemplo, cuando se pretende que el producto deje la circulación y penetre en el tejido, por ejemplo para su uso en el tratamiento de la glomerulonefritis, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo con un peso molecular de aproximadamente 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de peso molecular mayor, por ejemplo que tiene un peso molecular en el intervalo de desde 20000 Da hasta 40000 Da.

Los polímeros particularmente preferidos incluyen un polímero de polialquileno, tal como un poli(etilenglicol) o, especialmente, un metoxipoli(etilenglicol) o un derivado de los mismos, y especialmente con un peso molecular en el intervalo de desde aproximadamente 15000 Da hasta aproximadamente 40000 Da.

En un ejemplo, anticuerpos para su uso en la presente invención se unen a restos de poli(etilenglicol) (PEG). En un ejemplo particular, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG pueden unirse a través de cualquier grupo funcional de aminoácido terminal o de cadena lateral de aminoácido disponible ubicado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Tales aminoácidos pueden producirse de manera natural en el fragmento de anticuerpo o pueden incorporarse mediante ingeniería en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véanse por ejemplo los documentos US 5.219.996; US 5.667.425; WO 98/25971). En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado en el que la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada de uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula efectora. Preferiblemente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o más residuos de cisteína al/a los que puede unirse la molécula efectora. Pueden usarse múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG.

Preferiblemente, las moléculas de PEG se unen covalentemente a través de un grupo tiol de al menos un residuo de cisteína ubicado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede unirse covalentemente al átomo de azufre de un residuo de cisteína ubicado en el fragmento. La unión covalente será generalmente un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se usa un grupo tiol como punto de unión, pueden usarse moléculas efectoras activadas de manera apropiada, por ejemplo derivados selectivos de tiol tales como maleimidias y derivados de cisteína. Un polímero activado puede usarse como material de partida en la preparación de fragmentos de anticuerpo modificados por polímero tal como se

describió anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo de tiol tal como un éster o ácido α -halocarboxílico, por ejemplo yodoacetamida, una imida, por ejemplo maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro. Tales materiales de partida pueden obtenerse comercialmente (por ejemplo de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.) o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles comercialmente usando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen metoxi-PEG-amina de 20K (que puede obtenerse de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (que puede obtenerse de Nektar, anteriormente Shearwater).

En una realización, el anticuerpo es un fragmento Fab modificado que está pegilado, es decir tiene PEG (poli(etilenglicol)) unido covalentemente al mismo, por ejemplo según el método dado a conocer en el documento EP 0948544 [véase también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, Nueva York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris y S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, Nueva York; Chapman, A. 2002, Advanced Drug Delivery Reviews 2002, 54:531-545]. En un ejemplo, PEG se une a una cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab modificado mediante PEG tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un grupo tiol individual en una región bisagra modificada. Un residuo de lisina puede unirse covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amina en el residuo de lisina puede unirse un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. Por tanto, el peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede ser de aproximadamente 40.000 Da.

En un ejemplo, la molécula efectora es PEG y se une usando los métodos descritos en los documentos WO 98/25971 y WO 2004072116 mediante los cuales un grupo de lisil-maleimida se une al residuo de cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada, y cada grupo amino del residuo de lisilo tiene unido covalentemente un residuo de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. Por tanto, el peso molecular total del PEG unido al anticuerpo es de aproximadamente 40.000 Da.

El PEG se une a estos fragmentos reduciendo en primer lugar el enlace disulfuro intercatenario entre las cisteínas intercatenarias de CL y CH1 y posteriormente uniendo el PEG a los tioles libres. Una vez que PEG se ha unido a las cisteínas intercatenarias no hay enlace disulfuro intercatenario entre la cadena pesada y ligera. Se conocen ampliamente en la técnica agentes reductores adecuados para reducir el enlace disulfuro intercatenario, por ejemplo los descritos en Singh *et al.*, 1995, Methods in Enzymology, 251, 167-73. Los ejemplos particulares incluyen agentes reductores a base de tiol tales como glutatión reducido (GSH), β -mercaptoetanol (β -ME), β -mercaptoetilamina (β -MA) y ditiotreitól (DTT). Otros métodos incluyen usar métodos electrofíticos, tal como el método descrito en Leach *et al.*, 1965, Div. Protein. Chem, 4, 23-27 y usar métodos de fotorreducción, tal como el método descrito en Ellison *et al.*, 2000, Biotechniques, 28 (2), 324-326. Sin embargo, preferiblemente, el agente reductor es un agente reductor no a base de tiol, preferiblemente uno de los agentes reductores de trialquilfosfina (Ruegg UT y Rudinger, J., 1977, Methods in Enzymology, 47, 111-126; Burns J *et al.*, 1991, J.Org.Chem, 56, 2648-2650; Getz *et al.*, 1999, Analytical Biochemistry, 273, 73-80; Han y Han, 1994, Analytical Biochemistry, 220, 5-10; Seitz *et al.*, 1999, Euro.J.Nuclear Medicine, 26, 1265-1273), ejemplos particulares de los cuales incluyen tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), tris-butilfosfina (TBP), tris-(2-cianoetil)fosfina, tris-(3-hidroxipropil)fosfina (THP) y tris-(2-hidroxietil)fosfina. Los más preferidos son los agentes reductores TCEP y THP. Resultará evidente para un experto en la técnica que la concentración de agente reductor puede determinarse empíricamente, por ejemplo, variando la concentración de agente reductor y midiendo el número de tioles libres producidos. Normalmente el agente reductor se usa en exceso con respecto al fragmento de anticuerpo por ejemplo en un exceso molar de entre 2 y 1000 veces. Preferiblemente el agente reductor está en un exceso de 2, 3, 4, 5, 10, 100 ó 1000 veces. En una realización se usa el reductor a entre 2 y 5 mM.

La reducción y las reacciones de pegilación pueden realizarse en general en un disolvente, por ejemplo una disolución tampón acuosa tal como acetato o fosfato, a pH aproximadamente neutro, por ejemplo de aproximadamente pH 4,5 a aproximadamente pH 8,5, normalmente de pH 4,5 a 8, de manera adecuada de pH 6 a 7. Las reacciones pueden realizarse en general a cualquier temperatura adecuada, por ejemplo entre aproximadamente 5°C y aproximadamente 70°C, por ejemplo a temperatura ambiente. El disolvente puede contener opcionalmente un agente quelante tal como EDTA, EGTA, CDTA o DTPA. Preferiblemente el disolvente contiene EDTA a entre 1 y 5 mM, preferiblemente 2 mM. Alternativa o adicionalmente el disolvente puede ser un tampón quelante tal como ácido cítrico, ácido oxálico, ácido fólico, bicina, tricina, tris o ADA. El PEG se empleará en general en una concentración en exceso con respecto a la concentración del fragmento de anticuerpo. Normalmente el PEG está en un exceso molar de entre 2 y 100 veces, preferiblemente un exceso de 5, 10 ó 50 veces.

Cuando sea necesario, el producto deseado que contiene el número deseado de moléculas de PEG puede separarse de cualquier material de partida u otro producto generado durante el proceso de producción por medios convencionales, por ejemplo mediante técnicas de cromatografía tales como intercambio iónico, exclusión molecular, cromatografía de afinidad por proteína A, G o L o cromatografía de interacción hidrófoba.

Para identificar inhibidores de la actividad de IL-6 los expertos en la técnica pueden adoptar varios enfoques diferentes. En un ejemplo, se identifican inhibidores identificando en primer lugar agentes que interaccionan con IL-6

o IL-6R y posteriormente sometiendo a prueba esos agentes para identificar los que inhiben la actividad de IL-6. En un ejemplo de ese tipo el agente es un anticuerpo.

5 Los agentes que interactúan con IL-6 o IL-6R pueden identificarse usando cualquier método adecuado, por ejemplo usando un sistema de ensayo basado en células o libre de células en el que el polipéptido de IL-6 o de IL-6R se pone en contacto con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato para interactuar con el polipéptido. Preferiblemente, la capacidad de un agente candidato para interactuar con un polipéptido de IL-6 o de IL-6R se compara con un intervalo de referencia o control. Si se desea, este ensayo puede usarse para examinar una pluralidad (por ejemplo una biblioteca) de agentes candidatos usando una pluralidad de
10 muestras de polipéptido de IL-6 o de IL-6R. En un ejemplo de un ensayo libre de células, se ponen en contacto una primera y una segunda muestra que comprenden polipéptido de IL-6 o de IL-6R nativo o recombinante con un agente candidato o un agente control y se determina la capacidad del agente candidato para interactuar con el polipéptido comparando la diferencia en la interacción entre el agente candidato y el agente control. Preferiblemente, en primer lugar se inmoviliza el polipéptido, por ejemplo, poniendo en contacto el polipéptido con un anticuerpo inmovilizado que lo reconoce y se une específicamente al mismo, o poniendo en contacto una preparación de polipéptido purificada con una superficie diseñada para unirse a proteínas. El polipéptido puede estar parcial o completamente purificado (por ejemplo estar parcial o completamente libre de otros polipéptidos) o formar parte de un lisado celular. Además, el polipéptido puede ser una proteína de fusión que comprende el polipéptido de IL-6 o de IL-6R o una parte biológicamente activa del mismo y un dominio tal como glutatiónina-S-transferasa o la región Fc de IgG1. Alternativamente, el polipéptido puede biotinilarse usando técnicas ampliamente conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo kit de biotinilación, Pierce Chemicals; Rockford, IL). La capacidad del agente candidato para interactuar con el polipéptido puede determinarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo ELISA, BIAcore™, citometría de flujo o tecnología de ensayo de microvolumen fluorescente (FMAT, Fluorescent Microvolume Assay Technology). En otro ejemplo en el que se usa un ensayo basado en
20 células, se pone en contacto una población de células que expresan IL-6 o IL-6R con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato para interactuar con el polipéptido. Preferiblemente, la capacidad de un agente candidato para interactuar con IL-6 o IL-6R se compara con un intervalo de referencia o control. La célula, por ejemplo, puede ser de origen eucariota (por ejemplo levadura o mamífero) y puede expresar el polipéptido de IL-6 o de IL-6R de manera endógena o modificarse mediante ingeniería genética para expresar el polipéptido. En algunos casos, se marca el polipéptido de IL-6 o de IL-6R o el agente candidato, por ejemplo con un marcador radioactivo (tal como ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I) o un marcador fluorescente (tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído o fluorescamina) para permitir la detección de una interacción entre un polipéptido y un agente candidato. También pueden usarse métodos alternativos tales como ELISA, citometría de flujo y FMAT.

35 Los agentes que inhiben la actividad de IL-6 pueden identificarse mediante cualquier método adecuado, por ejemplo:

- (i) comparando la actividad de IL-6 en presencia de un agente candidato con la actividad de dicho polipéptido en ausencia del agente candidato o en presencia de un agente control; y
40
(ii) determinando si el agente candidato inhibe la actividad de IL-6.

Tales ensayos pueden usarse para examinar agentes candidatos, en monitorización clínica o en el desarrollo de fármacos.
45

Tal como se describió anteriormente, los agentes pueden examinarse previamente cuando sea apropiado para identificar los agentes (por ejemplo un anticuerpo) que interactúan con IL-6 o IL-6R antes de examinar los agentes que se unen para determinar su capacidad de inhibir la actividad de IL-6.

50 En un ejemplo, se usa un sistema de ensayo basado en células para identificar agentes que pueden inhibir la actividad de IL-6. En un ejemplo particular, un ensayo usado para identificar inhibidores de actividad de IL-6 incluye la inhibición de la proliferación dependiente de IL-6 de la línea celular de plasmacitoma T1165 o la línea celular DS-1 tal como se describe en Sawamura *et al.* (1990, Growth Factors, 3, 181-190; Bock *et al.*, 1993, Cytokine, 5, 480-489).

55 Alternativamente pueden identificarse inhibidores en un sistema de ensayo basado en células. Por consiguiente, una población de células que expresan un ácido nucleico o polipéptido de IL-6 o de IL-6R se ponen en contacto con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato para alterar la expresión del ácido nucleico o polipéptido de IL-6 o de IL-6R en comparación con un intervalo de referencia o control. En un ejemplo, las poblaciones de células que expresan un polipéptido de IL-6 o de IL-6R se ponen en contacto con un agente candidato o un agente control y se determina la capacidad del agente candidato para alterar la expresión de los ácidos nucleicos o polipéptidos de IL-6 o de IL-6R comparando la diferencia en el nivel de expresión de los ácidos nucleicos o polipéptidos de IL-6 o de IL-6R entre las poblaciones de células tratadas y control. Si se desea, puede usarse este ensayo para examinar una pluralidad (por ejemplo una biblioteca) de agentes candidatos. La célula, por ejemplo, puede ser de origen eucariota (por ejemplo levadura o mamífero) y puede expresar un polipéptido de IL-6 o de IL-6R de manera endógena o modificarse mediante ingeniería genética para expresar un polipéptido de IL-6 o de
60
65

IL-6R. La capacidad de los agentes candidatos para alterar la expresión de dichos polipéptidos o ácidos nucleicos puede determinarse mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo y sin limitación, mediante citometría de flujo, radiomarcado, un ensayo de centelleo, inmunoprecipitación, análisis de inmunotransferencia de tipo Western, análisis de transferencia de tipo Northern o RT-PCR.

5 Los agentes que inhiben la actividad de IL-6 pueden identificarse o someterse a prueba adicionalmente, por ejemplo para determinar cantidades terapéuticamente eficaces en uno o más modelos animales. Los ejemplos de animales adecuados incluyen, pero no se limitan a, ratones, ratas, conejos, monos, cobayas, perros y gatos. Preferiblemente, el animal usado representa un modelo de glomerulonefritis asociada con el síndrome de Goodpasture.

10 En un ejemplo en el que el agente inhibe la expresión de IL-6 o IL-6R, a un primer y un segundo grupo de mamíferos se les administra un agente candidato o un agente control y se determina la capacidad del agente candidato para inhibir la expresión de ácido nucleico o polipéptido de IL-6 o de IL-6R comparando la diferencia en el nivel de expresión entre el primer y el segundo grupo de mamíferos. Cuando se desee, pueden compararse los niveles de expresión del ácido nucleico o los polipéptidos de IL-6 o de IL-6R en el primer y el segundo grupos de mamíferos con el nivel de ácido nucleico o polipéptido de IL-6 o de IL-6R en un grupo control de mamíferos. El agente candidato o un agente control puede administrarse por medios conocidos en la técnica (por ejemplo por vía oral, por vía rectal o por vía parenteral tal como por vía intraperitoneal o por vía intravenosa). Los cambios en la expresión de un polipéptido o ácido nucleico pueden evaluarse mediante los métodos explicados anteriormente. Se conocen en la técnica modelos de glomerulonefritis asociada con enfermedad de Goodpasture y se describen en una revisión (Erwig *et al.*, 2001, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 10:341-347).

25 En otro ejemplo, la inhibición de la actividad de IL-6 puede determinarse monitorizando una mejora o mejoría en los síntomas de la enfermedad, una aparición retardada o progresión lenta de la enfermedad, por ejemplo pero sin limitación, una reducción en la proteinuria. Las técnicas conocidas por los médicos familiarizados con la glomerulonefritis asociada con uno o más trastornos seleccionados del grupo que consiste en el síndrome de Goodpasture pueden usarse para determinar si un agente candidato ha alterado uno o más síntomas asociados con la enfermedad.

30 Tal como se discute en el presente documento, los agentes que interactúan con un polipéptido de IL-6 encuentran uso en el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con el síndrome de Goodpasture. Para tal uso los agentes en general se administrarán en forma de una composición farmacéutica.

35 Por tanto, según la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente que interactúa con o modula la expresión o actividad de un polipéptido de IL-6 y un diluyente, excipiente y/o portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas también pueden encontrar uso como vacuna y pueden comprender componentes adicionales aceptables para su uso en vacunas y adicionalmente pueden comprender uno o más adyuvantes adecuados tal como conoce el experto.

40 A continuación en el presente documento, los agentes de uso en la invención, y polipéptidos de IL-6 y ácidos nucleicos de IL-6 de uso en el tratamiento y/o la profilaxis se denominan "agentes activos". Cuando se hace referencia en el presente documento a un método de tratamiento o prevención de una enfermedad o estado usando un agente activo o combinación de agentes particular, debe entenderse que una referencia de ese tipo pretende incluir el uso de ese agente activo o combinación de agentes en la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad o estado. Por tanto, también se proporciona un anticuerpo anti-IL-6 como agente activo para su uso en la terapia de la glomerulonefritis asociada con el síndrome de Goodpasture. Un anticuerpo de ese tipo puede estar presente unido a o asociado con una molécula efectora tal como se describió anteriormente.

50 La composición se suministrará habitualmente como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluirá un portador farmacéuticamente aceptable. Esta composición puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del método deseado de administración a un paciente).

55 Los agentes activos de la invención pueden administrarse a un sujeto mediante cualquiera de las vías usadas de manera convencional para la administración de fármaco, por ejemplo pueden administrarse por vía parenteral, por vía oral, por vía tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica, o usando administración intracelular mediada por partículas directamente a células de la piel) o mediante inhalación. La administración mediada por partículas se describe por Haynes, JR, 2004, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 4:889-900. La vía más adecuada para la administración dependerá en cualquier caso dado del agente activo particular, el trastorno implicado, el sujeto, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y el estado físico del sujeto.

Los agentes activos pueden administrarse en combinación, por ejemplo simultánea, secuencialmente o por separado, con uno o más de otros compuestos terapéuticamente activos, por ejemplo antiinflamatorios.

65 Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse de manera conveniente en formas de dosificación unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis. Una unidad de ese tipo

puede contener por ejemplo, pero sin limitación, de 750 mg/kg a 0,1 mg/kg dependiendo del estado que esté tratándose, la vía de administración y la edad, peso y estado del sujeto.

5 Los portadores farmacéuticamente aceptables para su uso en la invención pueden adoptar una amplia variedad de formas dependiendo, por ejemplo de la vía de administración.

10 Las composiciones para administración oral pueden ser líquidas o sólidas. Las preparaciones líquidas orales pueden estar en forma de, por ejemplo, suspensiones acuosas o aceitosas, disoluciones, emulsiones, jarabes o elixires, o pueden presentarse como producto seco para la reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de su uso. Las preparaciones líquidas orales pueden contener agentes de suspensión tal como se conoce en la técnica.

15 En el caso de preparaciones sólidas orales tales como polvos, cápsulas y comprimidos, pueden incluirse portadores tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares. Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma de dosificación unitaria oral más ventajosa, en cuyo caso se emplean en general portadores farmacéuticos sólidos. Además de las formas de dosificación comunes expuestas anteriormente, también pueden administrarse agentes activos de la invención por medios de liberación controlada y/o dispositivos de administración. Los comprimidos y las cápsulas pueden comprender portadores o excipientes convencionales tales como agentes de unión por ejemplo, jarabe, goma arábiga, gelatina, sorbitol, goma tragacanto o polivinilpirrolidona; 20 cargas, por ejemplo lactosa, azúcar, almidón de maíz, fosfato de calcio, sorbitol o glicina; lubricantes para la fabricación de comprimidos, por ejemplo estearato de magnesio, talco, polietilenglicol o sílice; disgregantes, por ejemplo almidón de patata; o agentes humectantes aceptables tales como laurilsulfato de sodio. Los comprimidos pueden recubrirse mediante técnicas acuosas o no acuosas convencionales según métodos ampliamente conocidos en la práctica farmacéutica normal.

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para la administración oral pueden presentarse como unidades separadas tales como cápsulas, cachets o comprimidos, conteniendo cada uno una cantidad predeterminada del agente activo, como polvo o gránulos, o como disolución o una suspensión en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Tales composiciones pueden prepararse mediante cualquiera de los métodos de farmacia pero todos los métodos incluyen la etapa de poner en asociación el agente activo con el portador, que constituye uno o más componentes necesarios. En general, las composiciones se preparan mezclando de manera uniforme e íntima el agente activo con portadores líquidos o portadores sólidos finamente divididos o ambos, y entonces, si es necesario, conformando el producto para dar la presentación deseada. Por ejemplo, un comprimido puede prepararse mediante compresión o 30 moldeado, opcionalmente con uno o más componentes auxiliares.

40 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración parenteral pueden prepararse como disoluciones o suspensiones de los agentes activos de la invención en agua mezclada de manera adecuada con un tensioactivo tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos en aceites. En condiciones habituales de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

45 Las formas farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen disoluciones para inyección estériles acuosas o no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la composición sea isotónica con la sangre del receptor pretendido, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Pueden prepararse disoluciones, dispersiones y suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

50 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, puede administrarse una composición farmacéutica de la invención con un dispositivo de inyección hipodérmico sin aguja, tal como los dispositivos dados a conocer en los documentos US 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos ampliamente conocidos útiles en la presente invención incluyen: el documento US 4.487.603, que da a conocer una bomba de microinfusión que puede implantarse para dispensar la medicación a una tasa controlada; el 55 documento US 4.486.194, que da a conocer un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; el documento US 4.447.233, que da a conocer una bomba de infusión de medicación para administrar la medicación a una tasa de infusión precisa; el documento US 4.447.224, que da a conocer un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración de fármaco continua; el documento US 4.439.196, que da a conocer un sistema de administración de fármaco osmótica que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y el 60 documento US 4.475.196, que da a conocer un sistema de administración de fármaco osmótica. Los expertos en la técnica conocen muchos otros de tales implantes, sistemas de administración y módulos.

65 En determinadas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para garantizar la distribución *in vivo* apropiada. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica excluye muchos compuestos altamente hidrófilos y puede ser preferible administrar composiciones farmacéuticas en liposomas. Por tanto, en una realización de la invención, los agentes activos de la invención se formulan en liposomas; en una realización más

preferida, los liposomas incluyen un resto de selección como diana.

Las formulaciones de agentes activos pueden administrarse en fluorocarbonos como formulaciones pulmonares, tópicas u oftalmológicas e incluyen suspensiones de agente activo en fluorocarbono, emulsiones de agua en fluorocarbono inversas, emulsiones de aceite en fluorocarbono, emulsiones múltiples, microemulsiones, geles de fluorocarbono, liposomas fluorados y túbulos fluorados.

Las composiciones pueden presentarse en envases de dosis única o múltiples dosis, por ejemplo en ampollas y viales sellados y para potenciar la estabilidad, pueden almacenarse en una condición secada por congelación (liofilizada) que requiere sólo la adición del portador líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de su uso. El portador líquido estéril puede suministrarse en una ampolla o vial separado y puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales. Ventajosamente, agentes tales como un anestésico local, conservante y agentes de tamponamiento pueden incluirse en el portador líquido estéril.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica pueden formularse como pomadas, cremas, suspensiones, lociones, polvos, disoluciones, pastas, geles, apósitos impregnados, pulverizaciones, aerosoles o aceites, dispositivos transdérmicos, polvos de talco y similares. Estas composiciones pueden prepararse a través de métodos convencionales conteniendo el agente activo. Por tanto, también pueden comprender portadores y aditivos convencionales compatibles, tales como conservantes, disolventes para ayudar a la penetración del fármaco, emolientes en cremas o pomadas y etanol o alcohol oleílico para lociones. Tales portadores pueden estar presentes como desde aproximadamente el 1% hasta aproximadamente el 98% de la composición. Más habitualmente formarán hasta aproximadamente el 80% de la composición. Sólo como ilustración, se prepara una crema o pomada mezclando cantidades suficientes de material hidrófilo y agua, que contienen desde aproximadamente el 5-10% en peso del compuesto, en cantidades suficientes para producir una crema o pomada que tiene la consistencia deseada.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración transdérmica pueden presentarse como parches separados destinados para permanecer en contacto íntimo con la epidermis del receptor durante un periodo de tiempo prolongado. Por ejemplo, el agente activo puede administrarse desde el parche mediante iontoforesis.

Para aplicaciones a tejidos externos, por ejemplo la boca y la piel, las composiciones se aplican preferiblemente como una crema o pomada tópica. Cuando se formula en una pomada, el agente activo puede emplearse con una base de pomada o bien miscible en agua o bien parafínica. Alternativamente, el agente activo puede formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de agua en aceite.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica en la boca incluyen pastillas para chupar, pastillas y enjuagues bucales.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración tópica al ojo incluyen colirios en los que el agente activo está disuelto o suspendido en un portador adecuado, especialmente un disolvente acuoso. También incluyen cremas o pomadas tópicas tal como anteriormente.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para administración rectal en las que el portador es un sólido se presentan de la manera más preferible como supositorios de dosis unitaria. Los portadores adecuados incluyen manteca de cacao u otro glicérido o materiales usados comúnmente en la técnica, y los supositorios pueden formarse de manera conveniente mezclando la combinación con el/los portador(es) ablandado(s) o fundido(s) seguido por moldes de enfriamiento y conformación. También pueden administrarse como enemas.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para administración vaginal pueden presentarse como óvulos vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o composiciones de pulverización. Pueden comprender emolientes o bases tal como se usan comúnmente en la técnica.

La dosificación que va a administrarse de un agente activo variará según el agente activo particular, el trastorno implicado, el sujeto, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y el estado físico del sujeto, la edad, peso y género del sujeto, dieta, tiempo y frecuencia de administración, combinación(es) de fármacos, sensibilidades de reacción, tolerancia/respuesta a la terapia, y la vía de administración seleccionada; y un médico determinará en última instancia las dosificaciones apropiadas que van a usarse. Esta dosificación puede repetirse tantas veces como sea apropiado. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz será de desde 0,01 mg/kg hasta 100 mg/kg, preferiblemente de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg. La frecuencia de dosis dependerá de la semivida de la molécula de anticuerpo y la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una semivida corta (por ejemplo de 2 a 10 horas) puede ser necesario proporcionar una o más dosis al día.

Alternativamente, si la molécula de anticuerpo tiene una semivida larga (por ejemplo de 2 a 15 días) puede ser sólo necesario proporcionar una dosificación una vez al día, una vez a la semana o incluso una vez cada 1 ó 2 meses. Si

se desarrollan efectos secundarios pueden alterarse o reducirse la cantidad y/o la frecuencia de la dosificación, según la práctica clínica normal.

5 Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse de manera conveniente en formas de dosificación unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis. En particular, la dosis a la que se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza del estado que va a tratarse, el grado de la inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo está usándose de manera profiláctica o para tratar un estado existente.

10 Para el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con el síndrome de Goodpasture en particular, en seres humanos y animales pueden administrarse composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos a pacientes (por ejemplo, sujetos humanos) a dosificaciones terapéutica o profilácticamente eficaces (por ejemplo dosificaciones que dan como resultado una reducción de la glomerulonefritis) usando cualquier vía de administración adecuada, tal como inyección y otras vías de administración conocidas en la técnica para productos clínicos basados en anticuerpos.

Las composiciones pueden contener desde el 0,1% en peso, preferiblemente desde el 10-60%, o más, en peso, del agente activo de la invención, dependiendo del método de administración.

20 Las composiciones pueden administrarse individualmente a un paciente o pueden administrarse en combinación (por ejemplo simultánea, secuencialmente o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.

25 En terapia génica *ex vivo*, se transfiere un gen a células *in vitro* usando cultivo tisular y se administran las células al paciente mediante diversos métodos tales como inyección por vía subcutánea, aplicación de las células en un injerto de piel y la inyección intravenosa de células sanguíneas recombinantes tales como células madre hematopoyéticas o progenitoras.

30 Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico de IL-6 o IL-6R para los fines de terapia génica incluyen, por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos y células sanguíneas. roeoslas células sanguíneas que pueden usarse incluyen, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos, células hematopoyéticas o células progenitoras y similares.

35 En un aspecto, la composición farmacéutica de la presente invención comprende un ácido nucleico de IL-6 o IL-6R, siendo dicho ácido nucleico parte de un vector de expresión que expresa un polipéptido de IL-6 o de IL-6R o proteína quimérica del mismo en un huésped adecuado. En particular, un ácido nucleico de ese tipo tiene un promotor unido de manera operativa a la región que codifica para el polipéptido, siendo dicho promotor inducible o constitutivo (y, opcionalmente, específico de tejido).

40 Los polipéptidos recombinantes de IL-6 pueden prepararse mediante procedimientos ampliamente conocidos en la técnica de células huésped modificadas mediante ingeniería genética que comprenden sistemas de expresión. Por consiguiente, la presente invención se refiere también a sistemas de expresión que comprenden un polipéptido de IL-6 o ácido nucleico de IL-6, a células huésped que se modifican mediante ingeniería genética con tales sistemas de expresión y a la producción de polipéptidos de IL-6 mediante técnicas recombinantes. También pueden emplearse sistemas de traducción libres de células para producir polipéptidos recombinantes (por ejemplo lisado de reticulocito de conejo, lisado de germen de trigo, kits de transcripción y traducción de SP6/T7 *in vitro* T&T y RTS 100 E. Coli HY de Roche Diagnostics Ltd., Lewes, R.U. y el sistema de transcripción/traducción acopladas TNT Quick de Promega RUK, Southampton, R.U.

50 Para la producción del polipéptido recombinante de IL-6, las células huésped pueden modificarse mediante ingeniería genética para incorporar los sistemas de expresión o partes de los mismos para ácidos nucleicos de IL-6. Tal incorporación puede realizarse usando métodos ampliamente conocidos en la técnica, tal como, transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAD-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, carga por raspado, introducción balística o infección (véase por ejemplo Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, 1986 y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª Ed., Cold Spring Harbour laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989).

60 Los ejemplos representativos de células huésped incluyen células bacterianas por ejemplo células de *E. coli*, estreptococos, estafilococos, *Streptomyces* y *Bacillus subtilis*; células fúngicas, tales como células de levadura y células de *Aspergillus*; células de insectos tales como células de *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*; células animales tales como células CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, HEK 293, BHK y melanoma de Bowes; y células vegetales.

65 Pueden usarse una amplia variedad de sistemas de expresión, tal como y sin limitación, sistemas cromosómicos, episómicos y derivados de virus, por ejemplo vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófago, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus tales como baculovirus, papovavirus tales como SV40, virus *Vaccinia*, adenovirus, virus de la viruela aviar,

virus de la pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como los derivados de elementos genéticos de bacteriófagos y plásmidos, tales como cósmidos y fagémidos. Los sistemas de expresión pueden contener regiones control que regulan así como generan la expresión. En general, puede usarse cualquier sistema o vector que puede mantener, propagar o expresar un ácido nucleico para producir un polipéptido en un huésped. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en un sistema de expresión mediante cualquier variedad de técnicas de rutina y ampliamente conocidas, tales como las expuestas en Sambrook *et al.*, citado anteriormente. Pueden incorporarse señales de secreción apropiadas en el polipéptido de IL-6 para permitir la secreción de la proteína traducida en la luz del retículo endoplasmático, el espacio periplásmico o el entorno extracelular. Estas señales pueden ser endógenas al polipéptido de IL-6 o pueden ser señales heterólogas.

Los polipéptidos de IL-6 pueden recuperarse y purificarse de cultivos de células recombinantes o de otras fuentes biológicas mediante métodos ampliamente conocidos incluyendo, precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácido, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía en hidroxapatita, cromatografía de tamizado molecular, métodos de centrifugación, métodos de electroforesis y cromatografía en lectina. En una realización, se usa una combinación de estos métodos. En otra realización, se usa cromatografía de líquidos de alta resolución. En una realización adicional, puede usarse un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de IL-6 para agotar una muestra que comprende un polipéptido de IL-6 de dicho polipéptido o para purificar dicho polipéptido. Pueden usarse técnicas ampliamente conocidas en la técnica para el replegamiento para regenerar conformaciones nativas o activas de los polipéptidos de IL-6 cuando los polipéptidos se han desnaturado durante el aislamiento y/o la purificación. En el contexto de la presente invención, pueden obtenerse polipéptidos de IL-6 de una muestra biológica de cualquier fuente, tal como y sin limitación, una muestra de sangre.

Los ácidos nucleicos de IL-6 o IL6R pueden obtenerse usando técnicas de clonación y selección convencionales, de una biblioteca de ADNc derivada de ARNm en células humanas, usando análisis de etiqueta de secuencia expresada (EST) (Adams, M. *et al.*, 1991, Science, 252:1651-1656; Adams, M. *et al.*, 1992, Nature 355:632-634; Adams, M. *et al.*, 1995, Nature, 377:Supl: 3-174). También pueden obtenerse ácidos nucleicos de IL-6 de fuentes naturales tales como bibliotecas de ADN genómico o pueden sintetizarse usando técnicas ampliamente conocidas y disponibles comercialmente. Los ácidos nucleicos de IL-6 o IL-6R que comprenden una secuencia codificante para polipéptidos de IL-6 o de IL-6R pueden usarse para la producción recombinante de dichos polipéptidos. Los ácidos nucleicos de IL-6 o IL-6R pueden incluir la secuencia codificante para el polipéptido maduro, por sí mismos; o la secuencia codificante para el polipéptido maduro en un marco de lectura con otras secuencias codificantes, tales como las que codifican para una secuencia líder o secretora, una secuencia de pre, pro o preproteína, una secuencia que puede escindir-se u otras partes de péptidos de fusión, tales como una etiqueta de afinidad o una secuencia adicional que confiere estabilidad durante la producción del polipéptido. Las etiquetas de afinidad preferidas incluyen múltiples residuos de histidina (por ejemplo véase Gentz *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci USA 86:821-824), una etiqueta FLAG, etiqueta HA o etiqueta myc. Los ácidos nucleicos de IL-6 también pueden contener secuencias en el sentido de 5' y 3' no codificantes, tales como secuencias transcritas, no traducidas, señales de poliadenilación y de corte y empalme, sitios de unión a ribosomas y secuencias que estabilizan ARNm.

Pueden crearse derivados de los polipéptidos de IL-6 o de IL-6R anteriores introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico de IL-6 o IL-6R de modo que se introduzcan una o más sustituciones, adiciones o deleciones de aminoácidos en la proteína codificada. Pueden usarse técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica para introducir mutaciones, incluyendo, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, se hacen sustituciones conservativas de aminoácidos en uno o más residuos de aminoácidos no esenciales previstos.

Las características preferidas de cada realización de la invención son intercambiables con cada una de las demás realizaciones haciendo los cambios necesarios.

La invención se describirá ahora con referencia a los siguientes ejemplos.

Leyendas de las figuras

Figura 1. Análisis histoquímico que muestra glomerulonefritis rápidamente progresiva típica en el riñón de ratones CD1 12 semanas tras la inmunización con $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ recombinante. Las flechas indican una semiluna fibrosa.

La figura 2 muestra el efecto del tratamiento con un anticuerpo anti-IL-6 en proteinuria de ratones CD1 3 semanas [panel (A)], 6 semanas [panel (B)], 9 semanas [panel (C)] o 12 semanas [panel (D)] tras la inmunización con $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ recombinante.

La figura 3 muestra el efecto del tratamiento con un anticuerpo anti-IL-6 sobre anomalías renales de ratones CD1 12 semanas tras la inmunización con $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ recombinante.

Ejemplo 1. Preparación de cadena alfa 3 recombinante de colágeno tipo IV [$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$]

Se preparó $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ recombinante tal como se describe por Reynolds *et al.* (Reynolds *et al.*, 2005, J Am Soc Nephrol., 16:1350-1359).

Ejemplo 2. Modelo murino de síndrome de Goodpasture

5 Se inmunizaron ratones CD1 con $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ recombinante en CFA por vía subcutánea en la base de la cola seguido por 2 refuerzos en IFA por vía subcutánea 1 y 2 semanas después. Los ratones desarrollaron anticuerpos anti-membrana basal glomerular depositados y circulantes, proteinuria y glomerulonefritis proliferativa focal en la semana 6 tras la inyección que progresó a glomerulonefritis rápidamente progresiva grave en la semana 12. En la figura 1 se muestra el análisis histológico de un animal inmunizado que muestra cicatrización glomerular marcada con semilunas fibrosas, cicatrices tubulointersticiales con atrofia tubular e inflamación tubulointersticial en el riñón.

Ejemplo 3. Tratamiento con anticuerpo anti-IL-6

15 A grupos de ratones CD1 (n=10) se les administró un anticuerpo irrelevante (control positivo) o anticuerpo monoclonal anti-IL-6 a una dosis de 30 mg/kg (por vía subcutánea) semanalmente durante 12 semanas desde el día anterior a la inmunización con $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ recombinante.

20 Se colocaron los animales en jaulas metabólicas durante 24 horas cada 3 semanas, con acceso libre a alimento y agua, para permitir la recogida de orina. Se detectó proteinuria en la orina mediante el método de ácido sulfosalicílico (Khan *et al.*, 2005, Kidney Int., 67: 1812-1820). Los animales a los que se les administró Acm anti-IL-6 mostraron una reducción marcada en la proteinuria en comparación con los controles positivos tal como se muestra en la figura 2A-D. A las 12 semanas tras la inmunización los niveles de proteinuria en ratones tratados con anticuerpo anti-IL-6 eran sólo de 8 mg/día en comparación con 39 mg/día en ratones tratados con el anticuerpo control irrelevante. También se redujo el número de anomalías glomerulares en ratones tratados con el anticuerpo anti-IL-6 tal como se muestra en la figura 3 (control, el 29% frente a Acm anti-IL-6, el 2%).

30 Los resultados sugieren que la glomerulonefritis autoinmunitaria experimental puede inducirse de manera fiable en el ratón CD1, y que Acm anti-IL-6 es eficaz en la prevención de lesión glomerular en este modelo. Por tanto, los resultados muestran la importancia del papel de IL-6 en el desarrollo de glomerulonefritis autoinmunitaria experimental e indican que las estrategias que seleccionan como diana IL-6 pueden proporcionar un enfoque novedoso en el tratamiento de la glomerulonefritis humana.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de un anticuerpo o fragmento funcionalmente activo, que inhibe de manera selectiva el polipéptido de IL-6 o el polipéptido de IL-6R para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con el síndrome de Goodpasture.
2. Uso según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o biespecífico.
- 10 3. Uso según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que el mamífero es un ser humano.
4. Anticuerpo o fragmento funcionalmente activo, que inhibe de manera selectiva el polipéptido de IL-6 o el polipéptido de IL-6R para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con el síndrome de Goodpasture.
- 15 5. Anticuerpo según la reivindicación 4, en el que el anticuerpo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o biespecífico.
6. Anticuerpo según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en el que el mamífero es un ser humano.



Figura 1

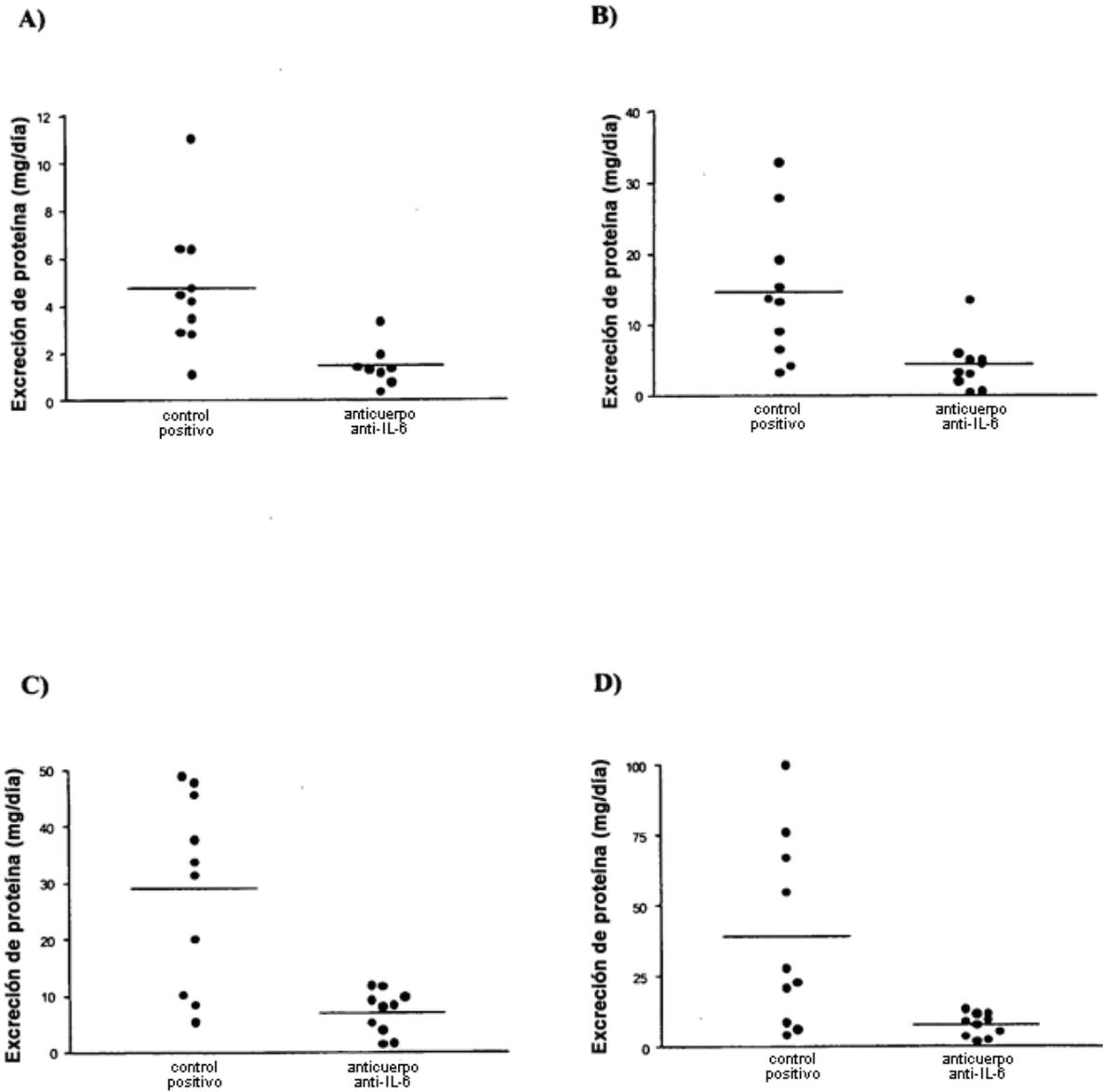


Figura 2

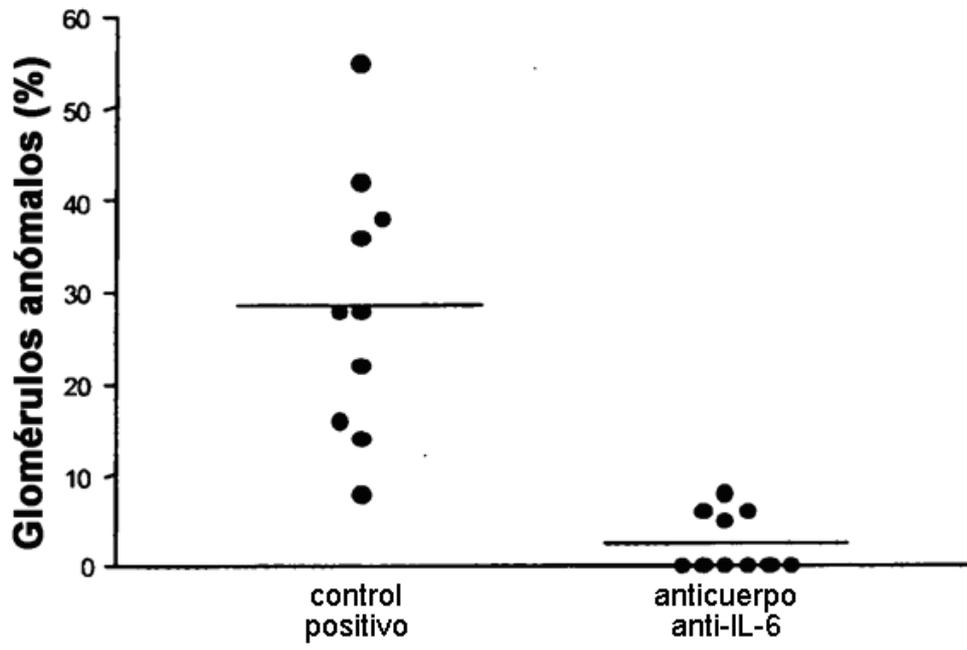


Figura 3