

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 392**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 37/06 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.01.2008 E 08703686 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.12.2015 EP 2123302**

54 Título: **Inhibidores de IL-6 para el tratamiento de rechazo crónico**

30 Prioridad:

23.01.2007 JP 2007012572

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

22.03.2016

73 Titular/es:

**SHINSHU UNIVERSITY (50.0%)
1-1, Asahi 3-chome
Matsumoto-shi, Nagano 390-8621, JP y
CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**TAKAHASHI, MASAFUMI y
IZAWA, ATSUSHI**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 564 392 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

Inhibidores de IL-6 para el tratamiento de rechazo crónico

CAMPO TÉCNICO

5 La presente invención se refiere a agentes para suprimir la reacción de rechazo crónico, que comprenden un inhibidor de IL-6 como ingrediente activo, y usos de los mismos. La presente invención también se refiere a procedimientos para suprimir la reacción de rechazo crónico, que comprenden la etapa de administrar un inhibidor de IL-6 a los receptores.

TÉCNICA ANTERIOR

10 IL-6 es una citocina también denominada factor estimulador de linfocitos B 2 (BSF2) o interferón β 2. Se descubrió la IL-6 como un factor de diferenciación implicado en la activación de linfocitos B (documento distinto de patente 1), y posteriormente se reveló que es una citocina multifuncional que influencia la función de varias células (documento distinto de patente 2). Se ha informado de que la IL-6 induce la maduración de los linfocitos T (documento distinto de patente 3).

15 La IL-6 transmite su actividad biológica por medio de dos tipos de proteínas en las células. La primera es el receptor de IL-6, que es una proteína de unión a ligando a la que se une la IL-6, con un peso molecular de aproximadamente 80 kDa (documentos distintos de patente 4 y 5). El receptor de IL-6 está presente en una forma unida a membrana que penetra y se expresa en la membrana celular, y también como un receptor de IL-6 soluble que consiste principalmente en la región extracelular de la forma unida a membrana.

20 El otro tipo de proteína es la proteína de membrana gp130, que tiene un peso molecular de aproximadamente 130 kDa y está implicada en la transducción de señales de unión distinta de ligando. La actividad biológica de IL-6 se transmite en la célula a través de la formación de un complejo IL-6/receptor de IL-6 por la IL-6 y el receptor de IL-6, seguido de la unión del complejo con gp130 (documento distinto de patente 6).

25 Los inhibidores de IL-6 son sustancias que inhiben la transmisión de la actividad biológica de IL-6. En la actualidad, los inhibidores de IL-6 conocidos incluyen anticuerpos frente a IL-6 (anticuerpos anti-IL-6), anticuerpos frente al receptor de IL-6 (anticuerpos anti-receptor de IL-6), anticuerpos frente a gp130 (anticuerpos anti-gp130), variantes de IL-6, péptidos parciales de IL-6, o receptor de IL-6, y similares.

30 Existen varios informes con relación a los anticuerpos anti-receptor de IL-6 (documentos distintos de patente 7 y 8, y documentos de patente 1 a 3). Un informe de este tipo detalla un anticuerpo PM-1 humanizado, que se obtiene por trasplante de la región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo de ratón PM-1 (documento distinto de patente 9), que es un anticuerpo anti-receptor de IL-6, en un anticuerpo humano (documento de patente 4).

35 Debido a los avances en la politerapia y la aplicación clínica de varios inmunosupresores, las estrategias terapéuticas para la reacción de rechazo agudo que siguen al trasplante de órganos están casi establecidas, y la tasa de supervivencia al cabo de un año después de varios trasplantes de órganos se ha mejorado significativamente. Sin embargo, la reacción de rechazo crónico, que se vuelve problemática a partir del año siguiente al trasplante, se produce incluso en casos clínicos en los que la reacción de rechazo agudo se ha superado con tratamiento inmunosupresor convencional, y en los que el tratamiento se ha continuado durante un largo plazo. Por tanto, no se han establecido procedimientos preventivos ni terapéuticos eficaces frente a la reacción de rechazo crónico. Además, no se ha esclarecido completamente el mecanismo causante de esta afección patológica, y es difícil diagnosticarlo en comparación con la reacción de rechazo agudo. Por tanto, se sabe que la reacción de rechazo crónico es una complicación que afecta al pronóstico a largo plazo en los receptores (documentos distintos de patente 10 y 11).

45 Las características patológicas conocidas características de la reacción de rechazo crónico incluyen fibrosis del intersticio y estenosis de luces debidas al engrosamiento de la íntima de tejidos luminales en órganos trasplantados. En particular, la angioestenosis es una característica patológica importante, y se denomina lesión vascular postrasplante o arterioesclerosis postrasplante. Se cree que una variedad de factores se influyen intrincadamente la progresión de la afección patológica, tal como prolongación de la reacción de rechazo tanto por inmunidad celular como humoral, trastornos de isquemia-reperusión de órganos, trastornos funcionales de los endotelios vasculares, factores de riesgo comunes para arterioesclerosis (diabetes, hiperlipidemia, hipertensión, y similares) en los receptores, efectos secundarios de inmunosupresores, factores genéticos, e infección postrasplante de citomegalovirus (documentos distintos de patente 12 y 13).

Entre los agentes farmacéuticos existentes, los inhibidores de la calcineurina tales como ciclosporina y tacrolimus en particular son ineficaces contra la reacción de rechazo crónico, y sus efectos secundarios tales como hipertensión, hiperlipidemia y diabetes se consideran problemáticos. Además, se requiere tratamiento inmunosupresor a largo plazo después del trasplante en receptores pediátricos en particular. Por tanto, se ha anticipado el desarrollo de agentes farmacéuticos eficaces para la reacción de rechazo crónico y que tienen pocos efectos secundarios (documentos distintos de patente 13 y 14).

Se han investigado perfiles de expresión génica de PG490-88 en la prevención del rechazo crónico en aloinjertos renales en ratas por Fisniku O., *et al.* Transplant Proceedings (2005) 37(4): 1962-4.

El efecto de anticuerpos anti-receptor de IL-6 en la inducción de linfocitos T citotóxicos se examinó en el documento EP 1 967 207.

El requisito descrito anteriormente para desarrollar un tratamiento inmunosupresor novedoso para suprimir la reacción de rechazo crónico es el antecedente del presente estudio.

A continuación se describen documentos de técnicas anteriores relacionadas para la presente invención.

[Documento de patente 1] Publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 95/09873

[Documento de patente 2] Solicitud de patente francesa n.º FR 2694767

[Documento de Patente 3] Patente de los Estados Unidos n.º 5216128

[Documento de patente 4] Documento WO 92/19759

[Documento distinto de patente 1] Hirano, T. *et al.*, Nature (1986) 324, 73-76

[Documento distinto de patente 2] Akira, S. *et al.*, Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78

[Documento distinto de patente 3] Lotz, M. *et al.*, J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258

[Documento distinto de patente 4] Taga, T. *et al.*, J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981

[Documento distinto de patente 5] Yamasaki, K. *et al.*, Science (1988) 241, 825-828

[Documento distinto de patente 6] Taga, T. *et al.*, Cell (1989) 58, 573-581

[Documento distinto de patente 7] Novick, D. *et al.*, Hybridoma (1991) 10, 137-146

[Documento distinto de patente 8] Huang, Y. W. *et al.*, Hybridoma (1993) 12, 621-630

[Documento distinto de patente 9] Hirata, Y. *et al.*, J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906

[Documento distinto de patente 10] Wong, B. W. *et al.*, Cardiovasc. Pathol. (2005) 14, 176-80

[Documento distinto de patente 11] Homick, P. *et al.*, Methods Mol. Biol. (2006) 333, 131-44

[Documento distinto de patente 12] Ramzy, D. *et al.*, Can. J. Surg. (2005) 48, 319-327

[Documento distinto de patente 13] Valantine, H., J. Heart Lung Transplant (2004) 23(5 Supl), S187-93

[Documento distinto de patente 14] Webber, S. A. *et al.*, Lancet (2006) 368, 53-69

[Documento distinto de patente 15] Izawa, A., *et al.*, Circ. J. (2007) 71 (Supl I), 392 (Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Kobe, Mar 15-Mar 17, 2007; Abstract PE-269)

[Documento distinto de patente 16] Izawa, A., *et al.*, Am. J. Transplant. (2007) 7(Supl 11), 426 (American Transplant Congress, San Francisco, CA, Mar 5-Mar 9, 2007; Resúmen 1084)

DIVULGACIÓN DE LA INVENCION

[Problemas que debe resolver la invención]

La presente invención se llevó a cabo bajo las circunstancias descritas anteriormente. Un objeto de la presente invención es proporcionar agentes para suprimir la reacción de rechazo crónico, que comprenden un inhibidor de IL-6 como ingredientes activos.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar procedimientos para suprimir la reacción de rechazo crónico, que comprenden la etapa de administrar un inhibidor de IL-6 a sujetos.

[Medios para resolver los problemas]

5 Para lograr los objetos descritos anteriormente, los presentes inventores sometieron a prueba anticuerpos anti-receptor de IL-6 para determinar el efecto de suprimir la reacción de rechazo crónico.

10 Los presentes inventores evaluaron el efecto de suprimir la reacción de rechazo crónico de la administración del anticuerpo anti-receptor de IL-6 de ratón (MR16-1) usando un modelo de ratón para rechazo crónico postrasplante cardíaco. El resultado del análisis histopatológico de los corazones trasplantados extirpados 60 días después del trasplante reveló que la fibrosis de lesiones estenósicas miocárdicas y vasculares, que son afecciones patológicas características de la reacción de rechazo crónico, se suprimieron significativamente en el grupo tratado con MR16-1 en comparación con el grupo de control. Por tanto, se demostró que la administración de MR16-1 tenía el efecto de suprimir la reacción de rechazo crónico.

15 Por tanto, los presentes inventores descubrieron por primera vez que la administración de anticuerpos anti-receptor de IL-6 suprime la reacción de rechazo en la fase crónica después de un trasplante de órganos, y por tanto, completó la presente invención.

Más específicamente, la presente invención proporciona las siguientes invenciones:

- [1] un agente para suprimir la reacción de rechazo crónico, que comprende como ingrediente activo un inhibidor de IL-6;
- 20 [2] el agente para suprimir la reacción de rechazo crónico de [1], en el que el inhibidor de IL-6 es un anticuerpo que reconoce una IL-6;
- [3] el agente para suprimir la reacción de rechazo crónico de [1], en el que el inhibidor de IL-6 es un anticuerpo que reconoce un receptor de IL-6;
- [4] el agente para suprimir la reacción de rechazo crónico de [2] o [3], en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal;
- 25 [5] el agente para suprimir la reacción de rechazo crónico de [2] o [3], en el que el anticuerpo es un anticuerpo que reconoce una IL-6 humana o un receptor de IL-6 humana;
- [6] el agente para suprimir la reacción de rechazo crónico de [2] o [3], en el que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante;
- 30 [7] el agente para suprimir la reacción de rechazo crónico de una cualquiera de [2] a [6], en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano;
- [8] el agente para suprimir la reacción de rechazo crónico de una cualquiera de [1] a [7], que se usa para suprimir la reacción de rechazo crónico de trasplante cardíaco;
- [9] un procedimiento para suprimir la reacción de rechazo crónico, que comprende la etapa de administrar un inhibidor de IL-6 a un sujeto;
- 35 [10] el procedimiento de [9], en el que el inhibidor de IL-6 es un anticuerpo que reconoce un IL-6;
- [11] el procedimiento de [9], en el que el inhibidor de IL-6 es un anticuerpo que reconoce un receptor de IL-6;
- [12] el procedimiento de [10] u [11], en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal;
- [13] el procedimiento de [10] u [11], en el que el anticuerpo es un anticuerpo que reconoce una IL-6 humana o un receptor de IL-6 humana;
- 40 [14] el procedimiento de [10] u [11], en el que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante;
- [15] el procedimiento de una cualquiera de [10] a [14], en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano;
- [16] el procedimiento de una cualquiera de [9] a [15], que suprime la reacción de rechazo crónico de trasplante cardíaco;

[17] uso de un inhibidor de IL-6 en la producción de un agente para suprimir la reacción de rechazo crónico;

[18] el uso de [17], en el que el inhibidor de IL-6 es un anticuerpo que reconoce un IL-6;

[19] el uso de [17], en el que el inhibidor de IL-6 es un anticuerpo que reconoce un receptor de IL-6;

[20] el uso de [18] o [19], el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal;

5 [21] el uso de [18] o [19], en el que el anticuerpo es un anticuerpo que reconoce una IL-6 humana o un receptor de IL-6 humana;

[22] el uso de [18] o [19], el que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante;

[23] el uso de una cualquiera de [18] a [22], en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano; y

10 [24] un inhibidor de IL-6 para su uso en la supresión de la reacción de rechazo crónico.

En consecuencia, la presente invención se caracteriza por los modos de realización como se define en las reivindicaciones. Por tanto, se refiere a los siguientes puntos.

1. Un agente para su uso en la supresión de la reacción de rechazo crónico, que comprende como ingrediente activo un inhibidor de IL-6 que es un anticuerpo anti-IL-6 o anticuerpo anti-receptor de IL-6.
- 15 2. Uso de un inhibidor de IL-6 que es un anticuerpo anti-IL-6 o anticuerpo anti-receptor de IL-6 para la producción de un agente para suprimir la reacción de rechazo crónico.
3. El agente del punto 1 o el uso del punto 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
4. El agente o uso del punto 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo que reconoce una IL-6 humana o receptor de IL-6 humana.
- 20 5. El agente o uso del punto 3 o 4, el que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante.
6. El agente o uso de uno cualquiera de 3 a 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.
7. El agente o uso de uno cualquiera de los puntos 1 a 6 para su uso en la supresión de la reacción de rechazo crónico de trasplante cardíaco.
- 25 8. Una composición farmacéutica que comprende el agente de uno cualquiera de los puntos 1 a 7 y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Los presentes inventores descubrieron que la administración de un anticuerpo anti-receptor de IL-6 puede suprimir la reacción de rechazo crónico. La presente invención se basa en estos hallazgos.

30 La presente invención se refiere a agentes para suprimir la reacción de rechazo crónico, que comprenden un inhibidor de IL-6 como ingrediente activo.

En el presente documento, un "inhibidor de IL-6" es un anticuerpo que bloquea la transducción de señales mediadas por IL-6 e inhibe la actividad biológica de IL-6. Preferentemente, el inhibidor de IL-6 es un anticuerpo que tiene una función inhibidora frente a la unión de IL-6, receptor de IL-6, o gp130.

35 Los ejemplos de inhibidores de IL-6 incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos anti-receptor de IL-6, anticuerpos anti-gp130, variantes de IL-6, variantes de receptor de IL-6 soluble, y péptidos parciales de IL-6 o receptor de IL-6, y compuestos de bajo peso molecular y proteínas (por ejemplo, C326 Avimer (Nature Biotechnology (2005) 23, 1556-61)) que muestran las actividades similares. Preferentemente, los inhibidores de IL-6 de la presente invención incluyen anticuerpos que reconocen receptores de IL-6.

40 La fuente de los anticuerpos no está particularmente restringida en la presente invención; sin embargo, los anticuerpos se derivan preferentemente de mamíferos, y más preferentemente se derivan de seres humanos.

Los anticuerpos anti-IL-6 usados en la presente invención se pueden obtener como anticuerpos policlonales o monoclonales usando medios conocidos. En particular, son preferentes los anticuerpos monoclonales derivados de

5 mamíferos como los anticuerpos anti-IL-6 usados en la presente invención. Los anticuerpos monoclonales derivados de mamíferos incluyen los producidos a partir de hibridomas y los producidos por procedimientos de ingeniería genética a partir de huéspedes transformados con un vector de expresión que comprende un gen de anticuerpo. Al unirse a la IL-6, el anticuerpo inhibe a la IL-6 de la unión a un receptor de IL-6 y, por tanto, bloquea la transmisión de la actividad biológica de IL-6 en la célula.

Dichos anticuerpos incluyen, MH166 (Matsuda, T. *et al.*, Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956), anticuerpo SK2 (Sato, K. *et al.*, transaction of the 21st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (1991) 21, 166), y así sucesivamente.

10 Básicamente, los hibridomas productores de anticuerpos anti-IL-6 se pueden preparar usando técnicas conocidas, como sigue: Específicamente, dichos hibridomas se pueden preparar usando la IL-6 como antígeno de sensibilización para llevar a cabo la inmunización usando un procedimiento de inmunización convencional, fusionando las células inmunitarias obtenidas con células originales conocidas por un procedimiento de fusión celular convencional, y cribando para seleccionar las células productoras de anticuerpos monoclonales usando un procedimiento de cribado convencional.

15 Más específicamente, los anticuerpos anti-IL-6 se pueden producir como sigue: Por ejemplo, la IL-6 humana para su uso como antígeno de sensibilización para obtener anticuerpos se puede obtener usando el gen de la IL-6 y/o secuencias de aminoácidos divulgados en Eur. J. Biochem. (1987) 168, 543-550; J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541; y/o Agr. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688.

20 Después de transformar una célula huésped apropiada con un sistema de vectores de expresión conocido insertado con una secuencia génica de IL-6, la proteína de IL-6 deseada se purifica usando procedimientos conocidos a partir del interior de la célula huésped o a partir del sobrenadante de cultivo. Esta proteína de IL-6 purificada se puede usar como antígeno de sensibilización. De forma alternativa, se pueden usar una proteína de fusión de la proteína de IL-6 y otra proteína como antígeno de sensibilización.

25 Los anticuerpos anti-receptor de IL-6 usados para la presente invención se pueden obtener como anticuerpos policlonales o monoclonales usando procedimientos conocidos. En particular, los anticuerpos anti-receptor de IL-6 usados en la presente invención son preferentemente anticuerpos monoclonales derivados de mamíferos. Los anticuerpos monoclonales derivados de mamíferos incluyen los producidos a partir de hibridomas y los producidos usando procedimientos de ingeniería genética a partir de huéspedes transformados con un vector de expresión que comprende un gen de anticuerpo. Al unirse a un receptor de IL-6, los anticuerpos inhiben a la IL-6 de la unión a un receptor de IL-6 y, por tanto, bloquean la transmisión de la actividad biológica de IL-6 en la célula.

30 Dichos anticuerpos incluyen, anticuerpo MR16-1 (Tamura, T. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1993) 90,11924-11928); anticuerpo PM-1 (Hirata, Y. *et al.*, J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906); anticuerpo AUK12-20 , anticuerpo AUK64-7 y anticuerpo AUK146-15 (publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 92/19759), y así sucesivamente. De estos, el anticuerpo PM-1 se puede ejemplificar como un anticuerpo monoclonal preferente frente al receptor de IL-6 humana, y el anticuerpo MR16-1 como un anticuerpo monoclonal preferente frente al receptor de IL-6 de ratón.

40 Básicamente, los hibridomas que producen un anticuerpo monoclonal anti-receptor de IL-6 se pueden preparar usando técnicas conocidas, como sigue: Específicamente, dichos hibridomas se pueden preparar usando un receptor de IL-6 como antígeno de sensibilización para llevar a cabo la inmunización por un procedimiento de inmunización convencional, fusionando las células inmunitarias obtenidas con una célula original conocida por un procedimiento de fusión celular convencional, y cribando para seleccionar las células productoras de anticuerpos monoclonales usando un procedimiento de cribado convencional.

45 Más específicamente, los anticuerpos anti-receptor de IL-6 se pueden producir como sigue: por ejemplo, un receptor de IL-6 humana o receptor de IL-6 de ratón para su uso como un antígeno de sensibilización para obtener anticuerpos se pueden obtener usando los genes del receptor de IL-6 y/o secuencias de aminoácidos divulgados en la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 325474 y la publicación de solicitud de patente japonesa Kokai n.º (JP-A) H03-155795 (solicitud de patente japonesa publicada, no examinada), respectivamente.

50 Existen dos tipos de proteínas receptoras de IL-6: una expresada en la membrana celular y la otra separada de la membrana celular (receptores de IL-6 soluble) (Yasukawa, K. *et al.*, J. Biochem. (1990) 108, 673-676). El receptor de IL-6 soluble consiste esencialmente en el receptor de IL-6 unido a la región extracelular de la membrana celular, y difiere del receptor de IL-6 unido a la membrana en que carece de la región transmembranaria o de ambas regiones transmembranaria e intracelular. Se puede emplear cualquier receptor de IL-6 como proteína receptora de IL-6,

siempre que se pueda usar como antígeno de sensibilización para producir un anticuerpo anti-receptor de IL-6 usado en la presente invención.

Después de transformar una célula huésped apropiada con un sistema de vectores de expresión conocido insertado con una secuencia génica de IL-6, la proteína receptora de IL-6 deseada se purifica a partir del interior de la célula huésped o a partir del sobrenadante de cultivo usando un procedimiento conocido. Esta proteína receptora de IL-6 purificada se puede usar como antígeno de sensibilización. De forma alternativa, se puede usar una célula que expresa el receptor de IL-6 o una proteína de fusión de la proteína receptora de IL-6 y otra proteína como antígeno de sensibilización.

Los anticuerpos anti-gp130 usados en la presente invención se pueden obtener como anticuerpos policlonales o monoclonales usando procedimientos conocidos. En particular, los anticuerpos anti-gp130 usados en la presente invención son preferentemente anticuerpos monoclonales derivados de mamíferos. Los anticuerpos monoclonales derivados de mamíferos incluyen los producidos a partir de hibridomas y los producidos usando procedimientos de ingeniería genética a partir de huéspedes transformados con un vector de expresión que comprende un gen de anticuerpo. Al unirse a gp130, el anticuerpo inhibe a gp130 de la unión al complejo IL-6/receptor de IL-6, y, por tanto, bloquea la transmisión de la actividad biológica de IL-6 en la célula.

Dichos anticuerpos incluyen, anticuerpo AM64 (documento JP-A (Kokai) H03-219894), anticuerpo 4B11 y anticuerpo 2H4 (documento US 5571513), anticuerpo B-S12 y anticuerpo B-P8 (documento JP-A (Kokai) H08-291199), y así sucesivamente.

Básicamente, los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-gp130 se pueden preparar usando técnicas conocidas, como sigue: Específicamente, dichos hibridomas se pueden preparar usando gp130 como antígeno de sensibilización para llevar a cabo la inmunización usando un procedimiento de inmunización convencional, fusionando las células inmunitarias obtenidas con una célula original conocida por un procedimiento de fusión celular convencional, y cribando para seleccionar las células productoras de anticuerpos monoclonales usando un procedimiento de cribado convencional.

Más específicamente, los anticuerpos monoclonales se pueden producir como sigue: Por ejemplo, se puede obtener gp130 para su uso como un antígeno de sensibilización para obtener anticuerpos usando el gen de gp130 y/o secuencia de aminoácidos divulgados en la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 411946.

Después de transformar una célula huésped apropiada con un sistema de vectores de expresión conocido insertado con una secuencia génica de gp130, la proteína de gp130 deseada se purifica por un procedimiento conocido a partir del interior de la célula huésped o a partir del sobrenadante de cultivo. Esta proteína de gp130 purificada se puede usar como antígeno de sensibilización. De forma alternativa, se puede usar una célula que expresa gp130 o una proteína de fusión de la proteína gp130 y otra proteína como antígeno de sensibilización.

Los mamíferos que se van a inmunizar con un antígeno de sensibilización no están particularmente limitados, pero preferentemente se seleccionan teniendo considerando la compatibilidad con la célula original usada para la fusión celular. En general, se usan roedores tales como ratones, ratas y hámsters.

Los animales se inmunizan con antígenos de sensibilización de acuerdo con procedimientos conocidos. Por ejemplo, como un procedimiento general, los animales se inmunizan por inyección intraperitoneal o subcutánea de un antígeno de sensibilización. Específicamente, el antígeno de sensibilización preferentemente se diluye o se suspende en una cantidad apropiada de solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica o similar, mezclada con una cantidad apropiada de coadyuvante general (por ejemplo, coadyuvante completo de Freund), se emulsiona, y después se administra a un mamífero varias veces, cada de cuatro a 21 días. Además, se puede usar un vehículo apropiado para la inmunización con un antígeno de sensibilización.

Después de dicha inmunización, se confirma un incremento en el nivel de un anticuerpo deseado en suero y a continuación se obtienen las células inmunitarias del mamífero para la fusión celular. Las células inmunitarias preferentes para la fusión celular incluyen, en particular, células del bazo.

Las células de mieloma de mamíferos usadas como células originales, es decir como células compañeras que se van a fusionar con las células inmunitarias anteriores, incluyen varias cepas celulares conocidas, por ejemplo, P3X63Ag8.653 (Kearney, J. F. *et al.*, J. Immunol (1979) 123, 1548-1550), P3X63Ag8U.I (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G. y Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, D. H. *et al.*, Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. *et al.* Nature (1978) 276, 269-270), FO (de St. Groth, S. F. *et al.*, J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21), S194 (Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323), R210 (Galfre, G. *et al.* Nature (1979) 277, 131-133), y similares.

Básicamente, la fusión celular de las células inmunitarias mencionadas anteriormente y las células de mieloma se puede realizar usando procedimientos conocidos, por ejemplo, el procedimiento de Milstein *et al.* (Kohler, G. y Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73, 3-46), y similares.

5 Más específicamente, la fusión celular mencionada anteriormente se logra en medio de cultivo de nutrientes general en presencia de un agente potenciadores de la fusión celular. Por ejemplo, se usan polietilenglicol (PEG), virus Sendai (HVJ) y similares, como agentes potenciadores de la fusión. Además, para potenciar la eficacia de fusión, se pueden añadir agentes auxiliares tales como dimetilsulfóxido dependiendo de las necesidades.

10 La proporción de células inmunitarias con respecto a células de mieloma usadas es preferentemente, por ejemplo, de 1 a 10 células inmunitarias por cada célula de mieloma. El medio de cultivo usado para la fusión celular mencionada anteriormente es, por ejemplo, el medio de cultivo RPMI1640 o MEM, que son adecuados para la proliferación de las células de mieloma mencionadas anteriormente. También se puede usar un medio de cultivo general usado para cultivar este tipo de células. Además, se pueden usar en combinación complementos de suero tales como suero fetal bovino (FCS).

15 Para la fusión celular, las células de fusión (hibridomas) de interés se forman mezclando cantidades predeterminadas de una célula inmunitaria mencionada anteriormente y célula de mieloma en un medio de cultivo mencionado anteriormente, y a continuación añadiendo y mezclando una concentración de un 30 % a un 60 % (p/v) de solución de PEG (por ejemplo, una solución de PEG con una media de peso molecular de aproximadamente 1.000 a 6.000) precalentada a aproximadamente 37 °C. A continuación, los agentes de fusión celular y similares que no son adecuados para el crecimiento de hibridomas se pueden retirar añadiendo repetidamente un medio de cultivo apropiado y a continuación retirando el sobrenadante por centrifugación.

20

Los hibridomas anteriores se seleccionan cultivando las células en un medio de cultivo de selección general, por ejemplo, medio de cultivo HAT (un medio de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo en medio de cultivo HAT continúa durante un período suficiente, en general de varios días a varias semanas, para destruir células distintas de los hibridomas de interés (células no fusionadas). A continuación, se realiza un procedimiento de dilución limitada estándar para cribar y clonar los hibridomas que producen un anticuerpo de interés.

25

Además de los procedimientos para inmunizar animales no humanos con antígenos para obtener los hibridomas mencionados anteriormente, los anticuerpos humanos deseados con la actividad de unión a un antígeno deseado o célula que expresa el antígeno deseado se pueden obtener sensibilizando un linfocito humano con una proteína de antígeno deseado o célula que expresa el antígeno deseado *in vitro*, y fusionando el linfocito B sensibilizado con una célula de mieloma humana (por ejemplo, U266) (véase la publicación de la solicitud de patente japonesa Kokoku n.º (JP-B) HOI-59878 (solicitud de patente japonesa aprobada y examinada, publicada para oposición)). Además, se puede obtener un anticuerpo humano deseado administrando un antígeno o célula que expresa el antígeno a un animal transgénico que tiene un repertorio de genes de anticuerpos humanos, y a continuación siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente (véanse las publicaciones de solicitud de patente internacional n.º WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 y WO 96/33735).

30

35

Los hibridomas así preparados que producen anticuerpos monoclonales se pueden subcultivar en un medio de cultivo convencional y almacenar en nitrógeno líquido durante un periodo largo.

40 Cuando se obtienen anticuerpos monoclonales a partir de los hibridomas mencionados anteriormente, se pueden emplear los siguientes procedimientos: (1) procedimientos en los que se cultivan los hibridomas de acuerdo con procedimientos convencionales y se obtienen los anticuerpos como un sobrenadante de cultivo; (2) procedimientos en los que se hacen proliferar los hibridomas administrándolos a un mamífero compatible y se obtienen los anticuerpos como ascitis; y así sucesivamente. El procedimiento anterior es preferente para obtener anticuerpos de alta pureza, y este último es preferente para una producción de anticuerpos a gran escala.

45 Por ejemplo, se pueden preparar hibridomas productores de anticuerpos anti-receptor de IL-6 por el procedimiento divulgado en el documento JP-A (Kokai) H03-139293. Dichos hibridomas se pueden preparar inyectando un hibridoma productor de anticuerpo PM-1 en la cavidad abdominal de un ratón BALB/c, obteniendo ascitis, y a continuación purificando un anticuerpo PM-1 de la ascitis; o cultivando el hibridoma en un medio apropiado (por ejemplo, medio RPMI1640 que contiene suero fetal bovino al 10 %, y BM-Condimed H1 al 5 % (Boehringer Mannheim); medio SFM de hibridoma (GIBCO-BRL); medio PFHM-II (GIBCO-BRL), etc.) y a continuación obteniendo el anticuerpo PM-1 a partir del sobrenadante de cultivo.

50

Se pueden usar anticuerpos recombinantes como los anticuerpos monoclonales de la presente invención, en los que los anticuerpos se producen usando técnicas de recombinación genética clonando un gen de anticuerpo a partir de

un hibridoma, insertando el gen en un vector apropiado, y a continuación introduciendo el vector en un huésped (véase, por ejemplo, Borrebaeck, C. A. K. y Larrick, J. W., *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, publicado en el Reino Unido por Macmillan Publishers Ltd, 1990).

Más específicamente, los ARNm que codifican las regiones variables (V) del anticuerpo se aíslan a partir de las células que producen los anticuerpos de interés, tales como hibridomas. se pueden aislar los ARNm preparando ARN totales de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como el procedimiento de ultracentrifugación de guanidina (Chirgwin, J. M. *et al.* *Biochemistry* (.1979) 18, 5294-5299) y el procedimiento AGPC (Chomczynski, P. *et al.* *Anal. Biochem.* (1987) 162, 156-159), y preparando ARNm usando el kit de purificación de ARNm (Pharmacia) y similares. De forma alternativa, se pueden preparar directamente ARNm usando un kit de purificación de ARNm QuickPrep (Pharmacia).

Los ADNc de las regiones V del anticuerpo se sintetizan a partir de los ARNm obtenidos usando transcriptasa inversa. Los ADNc se pueden sintetizar usando un kit de síntesis de ADNc de primera hebra de transcriptasa inversa de AMV y así sucesivamente. Además, para sintetizar y amplificar los ADNc, se puede emplear el procedimiento 5'-RACE (Frohman, M. A. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. *et al.* *Nucleic Acids Res.* (1989) 17, 2919-2932) usando el kit 5'-Ampli FINDER RACE (Clontech) y PCR. Se purifica un fragmento de ADN de interés a partir de los productos de PCR obtenidos y a continuación se fija con un ADN de vector. A continuación, se prepara un vector recombinante usando el ADN anterior y se introduce en *Escherichia coli* (*E. Coli*) o similar, y a continuación, se seleccionan sus colonias para preparar un vector recombinante deseado. Se confirma la secuencia de nucleótidos del ADN de interés, por ejemplo, por el procedimiento didesoxi.

Cuando se obtiene un ADN que codifica la región V de un anticuerpo de interés, se fija el ADN con un ADN que codifica una región constante (región C) del anticuerpo deseado y se inserta en un vector de expresión. De forma alternativa, se puede insertar un ADN que codifica una región V del anticuerpo en un vector de expresión que comprende un ADN de una región C del anticuerpo.

Para producir un anticuerpo que se va a usar en la presente invención, como se describe a continuación, se inserta un gen de anticuerpo en un vector de expresión de modo que se expresa bajo el control de una región reguladora de la expresión, por ejemplo, un potenciador y promotor. A continuación, se puede expresar el anticuerpo transformando una célula huésped con este vector de expresión.

En la presente invención, para reducir la heteroantigenicidad frente a humanos y similar, se pueden usar anticuerpos recombinantes genéticamente modificados de forma artificial, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos humanos. Se pueden preparar estos anticuerpos modificados usando procedimientos conocidos.

Se puede obtener un anticuerpo quimérico fijando un ADN que codifica una región V del anticuerpo, obtenido como antes, con un ADN que codifica una región C del anticuerpo humano, insertando a continuación el ADN en un vector de expresión e introduciéndolo en un huésped para la producción (véase, la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 125023; publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 92/19759). Se puede usar este procedimiento conocido para obtener anticuerpos quiméricos útiles para la presente invención.

Los anticuerpos humanizados también se denominan anticuerpos humanos remodelados, y son anticuerpos en los que las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo a partir de un mamífero distinto del ser humano (por ejemplo, un anticuerpo de ratón) se transfiere en las CDR de anticuerpos humanos. También son conocidos procedimientos generales para esta recombinación génica (véase, la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 125023, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 92/19759).

Más específicamente, las secuencias de ADN diseñadas de modo que las CDR de un anticuerpo de ratón se fijan con las regiones estructurales (FR) de un anticuerpo humano, se sintetizan por PCR a partir de varios oligonucleótidos producidos para contener porciones superpuestas en sus extremos terminales. El ADN obtenido se fija con un ADN que codifica la región C del anticuerpo humano y a continuación se inserta en un vector de expresión. El vector de expresión se introduce en un huésped para producir el anticuerpo humanizado (véase, la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 239400, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 92/19759).

Las FR del anticuerpo humano que se van a fijar por medio de las CDR se seleccionan de modo que las CDR forman sitios de unión a antígeno adecuados. El/Los aminoácido(s) dentro de las FR de las regiones variables del anticuerpo puede(n) estar sustituido(s) como sea necesario de modo que las CDR del anticuerpo humano remodelado formen un sitio de unión a antígeno apropiado (Sato, K. *et al.* *Cancer Res.* (1993) 53,851 -856).

Se usan regiones C de anticuerpo humano para los anticuerpos quiméricos y humanizados, e incluyen C_γ. Por ejemplo, se puede usar C_γ1, C_γ2, C_γ3, o C_γ4. Además, para mejorar la estabilidad de los anticuerpos o su producción, se pueden modificar las regiones C de anticuerpos humanos.

5 Los anticuerpos quiméricos consisten en la región variable de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y la región constante de un anticuerpo derivado de un ser humano; los anticuerpos humanizados consisten en las CDR de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y las regiones estructurales y las regiones constantes derivadas de un anticuerpo humano. Ambas tienen una antigenicidad reducida en el cuerpo humano, y por tanto, son útiles como anticuerpos para su uso en la presente invención.

10 Los ejemplos específicos preferidos de anticuerpos humanizados para su uso en la presente invención incluyen el anticuerpo PM-1 humanizado (véase, la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 92/19759).

15 Adicionalmente, además de los procedimientos mencionados anteriormente para obtener anticuerpos humanos, también se conocen técnicas para obtener anticuerpos humanos por selección usando una colección de anticuerpos humanos. Por ejemplo, las regiones variables de anticuerpos humanos se pueden expresar en superficies de fagos como, anticuerpos monocatenarios (scFv) usando el procedimiento de presentación en fagos, y a continuación se pueden seleccionar los fagos de unión a antígeno. Al analizar los genes de los fagos seleccionados, se pueden determinar las secuencias de ADN que codifican las regiones variables del anticuerpo humano que se unen al antígeno. Una vez que se revela la secuencia de ADN de un scFv que se une al antígeno, se puede construir un vector de expresión apropiado que comprende la secuencia para obtener un anticuerpo humano. Estos procedimientos ya son conocidos y, como referencia, se pueden usar las publicaciones de los documentos WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, y WO 95/15388.

20 Los genes de anticuerpo construidos anteriormente se pueden expresar de acuerdo con procedimientos convencionales. Cuando se usa una célula de mamífero, el gen del anticuerpo se puede expresar usando un ADN en el que el gen del anticuerpo que se va a expresar esté fijado funcionalmente a un promotor usado comúnmente útil y una señal de poli A corriente abajo del gen del anticuerpo, o un vector que comprende el ADN. Los ejemplos de un promotor/potenciador incluyen el promotor/potenciador temprano inmediato del citomegalovirus humano.

25 Además, otros promotores/potenciadores que se pueden usar para expresar los anticuerpos para su uso en la presente invención incluyen promotores/potenciadores víricos de retrovirus, poliomavirus, adenovirus, virus símico 40 (SV40), y similares; y también incluyen promotores/potenciadores derivados de células de mamífero tales como el factor de alargamiento humano 1 α (HEF1 α).

30 Por ejemplo, cuando se usa el promotor/potenciador de SV40, la expresión se puede realizar fácilmente siguiendo el procedimiento por Mulligan *et al.* (Mulligan, R. C. *et al.* Nature (1979) 277, 108-114). De forma alternativa, en el caso del promotor/potenciador de HEF1 α , se puede usar el procedimiento por Mizushima *et al.* (Mizushima, S. Y Nagata S., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322).

35 Cuando se usa *E. Coli*, se puede expresar un gen del anticuerpo fijando de manera funcional un promotor convencional, una secuencia señal para la secreción de anticuerpos y el gen del anticuerpo que se va a expresar. Los ejemplos del promotor incluyen un promotor lacZ, promotor araB y similares.

Cuando se usa un promotor lacZ, los genes se pueden expresar de acuerdo con el procedimiento de Ward *et al.* (Ward, E. S. *et al.* Nature (1989) 341, 544-546; Ward, E. S. *et al.*, FASEB J. (1992) 6, 2422-2427); y se puede usar el promotor araB de acuerdo con el procedimiento de Better *et al.* (Better, M. *et al.*, Science (1988) 240, 1041-1043).

40 Cuando se produce el anticuerpo en el periplasma de *E. Coli*, se puede usar la secuencia señal pel B (Lei, S. P. *et al.*, J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383) como secuencia señal para la secreción de anticuerpos. Se aíslan los anticuerpos producidos en el periplasma y a continuación se usan después del repliegado apropiado de la estructura de anticuerpo (véase, por ejemplo, el documento WO 96/30394).

45 Como origen de replicación, se pueden usar los derivados de SV40, poliomavirus, adenovirus, papilomavirus bovino (PVB) y similares. Además, para potenciar el número de copias génicas en un sistema de célula huésped, el vector de expresión puede comprender el gen de aminoglucósido fosfotransferasa (APH), gen de timidina cinasa (TK), gen de xantina-guanina fosforribosiltransferasa de *E. Coli* (Ecogpt), gen de dihidrofolato reductasa (dhfr), o similar como marcador de selección.

50 Se puede usar cualquier sistema de producción para preparar los anticuerpos para su uso en la presente invención. Los sistemas de producción para la preparación de anticuerpos incluyen sistemas de producción *in vitro* e *in vivo*. Los sistemas de producción *in vitro* incluyen los que usan células eucariotas o células procariotas.

Los sistemas de producción que usan células eucariotas incluyen los que usan células animales, células vegetales o células fúngicas. Dichas células animales incluyen (1) células de mamíferos, por ejemplo, CHO, COS, mieloma, de riñón de cría de hámster (BHK), HeLa, Vero, y similares; (2) células de anfibios, por ejemplo, oocito de *Xenopus*; y (3) células de insectos, por ejemplo, sf9, sf21, Tn5, y similares. Las células vegetales conocidas incluyen células derivadas de *Nicotiana tabacum*, que se puede cultivar como callo. Las células fúngicas conocidas incluyen levaduras tales como *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. Cerevisiae*), hongos de moho tales como *Aspergillus* (por ejemplo, *A. Niger*), y similares.

Los sistemas de producción que usan células procariotas incluyen los que usan células bacterianas. Las células bacterianas conocidas incluyen *E. Coli* y *Bacillus subtilis*.

Se pueden obtener anticuerpos usando una transformación para introducir un gen del anticuerpo de interés en estas células, y a continuación cultivando las células transformadas *in vitro*. Los cultivos se llevan a cabo de acuerdo con procedimientos conocidos. Por ejemplo, se pueden usar DMEM, MEM, RPMI1640, IMDM como medio de cultivo, y se pueden usar en combinación suplementos de suero tales como FCS. Además, se pueden transferir células introducidas con genes del anticuerpo a la cavidad abdominal o similar de un animal para producir los anticuerpos *in vivo*.

Por otra parte, los sistemas de producción *in vivo* incluyen los que usan animales o vegetales. Los sistemas de producción que usan animales incluyen los que usan mamíferos o insectos.

Los mamíferos que se pueden usar incluyen cabras, cerdos, ovejas, ratones, bovinos y similares (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). Además, los insectos que se pueden usar incluyen gusanos de seda. Cuando se usan vegetales, se puede usar el tabaco, por ejemplo.

Se introduce un gen de anticuerpo en estos animales o vegetales, se produce el anticuerpo en el cuerpo de los animales o vegetales, y a continuación, se recupera este anticuerpo. Por ejemplo, se puede preparar un gen del anticuerpo como gen de fusión insertándolo en el medio de un gen que codifica una proteína tal como de caseína β de cabra, que se produce únicamente en la leche. Los fragmentos de ADN que comprenden el gen de fusión, que incluye el gen del anticuerpo, se inyectan en embriones de cabra, y se introducen los embriones en cabras hembra. Se obtiene el anticuerpo deseado a partir de leche producida por los animales transgénicos nacidos de cabras que recibieron los embriones, o producida de progenitores de estos animales. A las cabras transgénicas se les pueden administrar hormonas para incrementar el volumen de leche que contiene el anticuerpo deseado que producen (Ebert, K. M. *et al.*, Bio/Technology (1994) 12, 699-702).

Cuando se usan gusanos de seda, los gusanos de seda se infectan con un baculovirus insertado con un gen del anticuerpo deseado, y se obtiene el anticuerpo deseado a partir de los fluidos corporales de estos gusanos de seda (Maeda, S. *et al.*, Nature (1985) 315, 592-594). Además, cuando se usa tabaco, se inserta el gen del anticuerpo deseado en un vector de expresión vegetal (por ejemplo, pMON530) y se introduce el vector en bacterias tales como *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria se usa para infectar tabaco (por ejemplo, *Nicotiana tabacum*) de modo que se pueden obtener los anticuerpos deseados a partir de las hojas de este tabaco (Julian, K. -C. Ma *et al.*, Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138).

Cuando se producen anticuerpos usando sistemas de producción *in vitro* o *in vivo*, como se describe anteriormente, se pueden insertar ADN que codifican una cadena pesada (cadena H) y cadena ligera (cadena L) del anticuerpo en vectores de expresión separados y a continuación se cotransforma un huésped con los vectores. De forma alternativa, se pueden insertar los ADN en un único vector de expresión para transformar un huésped (véase la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO 94/11523).

Los anticuerpos usados en la presente invención pueden ser fragmentos de anticuerpo o productos modificados de los mismos, siempre que se puedan usar de forma adecuada en la presente invención. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo incluyen Fab, F(ab')₂, Fv y de Fv monocatenario (scFv), en los que los Fv de las cadenas H y L están enlazados por medio de un enlazador adecuado.

Específicamente, los fragmentos de anticuerpos se producen tratando los anticuerpos con enzimas, por ejemplo, papaína o pepsina, o de forma alternativa, se construyen genes que codifican estos fragmentos, se introducen en vectores de expresión, y estos se expresan en células huésped apropiadas (véase, por ejemplo, Co, M. S. *et al.*, J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. y Horwitz, A. H., Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496; Plueckthun, A. y Skerra, A., Methods in Enzymology (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663; Rousseaux, J. *et al.*, Methods in Enzymology (1989) 121, 663-666; Bird, R. E. *et al.*, TIBTECH (1991) 9, 132-137).

5 Se puede obtener un scFv enlazando la región V de la cadena H y la región V de la cadena L de un anticuerpo. En el scFv, la región V de la cadena H y la región V de la cadena L se enlazan por medio de un enlazador, preferentemente por medio de un enlazador peptídico (Huston, J. S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 5879-5883). Las regiones V de las cadenas H y L en un scFv se pueden derivar de cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente. Los enlazadores peptídicos para enlazar las regiones V incluyen, por ejemplo, péptidos monocatenarios arbitrarios que consisten en de 12 a 19 residuos aminoacídicos.

10 Se puede obtener un ADN que codifica scFv usando un ADN que codifica una cadena H o una región V y un ADN que codifica una cadena L o una región V de los anticuerpos mencionados anteriormente como moldes, usando PCR para amplificar una porción de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos deseada en la secuencia de molde y usa cebadores que definen los extremos terminales de la porción, y después amplificando adicionalmente la porción de ADN amplificada con un ADN que codifica una porción del enlazador peptídico y pares de cebadores que enlazan ambos extremos del enlazador a la cadena H y cadena L.

15 Una vez que se ha obtenido un ADN que codifica scFv, se puede obtener un vector de expresión que comprende el ADN y un huésped transformado con el vector de acuerdo con procedimientos convencionales. Además, se puede obtener el scFv de acuerdo con procedimientos convencionales usando el huésped.

Como antes, se pueden producir estos fragmentos de anticuerpos a partir del huésped obteniendo y expresando sus genes. En el presente documento, un "anticuerpo" engloba dichos fragmentos de anticuerpo.

20 Como anticuerpos modificados también se pueden usar anticuerpos unidos a diversas moléculas, tales como polietilenglicol (PEG). En el presente documento, un "anticuerpo" engloba dichos anticuerpos modificados. Estos anticuerpos modificados se pueden obtener modificando químicamente los anticuerpos obtenidos. Dichos procedimientos ya están establecidos en la técnica.

25 Los anticuerpos producidos y expresados como antes se pueden aislar a partir del interior o exterior de las células o a partir de los huéspedes, y, a continuación, se pueden purificar hasta que sean homogéneos. Los anticuerpos para su uso en la presente invención se pueden aislar y/o purificar usando cromatografía de afinidad. Las columnas que se van a usar para la cromatografía de afinidad incluyen, por ejemplo, columnas de proteína A y columnas de proteína G. Los vehículos usados para las columnas de proteína A incluyen, por ejemplo, HyperD, POROS, Sepharose FF y semejantes. Además de lo anterior, se pueden usar otros procedimientos usados para el aislamiento y/o purificación de proteínas comunes, y no están limitados en modo alguno.

30 Por ejemplo, los anticuerpos usados para la presente invención se pueden aislar y/o purificar seleccionando de forma apropiada y combinando cromatografías además de cromatografía de afinidad, filtros, ultrafiltración, desestabilización salina, diálisis y semejantes. Las cromatografías incluyen, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel y semejantes. Estas cromatografías se pueden aplicar a cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC). De forma alternativa, se puede usar una HPLC de fase inversa.

35 La concentración de los anticuerpos obtenidos como antes se puede determinar por mediante medida de la absorbancia, ELISA o semejantes. Específicamente, la absorbancia se determina de forma apropiada diluyendo la solución de anticuerpo con PBS(-), midiendo la absorbancia a 280 nm, y calculando la concentración (1,35 DO = 1 mg/ml). De forma alternativa, cuando se usa ELISA, la medida se puede realizar como sigue: Específicamente, se añaden 100 µl de anti-IgG humana de cabra (TAG) a 1 µg/ml con tampón bicarbonato 0,1 M (pH 9,6) a una placa de 40 pocillos (Nimc) y se incuban durante la noche a 4 °C para inmovilizar el anticuerpo. Después del bloqueo, se añaden como patrón 100 µl de un anticuerpo diluido de forma apropiada de la presente invención o una muestra diluida de forma apropiada que comprende el anticuerpo e IgG humana (CAPPEL), y se incuban durante una hora a temperatura ambiente.

45 Después del lavado, se añaden 100 µl de anti-IgG humana marcada con fosfatasa alcalina diluida 5.000x (BIO SOURCE) y se incuba durante una hora a temperatura ambiente. Después de otro lavado, se añade solución de sustrato y se incuba, y se mide la absorbancia a 405 nm usando un Microplate Reader Model 3550 (Bio-Rad) para calcular la concentración del anticuerpo de interés.

50 Las variantes de IL-6 usadas en la presente invención son sustancias con la actividad de unión a un receptor de IL-6 y que no transmiten actividad biológica de IL-6. Es decir, las variantes de IL-6 compiten con la IL-6 para unirse a los receptores de IL-6, pero no logran transmitir la actividad biológica de IL-6, y, por ende, bloquean la transducción de señales mediadas por IL-6.

Las variantes de IL-6 se producen introduciendo una mutación(mutaciones) al sustituir residuos aminoacídicos en la secuencia de aminoácidos de IL-6. El origen de la IL-6 usada como la base de las variantes de IL-6 no está limitado, pero es preferentemente IL-6 humana en consideración con la antigenicidad y semejantes.

Más específicamente, las sustituciones aminoacídicas se realizan prediciendo la estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos de IL-6 usando programas de modelado molecular conocidos (por ejemplo, WHATIF; Vriend *et al.*, J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56), y evaluando adicionalmente la influencia del/de los residuo(s) aminoacídico(s) sustituido(s) en toda la molécula. Después de la determinación del residuo aminoacídico apropiado que se va a sustituir, se llevan a cabo procedimientos de PCR comúnmente realizados usando una secuencia de nucleótidos que codifica un gen de IL-6 humana como molde, y se introducen mutaciones para provocar sustituciones aminoacídicas, y, por tanto, se obtienen genes que codifican variantes de IL-6. Si es necesario, este gen se inserta en un vector de expresión apropiado, y la variante de IL-6 se puede obtener aplicando los procedimientos mencionados anteriormente para la expresión, producción y purificación de anticuerpos recombinantes.

Se divulgan ejemplos específicos de las variantes de IL-6 en Brakenhoff *et al.*, J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93, Savino *et al.*, EMBO J. (1994) 13, 1357-1367, el documento WO 96/18648 y el documento WO 96/17869.

Los péptidos parciales de IL-6 y del receptor de IL-6 que se van a usar en la presente invención son sustancias con la actividad de unión al receptor de IL-6 y a IL-6, respectivamente, y que no transmiten la actividad biológica de IL-6. En concreto, al unirse a y capturar un receptor de IL-6 o IL-6, los péptidos parciales de IL-6 o los péptidos parciales del receptor de IL-6 pueden inhibir específicamente que la IL-6 se una al receptor de IL-6. Como resultado, no se transmite la actividad biológica de IL-6, y se bloquea a transducción de señales mediadas por IL-6.

Los péptidos parciales de IL-6 o del receptor de IL-6 son péptidos que comprenden parte o toda la secuencia de aminoácidos de la región de la secuencia de aminoácidos de la IL-6 o del receptor de IL-6 que está implicada en la unión entre la IL-6 y el receptor de IL-6. Dichos péptidos comprenden normalmente diez a 80, preferentemente 20 a 50, más preferentemente 20 a 40 residuos aminoacídicos.

Los péptidos parciales de IL-6 o péptidos parciales del receptor de IL-6 se pueden producir de acuerdo con procedimientos conocidos en general, por ejemplo, técnicas de ingeniería genética o procedimientos de síntesis peptídica, especificando la región de la secuencia de aminoácidos de la IL-6 o del receptor de IL-6 que está implicada en la unión entre la IL-6 y el receptor de IL-6, y usando una porción o toda la secuencia de aminoácidos de la región especificada.

Cuando se prepara un péptido parcial de IL-6 o péptido parcial del receptor de IL-6 usando procedimientos de ingeniería genética, se inserta una secuencia de ADN que codifica el péptido deseado en un vector de expresión, y, a continuación, el péptido se puede obtener aplicando los procedimientos mencionados anteriormente para la expresión, producción y purificación de anticuerpos recombinantes.

Cuando se produce un péptido parcial de IL-6 o péptido parcial del receptor de IL-6 usando los procedimientos de síntesis peptídica, se pueden usar procedimientos de síntesis peptídica usados en general, por ejemplo, procedimientos de síntesis en fase sólida o procedimientos de síntesis en fase líquida.

Específicamente, los péptidos se pueden sintetizar de acuerdo con el procedimiento descrito en "Continuation of Development of Pharmaceuticals, vol. 14, Peptide Synthesis (en japonés) (ed. Haruaki Yajima, 1991, Hirokawa Shoten)". Por ejemplo, como procedimiento de síntesis en fase sólida se puede emplear el siguiente procedimiento: el aminoácido correspondiente al extremo C terminal del péptido que se va a sintetizar se une a un soporte que es insoluble en disolventes orgánicos, a continuación, la hebra peptídica se alarga repitiendo alternativamente (1) la reacción de condensación de aminoácidos, cuyos grupos α -amino y grupos funcionales de cadena ramificada están protegido con grupos protectores apropiados, una en un momento en la dirección C a N-terminal; y (2) la reacción de retirar los grupos protectores de los grupos α -amino de los aminoácidos o péptidos unidos con resina. La síntesis peptídica en fase sólida se clasifica de forma amplia en el procedimiento de Boc y el procedimiento de Fmoc, dependiendo del tipo de grupos protectores usados.

Después de sintetizar una proteína de interés, como antes, se llevan a cabo reacciones de desprotección, a continuación, hebra peptídica se escinde de su soporte. Para la reacción de escisión de hebra peptídica, en general, se usa fluoruro de hidrógeno o ácido trifluorometano sulfónico para el procedimiento de Boc, y, en general, se usa el TFA para el procedimiento de Fmoc. Por ejemplo, en el procedimiento de Boc la resina peptídica protegida mencionada anteriormente se trata con fluoruro de hidrógeno en presencia de anisol. A continuación, el péptido se recupera retirando los grupos protectores y escindiendo el péptido de su soporte. Mediante liofilización del péptido recuperado, se puede obtener un péptido en bruto. En el procedimiento de Fmoc, por otra parte, la reacción de

desprotección y la reacción para escindir la hebra péptidica del soporte se puede realizar en TFA usando un procedimiento similar a los descritos anteriormente, por ejemplo.

Los péptidos en bruto obtenidos se pueden separar y/o purificar mediante aplicación de HPLC. La elución se puede realizar en condiciones óptimas usando un sistema disolvente agua-acetonitrilo, que, en general, se usa para la purificación de proteínas. Las fracciones correspondientes a los picos del perfil cromatográfico obtenido se recogen y se liofilizan. Por tanto, las fracciones peptídicas purificadas se identifican mediante análisis de peso molecular por medio de análisis de espectro de masas, análisis de composición de aminoácidos, análisis de secuencia de aminoácido o semejantes.

Los ejemplos específicos de péptidos parciales de IL-6 y péptidos parciales del receptor de IL-6 se divulgan en el documento JP-A (Kokai) H02-188600, el documento JP-A (Kokai) H07-324097, el documento JP-A (Kokai) H08-311098, y la publicación de patente de Estados Unidos n.º US 5210075.

Los anticuerpos usados en la presente invención también pueden ser anticuerpos conjugados que se unen a diversas moléculas, tales como polietilenglicol (PEG), sustancias radiactivas y toxinas. Dichos anticuerpos modificados se pueden obtener modificando químicamente los anticuerpos obtenidos. Los procedimientos para modificar anticuerpos ya están establecidos en la técnica. Los "anticuerpos" de la presente invención engloban estos anticuerpos conjugados.

Los agentes de la presente invención para suprimir la reacción de rechazo crónico, que comprenden inhibidores de IL-6 como ingredientes activos, se pueden usar para tratar la reacción de rechazo crónico. La presente invención también proporciona agentes para suprimir la reacción de rechazo crónico de trasplante cardíaco, que comprenden un inhibidor de IL-6 como ingrediente activo.

Una reacción de rechazo que se suprime mediante agentes de supresión de la presente invención es preferentemente la reacción de rechazo crónico, que es un problema en la medicina de trasplantes actual. La reacción de rechazo crónico es una complicación caracteriza por el engrosamiento de la íntima de los vasos sanguíneos y fibrosis del intersticio, que se vuelve problemática desde un año después del postrasplante y afecta a los pronósticos a largo plazo de los receptores. La reacción de rechazo crónico progresa gradualmente incluso después de que se supera clínicamente la reacción de rechazo agudo.

Los presentes inventores han descubierto previamente el efecto terapéutico de los inhibidores de IL-6 en un modelo de ratón para un rechazo agudo postrasplante cardíaco (documento W02007/058194). El mecanismo para afecciones patológicas de la reacción de rechazo agudo mediado principalmente por linfocitos T citotóxicos se supone que es diferente del de la reacción de rechazo crónico. Las evidencias específicas que sugieren que la reacción de rechazo crónico es diferente de la reacción de rechazo agudo son como sigue:

(1) la reacción de rechazo crónico es una afección patológica específica con crecimiento celular, tal como fibrosis del intersticio y lesión de estenosis debido al engrosamiento de la íntima en tejidos lumenales de los órganos trasplantados;

(2) la aparición de la reacción de rechazo crónico no se puede suprimir mediante tratamiento inmunosupresor que es eficaz en la supresión de la reacción de rechazo agudo;

(3) la reacción de rechazo crónico es una respuesta inmunitaria que progresa de forma latente incluso después de que se supera clínicamente el rechazo agudo; y

(4) la reacción de rechazo crónico tiene factores de riesgo característicos de su aparición.

(1) Las lesiones estenósicas vasculares acompañadas por el crecimiento de células musculares lisas vasculares provocado por daño endotelial vascular se sabe que es una característica histopatológica característica de la reacción de rechazo crónico. Dichas lesiones estenósicas vasculares también se denominan lesiones vasculares postrasplante o arterioesclerosis postrasplante. Esto da como resultado trastornos circulatorios debidos a la circulación sanguínea alterada en los órganos trasplantados, y los órganos trasplantados dejan de funcionar. Por tanto, las lesiones estenósicas vasculares se han vuelto problemáticas como una complicación grave en la etapa crónica. Las causas de los daños vasculares en los órganos trasplantados incluyen trastornos de isquemia-reperfusión, estrés oxidativo y la reacción de rechazo agudo en la cirugía de trasplante. Por tanto, de hecho se han logrado algunos resultados satisfactorios en la supresión de la reacción de rechazo crónico debido al avance de técnicas para suprimir la reacción de rechazo agudo y el mantenimiento de órganos en la fase aguda. Sin embargo, no ha estado disponible ningún procedimiento preventivo definitivo. Además, (2) no existe ningún tratamiento inmunosupresor establecido eficaz para la reacción de rechazo crónico. (3) La reacción de rechazo que progresa de forma latente incluye la prolongación de la inmunidad humoral mediada por isoanticuerpos y la prolongación de una variedad de inmunidad celular mediada por la infiltración de macrófagos varias citocinas. (4) Una variedad de factores de riesgo son conocidas por estar implicados en la reacción de rechazo crónico, incluidos

los efectos secundarios de inmunosupresores, factores genéticos, infección postrasplante (citomegalovirus y semejantes), y depósito de anticuerpos en tejidos así como factores de riesgo comunes para arterioesclerosis (diabetes, hiperlipidemia, hipertensión) en los receptores. Por tanto, se supone que se produce disfunción de los órganos trasplantados debido a la complicada participación de varios factores.

5 En la presente invención, "la supresión de la reacción de rechazo crónico después del trasplante" se refiere a la supresión de los diversos síntomas descritos anteriormente asociados con la reacción de rechazo crónico, tales como la fibrosis del intersticio y estenosis debido al engrosamiento de la íntima en tejidos lumenales de los órganos trasplantados.

10 Los tipos de trasplantes de órganos para los que se pueden usar los agentes de supresión de la presente invención no están particularmente limitados, y los órganos preferentes para los trasplantes de órganos en la presente invención incluyen órganos parenquimatosos, tales como corazones, hígados, riñones, páncreas, pulmones e intestinos delgados. La presente invención también se puede aplicar al trasplante de tejidos, tales como válvulas cardíacas, vasos, piel, huesos y córneas.

15 En la presente invención, la actividad de los inhibidores de IL-6 en la inhibición de la transducción de señales de IL-6 se puede evaluar mediante procedimientos convencionales. Específicamente, se añade IL-6 a cultivos de líneas celulares de mieloma humano dependientes de IL-6 (S6B45 y KPMM2), línea celular del linfoma T de Lennert humano KT3, o la línea celular dependiente de IL-6 MH60.BSF2; y se mide la fijación de ³H-timidina por las células dependientes de IL-6 en presencia de un inhibidor de IL-6. De forma alternativa, se cultivan células U266 que expresan el receptor de IL-6, y el inhibidor de IL-6 marcado con ¹²⁵I y un inhibidor de IL-6 se añaden al cultivo al mismo tiempo; y, a continuación, se cuantifica la IL-6 marcada con ¹²⁵I unida a las células que expresan el receptor de IL-6. Además del grupo de inhibidores de IL-6, se incluye un grupo de control negativo que no contiene un inhibidor de IL-6 en el sistema de ensayo descrito anteriormente. La actividad del inhibidor de IL-6 para inhibir la IL-6 se puede evaluar comparando los resultados de ambos grupos.

25 Además, se puede evaluar si se suprime la reacción de rechazo postrasplante como sigue: en el trasplante de órganos, también se puede asumir que se logra la "supresión del daño postrasplante" cuando, como resultado, se mejora la supervivencia del injerto. La supervivencia del injerto se puede evaluar en base a si cada órgano funciona normalmente después del trasplante.

30 Como se describe en los ejemplos a continuación, se demostró que la reacción de rechazo crónico de trasplante cardíaco se suprimía administrando un anticuerpo anti-receptor de IL-6. Esto sugiere que los inhibidores de IL-6, tales como los anticuerpos anti-receptor de IL-6, son útiles como agentes para suprimir la reacción de rechazo crónico.

Los sujetos a los que se va a administrar los agentes de supresión de la presente invención son mamíferos. Los mamíferos son preferentemente seres humanos.

35 Los agentes de supresión de la presente invención se pueden administrar como fármacos, y se pueden administrar por de forma sistémica o localmente por vía oral o administración parenteral. Por ejemplo, se pueden seleccionar inyecciones intravenosas, tales como infusiones por goteo, inyecciones intramusculares, inyecciones intraperitoneales, inyecciones subcutáneas, supositorios, enemas, comprimidos entéricos orales o similares. Los procedimientos de administración apropiados se pueden seleccionar dependiendo de la edad del paciente y síntomas. La dosis eficaz por administración se selecciona del intervalo de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal. De forma alternativa, la dosis se puede seleccionar del intervalo de 1 a 1000 mg/paciente, preferentemente del intervalo de 5 a 50 mg/paciente. Una dosis y procedimiento de administración preferentes son como sigue: Por ejemplo, cuando se usa un anticuerpo anti-receptor de IL-6, la dosis eficaz es una cantidad tal que está presente anticuerpo libre en la sangre. Específicamente, se administra una dosis de 0,5 a 40 mg/kg de peso corporal/mes (cuatro semanas), preferentemente de 1 a 20 mg/kg de peso corporal/mes por medio de una inyección intravenosa, tal como con una infusión por goteo, inyección subcutánea o semejantes, de una a varias veces al mes, por ejemplo, dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas o una vez cada cuatro semanas. La pauta de administración se puede ajustar, por ejemplo, prolongando el intervalo de administración de dos veces por semana a una vez por semana a una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas, mientras se realiza un seguimiento de la afección después del trasplante y los cambios en los valores de los análisis de sangre.

50 En la presente invención, los agentes de supresión pueden contener vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como conservantes y estabilizantes. Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" se refieren a materiales que se pueden administrar simultáneamente con un agente descrito anteriormente; y pueden o no pueden producir por sí mismos el efecto descrito anteriormente de suprimir la reacción de rechazo crónico. De forma alternativa, los

vehículos pueden ser materiales que no tienen el efecto de suprimir la reacción de rechazo crónico, pero que producen un efecto de estabilización adicional o sinérgico cuando se usan en combinación con un inhibidor de IL-6.

Dichos materiales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, agua estéril, solución salina fisiológica, estabilizantes, excipientes, tampones, conservantes, tensioactivos, agentes quelantes (EDTA y semejantes) y aglutinantes.

En la presente invención, los tensioactivos incluyen tensioactivos no iónicos, y los ejemplos típicos de estos incluyen ésteres de ácido graso de sorbitán, tales como monocaprilato de sorbitán, monolaurato de sorbitán, y monopalmitato de sorbitán; ésteres de ácido graso de glicerol, tales como monocaprilato de glicerol, monomiristato de glicerol y monoestearato de glicerol; ésteres de ácidos grasos de poliglicerol, tales como el monoestearato de decaglicerilo, diestearato de decaglicerilo, y monolinoleato de decaglicerilo; ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán, tales como monolaurato de polioxietilensorbitán, monooleato de polioxietilensorbitán, monoestearato de polioxietilensorbitán, monopalmitato de polioxietilensorbitán, trioleato de polioxietilensorbitán y triestearato de polioxietilensorbitán; ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitol, tales como tetraestearato de polioxietilensorbitol y tetraoleato de polioxietilensorbitol; ésteres de ácido graso de polioxietilenglicerol, tales como monoestearato de polioxietilenglicerol; ésteres de ácido graso de polietilenglicol, tales como diestearato de polietilenglicol; polioxietilen alquil éteres, tales como polioxietilen lauril éter; polioxietilen polioxipropilen alquil éteres, tales como polioxietilen polioxipropilenglicol, polioxietilen polioxipropilen propil éter y polioxietilen polioxipropilen cetil éter; polioxietilen alquil fenil éteres, tales como polioxietilen nonilfenil éter; aceites de ricino endurecido polioxietilenado, tales como aceite de ricino polioxietilenado y aceite de ricino endurecido polioxietilenado (aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado); derivados de polioxietilen-cera de abejas, tales como polioxietilensorbitol-cera de abejas; derivados de polioxietilenlanolina, tales como polioxietilenlanolina; y amidas de polioxietilen ácidos grasos y semejantes con un EHL de seis a 18, tales como amida de polioxietilen ácido esteárico.

Los tensioactivos también incluyen tensioactivos aniónicos, y ejemplos típicos de estos incluyen, por ejemplo, alquilsulfatos que tienen un grupo alquilo con diez a 18 átomos de carbono, tales como cetilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio y oleilsulfato de sodio; polioxietilen alquil éter sulfatos en los que el grupo alquilo tiene diez a 18 átomos de carbono y el número molar promedio de óxido de etileno añadido es de 2 a 4, tales como polioxietilen lauril éter sulfato; sales de ésteres de alquil sulfosuccinato que tienen un grupo alquilo con ocho a 18 átomos de carbono, tales como éster de lauril sulfosuccinato de sodio; tensioactivos naturales, por ejemplo, lecitina; glicerofosfolípidos; esfingofosfolípidos, tales como esfingomielina; y ésteres de ácido graso de sacarosa en los que los ácidos grasos tienen de 12 a 18 átomos de carbono.

Se pueden combinar uno, dos o más de los tensioactivos descritos anteriormente y se pueden añadir a los agentes de la presente invención. Los tensioactivos que se usan preferentemente en las preparaciones de la presente invención incluyen ésteres de ácido graso de polioxietilensorbitán, tales como los polisorbatos 20, 40, 60 y 80. Son particularmente preferentes los polisorbatos 20 y 80. También son preferentes los polioxietilen polioxipropilenglicoles, tales como poloxámero (Pluronic F-68[®] y semejantes).

La cantidad de tensioactivo añadido varía dependiendo del tipo de tensioactivo usado. Cuando se usa polisorbato 20 u 80, la cantidad está, en general, en el intervalo de 0,001 a 100 mg/ml, preferentemente en el intervalo de 0,003 a 50 mg/ml, más preferentemente en el intervalo de 0,005 a 2 mg/ml.

En la presente invención, los tampones incluyen fosfato, tampón citrato, ácido acético, ácido málico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido láctico, fosfato de potasio, ácido glucónico, ácido cáprico, ácido desoxicólico, ácido salicílico, trietanolamina, ácido fumárico y otros ácidos orgánicos; y tampón de ácido carbónico, tampón Tris, tampón histidina, y tampón imidazol.

Las preparaciones de líquidos se pueden formular disolviendo los agentes en tampones acuosos conocidos en el campo de la preparación de líquidos. La concentración de tampón está, en general, en el intervalo de 1 a 500 mM, preferentemente en el intervalo de 5 a 100 mM, más preferentemente en el intervalo de 10 a 20 mM.

Los agentes de la presente invención también pueden comprender otros polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina e inmunoglobulina; aminoácidos; azúcares e hidratos de carbono, tales como polisacáridos y monosacáridos, alditoles y semejantes.

En el presente documento, los aminoácidos incluyen aminoácidos básicos, por ejemplo, arginina, lisina, histidina y ornitina, y sales inorgánicas de estos aminoácidos (preferentemente sales de clorhidrato, y sales de fosfato, en concreto, aminoácidos de fosfato). Cuando se usan aminoácidos libres, se ajusta el pH hasta un valor preferente añadiendo sustancias de tamponación fisiológicamente aceptables apropiadas, por ejemplo, ácidos inorgánicos, y, en particular, ácido clorhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido acético y ácido fórmico, y sales de los mismos.

5 En este caso, el uso de fosfato es particularmente beneficioso, ya que da productos liofilizados bastante estables. El fosfato es particularmente ventajoso cuando las preparaciones no contienen sustancialmente ácidos orgánicos, tales como ácido tartárico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico y ácido fumárico, o no contienen los aniones correspondientes (ion malato, ion tartrato, ion citrato, ion succinato, ion fumarato, y semejantes). Los aminoácidos preferentes son arginina, lisina, histidina y ornitina. También se pueden usar aminoácidos ácidos, por ejemplo, ácido glutámico y ácido aspártico, y sales de los mismos (preferentemente sales de sodio); aminoácidos neutros, por ejemplo, isoleucina, leucina, glicina, serina, treonina, valina, metionina, cisteína, y alanina; y aminoácidos aromáticos, por ejemplo, fenilalanina, tirosina, triptófano, y su derivado, N-acetilriptófano.

10 En el presente documento, los azúcares e hidratos de carbono, tales como polisacáridos y monosacáridos incluyen, por ejemplo, dextrano, glucosa, fructosa, lactosa, xilosa, manosa, maltosa, sacarosa, trehalosa y rafinosa.

En el presente documento, los alditos incluyen, por ejemplo, manitol, sorbitol e inositol.

15 Cuando los agentes de la presente invención se preparan como soluciones acuosas para inyección, los agentes se pueden mezclar con, por ejemplo, solución salina fisiológica, y/o solución isotónica que contiene glucosa u otros agentes auxiliares (tales como D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro de sodio). Las soluciones acuosas se pueden usar en combinación con agentes solubilizantes, tales como alcoholes (etanol y semejantes), polialcoholes (propilenglicol, PEG y semejantes), o tensioactivos no iónicos (polisorbato 80 y HCO-50).

Los agentes pueden comprender además, en caso necesario, diluyentes, solubilizantes, ajustadores de pH, agentes calmantes, agentes reductores que contienen azufre, antioxidantes y semejantes.

20 En el presente documento, los agentes reductores que contienen azufre incluyen, por ejemplo, compuestos que comprenden grupos sulfhidrilo, tales como N-acetilcisteína, N-acetilhomocisteína, ácido tióctico, tioglicol, tioetanolamina, tioglicerol, tiosorbitol, ácido tioglicólico y sales del mismo, tiosulfato de sodio, glutatión y ácidos tioalcanicos que tengan de uno a siete átomos de carbono.

25 Además, los antioxidantes en la presente invención incluyen, por ejemplo, ácido eritórico, dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, α -tocoferol, acetato de tocoferol, ácido L-ascórbico y sales del mismo, palmitato de ácido L-ascórbico, estearato de ácido L-ascórbico, hidrogenosulfito de sodio, sulfito de sodio, galato de triamilo, galato de propilo, y agentes quelantes, tales como etilendiaminotetraacetato (EDTA) de sodio, pirofosfato de sodio y metafosfato de sodio.

30 En caso necesario, los agentes se pueden encapsular en microcápsulas (microcápsulas de hidroximetilcelulosa, gelatina, poli(ácido metilmetacrílico) o semejantes) o preparar como sistemas de administración de fármacos coloidales (liposomas, microesferas de albúmina, microemulsión, nanopartículas, nanocápsulas y semejantes) (véase "Remington's Pharmaceutical Science edición n.º 16", Oslo Ed., 1980, y similares). Además, también se conocen procedimientos para preparar agentes como agentes de liberación prolongada, y son aplicables a la presente invención (Langer *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. 1 1981, 15, 161-277; J. Chem. Tech. (1982) 12, 98-105; patente de Estados Unidos n.º 3,773,919; solicitud de patente europea n.º (EP) 58,481; Sidman *et al.*, Biopolymers (1983) 22, 547-556; y el documento EP 133,988).

35 Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados se seleccionan forma apropiada de los descritos anteriormente o se combinan dependiendo del tipo de forma de dosificación, pero no se limitan los mismos.

La presente invención se refiere a procedimientos para suprimir la reacción de rechazo crónico, que comprende la etapa de administrar inhibidores de IL-6 a sujetos como se especifica en las reivindicaciones.

40 La presente invención también se refiere a procedimientos para suprimir la reacción de rechazo crónico de trasplante cardíaco, que comprende la etapa de administrar inhibidores de IL-6 a sujetos como se especifica en las reivindicaciones.

45 En el presente documento, el "sujeto" se refiere a los organismos o partes del cuerpo de organismos a los que se va a administrar un inhibidor de IL-6 de la presente invención. Los organismos incluyen animales (por ejemplo, un ser humano, especies de animales domésticos y animales salvajes) pero no están particularmente limitados. Las "partes del cuerpo de organismos" no están particularmente limitadas.

En el presente documento, "administración" incluye la administración oral y parenteral. La administración oral incluye, por ejemplo, la administración de agentes por vía oral. Dichos agentes por vía oral incluyen, por ejemplo, gránulos, polvos, comprimidos, cápsulas, soluciones, emulsiones y suspensiones.

La administración parenteral incluye, por ejemplo, la administración de inyecciones. Dichas inyecciones incluyen, por ejemplo, inyección intravenosas, inyecciones subcutáneas, inyecciones intramusculares e inyección intraperitoneal. Mientras tanto, los efectos de los procedimientos de la presente invención se pueden lograr introduciendo genes que comprenden oligonucleótidos que se van a administrar a organismos vivos usando técnicas de tratamiento génico.

5 De forma alternativa, los agentes de la presente invención se pueden administrar localmente en áreas de tratamiento objetivo. Por ejemplo, los agentes se pueden administrar por inyección local durante la cirugía, uso de catéteres, o administración génica diana de ADN que codifican péptidos de la presente invención.

Los agentes de supresión de la presente invención se pueden administrar a sujetos antes de un trasplante de órganos, en el momento de un trasplante de órganos, o después de un trasplante de órganos. Además, los agentes de supresión se pueden administrar una vez o repetidamente.

10

De forma alternativa, cuando se administran en una parte extirpada o administrada de un organismo, los agentes de supresión de la presente invención se pueden “poner en contacto” con la parte de un organismo.

En la presente invención, el “poner en contacto” se realiza de acuerdo con la afección del organismo. Los ejemplos incluyen pulverizar los agentes de supresión de la presente invención sobre las partes de un organismo, y añadir los agentes de supresión de la presente invención a partes de un organismo trituradas, pero no están limitados a los mismos. Cuando la parte de un organismo son células cultivadas, el “contacto” mencionado anteriormente se puede lograr añadiendo los agentes de supresión de la presente invención a un medio de cultivo de estas células, o introduciendo ADN que comprendan oligonucleótidos de la presente invención en células que constituyen la parte de un organismo.

15

Cuando se ejecutan los procedimientos de la presente invención, los agentes de la presente invención se pueden administrar como partes de composiciones farmacéuticas en combinación con al menos un quimioterapéutico conocido. De forma alternativa, los agentes de la presente invención se pueden administrar de forma simultánea con al menos un inmunodepresor conocido. En un modo de realización, se pueden administrar virtualmente de forma simultánea los quimioterapéuticos conocidos y los agentes de supresión de la presente invención.

20

Los agentes para suprimir la reacción de rechazo crónico de la presente invención se administran preferentemente de forma sistémica, pero se pueden administrar a sitios de un trasplante de órganos después de que se haya trasplantado el órgano, o se pueden administrar a las dianas al mismo tiempo que el órgano. De forma alternativa, los agentes se pueden añadir *ex vivo* al órgano antes del trasplante.

25

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La fig. 1 muestra gráficos y fotografías que ilustran el resultado de una comparación y evaluación basadas en puntuaciones de rechazo en cortes histopatológicos de los corazones trasplantados 60 días después del trasplante y la proporción de área con fibrosis.

30

La fig. 2 muestra un gráfico y fotografías que muestran el resultado de análisis para el porcentaje de estenosis vascular en las lesiones vasculares de los corazones trasplantados.

EJEMPLOS

35

A continuación en el presente documento, se describirá específicamente la presente invención con referencia a los ejemplos, pero no se debe interpretar como limitada a los mismos.

Se adquirieron como donantes ratones B6.C-H2^{bm12} por medio de Charles River Laboratories Japan Inc. de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) en Estados Unidos. Como receptores, se adquirieron ratones C57BL/6 de Japan SLC, Inc. Solamente hay leves emparejamientos incorrectos de MHC antígeno (emparejamiento incorrecto de clase II) entre las dos cepas de ratón, de modo que no se produce la reacción de rechazo agudo en los corazones trasplantados, mientras que las características histopatológicas observadas aproximadamente dos meses después del trasplante son consistentes con las de la reacción de rechazo crónico en seres humanos. Por tanto, se establecen como un modelo animal para la reacción de rechazo crónico. Los ratones se reprodujeron en el instituto para experimentos con animales de la Universidad de Shinshu (nombre formal: Division of Laboratory Animal Research, Department of Life Science, Research Center for Human and Environmental Sciences, Universidad de Shinshu) de acuerdo con los protocolos de los experimentos con animales de la institución. El trasplante cardíaco en ratón se realizó usando un modelo de ratón parcialmente modificado que procedía del modelo de ratón previamente evidenciado para el trasplante cardíaco ectópico (Corry, R. J. *et al.*, *Transplantation* (1973) 16, 343-350). Los ratones de seis a ocho semanas de edad se sometieron a trasplante cardíaco mediante microcirugía usando el procedimiento descrito a continuación.

40

45

50

5 Ambos ratones donante y receptor se anestesiaron inyectando por vía intraperitoneal pentobarbital sódico (Nenbutal (marca comercial)) a una dosis de 70 mg/kg. El corazón que se iba a trasplantar se aisló después de ligar los vasos distintos a la aorta ascendente y arteria pulmonar que se iban a usar para anastomosis. El injerto cardíaco aislado se preservó en solución salina fisiológica fría que contenía heparina al 7,5 % en hielo. El receptor se sometió a laparotomía en la línea media y los intestinos se voltearon para exponer la aorta abdominal y la vena cava inferior. Después de que se detuvo la circulación sanguínea usando micropinzas para microvasos, se efectuó una incisión de aproximadamente 1 mm en cada superficie para sitios anastomóticos. La aorta y la arteria pulmonar del corazón trasplantado se sometieron a anastomosis en la aorta abdominal y la vena cava inferior del receptor, respectivamente, mediante sutura continua usando hilo de sutura de nylon 10-0. Las micropinzas se soltaron gradualmente para reanudar la circulación sanguínea. Se confirmó que el corazón trasplantado reanudó los latidos. Después de confirmar la interrupción de la hemorragia, se suturaron la pared abdominal y la piel para cerrar el abdomen. Cada cirugía llevó aproximadamente 45 minutos. La tasa de éxito fue de un 95 % o mayor.

15 En el grupo de tratamiento, se administró MR16-1 a las cavidades peritoneales a una dosis única de 0,5 mg/cabeza dos veces por semana. Se administró IgG de rata al grupo de tratamiento de control (Ig de control) de la misma manera. Sesenta días después del trasplante, se extirparon los corazones trasplantados de los receptores y se evaluó la reacción de rechazo crónico usando los tres tipos de indicadores histopatológicos siguientes.

20 (1) Se compara el grado de reacción de rechazo en las muestras teñidas con hematoxilina-eosina y se evalúa usando puntuaciones de rechazo determinadas con los criterios para cinco grados a partir de grado 0 a 4 en base a los indicadores de presencia de infiltración celular, y necrosis miocárdica y pérdida (Billingham, M. E. *et al.*, J. Heart Transplant (1990) 9, 587-593; Rodriguez, E. R., J. Heart Lung Transplant (2003) 22, 3-15).

Los cortes histopatológicos se prepararon a partir de los corazones trasplantados 60 días después del trasplante, y se tiñeron con hematoxilina-eosina (fig. 1). Se descubrió infiltración difusa de células inflamatorias y necrosis miocárdica en el grupo de tratamiento de control (fig. 1a).

25 En el grupo tratado con MR16-1, la infiltración de células inflamatorias fue moderada y la estructura de los tejidos miocárdicos permaneció comparativamente intacta (fig. 1b). Además, la puntuación de rechazo del grupo de administración de MR16-1 fue significativamente más baja que la del grupo de tratamiento de control (fig. 1C: grupo de tratamiento de control, $3,1 \pm 0,3$; grupo de administración de MR16-1, $1,4 \pm 0,3$; $p=0,0013$).

30 (2) Se detectó fibrosis del intersticio miocárdico característica del rechazo crónico mediante tinción tricrómica de Masson. Se computó la proporción (%) del área con fibrosis en cada campo visual usando un programa informático de análisis de imagen (NIH image, versión 1.62).

El resultado mostró que el área con fibrosis se redujo significativamente en el grupo tratado con MR16-1 (fig. 1e) en comparación con el grupo de tratamiento de control (fig. 1d) (fig. 1f: grupo de tratamiento de control, $46,5 \% \pm 4,1 \%$; grupo de administración de MR16-1, $19,0 \% \pm 2,1 \%$; $p=0,0001$).

35 (3) Para analizar las lesiones vasculares postrasplante caracterizadas por angioestenosis debida a engrosamiento de la íntima, se determinó el porcentaje de estenosis vascular estimando aproximadamente la luz vascular original de la membrana elástica interna y usando el mismo programa informático de análisis de imagen de acuerdo con el procedimiento de Suzuki, J. *et al.* (Nat. Med. (1997) 3, 900-903) usando la siguiente ecuación;

Porcentaje de estenosis (%) = $((\text{área de membrana elástica interna}) - (\text{luz})) / (\text{área de membrana elástica interna}) \times 100$.

40 El resultado obtenido analizando las lesiones vasculares en los corazones trasplantados mostró que el engrosamiento de la íntima se suprimió y, por lo tanto, la estenosis de luz vascular se suprimió significativamente en el grupo tratado con MR16-1 (fig. 2b) en comparación con el grupo de tratamiento de control (fig. 2a) (fig. 2C: grupo de tratamiento de control, $59,6 \% \pm 6,0 \%$; grupo de administración de MR16-1, $23,7 \% \pm 4,2 \%$; $p=0,0019$).

45 Como se describe anteriormente, en el modelo de trasplante cardíaco en ratón, la administración de MR16-1 a los receptores suprimió la reacción de rechazo crónico de los corazones trasplantados y suprimió significativamente la fibrosis y el engrosamiento de la íntima de vasos sanguíneos en los corazones trasplantados que se consideran características histopatológicas características. La reacción de rechazo crónico es una complicación que afecta al pronóstico a largo plazo en los receptores, y por tanto, el tratamiento inmunosupresor novedosos se espera que se desarrolle a través de la aplicación clínica de los agentes de la presente invención.

50 APLICABILIDAD INDUSTRIAL

La presente invención proporciona agentes para suprimir la reacción de rechazo crónico que comprenden un inhibidor de IL-6 como ingrediente activo, y procedimientos para suprimir la reacción de rechazo crónico que comprenden la etapa de administrar un inhibidor de IL-6 a sujetos.

5 La reacción de rechazo crónico progresa gradualmente incluso después de que se supera la reacción de rechazo en fase aguda por varios inmunodepresores. La afección patológica es complicada y muy diferente en muchas maneras de la reacción de rechazo agudo. El efecto de prevenir y tratar la reacción de rechazo crónico no se ha logrado por ningún agente farmacéutico existente. La presente invención proporciona utilidades terapéuticas novedosas de inhibidores de IL-6 que tienen el efecto de suprimir el rechazo crónico. Además, puesto que los inhibidores suprimen de forma selectiva la actividad de IL-6, una citocina inflamatoria, se espera que sirvan como inmunodepresores superiores que tengan menos efectos secundarios en comparación con los agentes farmacéuticos existentes.

10

REIVINDICACIONES

1. Un agente para su uso en la supresión de la reacción de rechazo crónico, que comprende como ingrediente activo un inhibidor de IL-6 que es un anticuerpo anti-IL-6 o anticuerpo anti-receptor de IL-6.
- 5 2. Uso de un inhibidor de IL-6 que es un anticuerpo anti-IL-6 o anticuerpo anti-receptor de IL-6 para la producción de un agente para suprimir la reacción de rechazo crónico.
3. El agente de la reivindicación 1 o el uso de la reivindicación 2, en el que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 10 4. El agente o uso de la reivindicación 3, en el que el anticuerpo es un anticuerpo que reconoce una IL-6 humana o un receptor de IL-6 humana.
5. El agente o uso de la reivindicación 3 o 4, en el que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante.
6. El agente o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 3 a 5, en el que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.
- 15 7. El agente o uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en la supresión de la reacción de rechazo crónico de trasplante cardíaco.
8. Una composición farmacéutica para su uso en la supresión de la reacción de rechazo crónico que comprende el agente de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

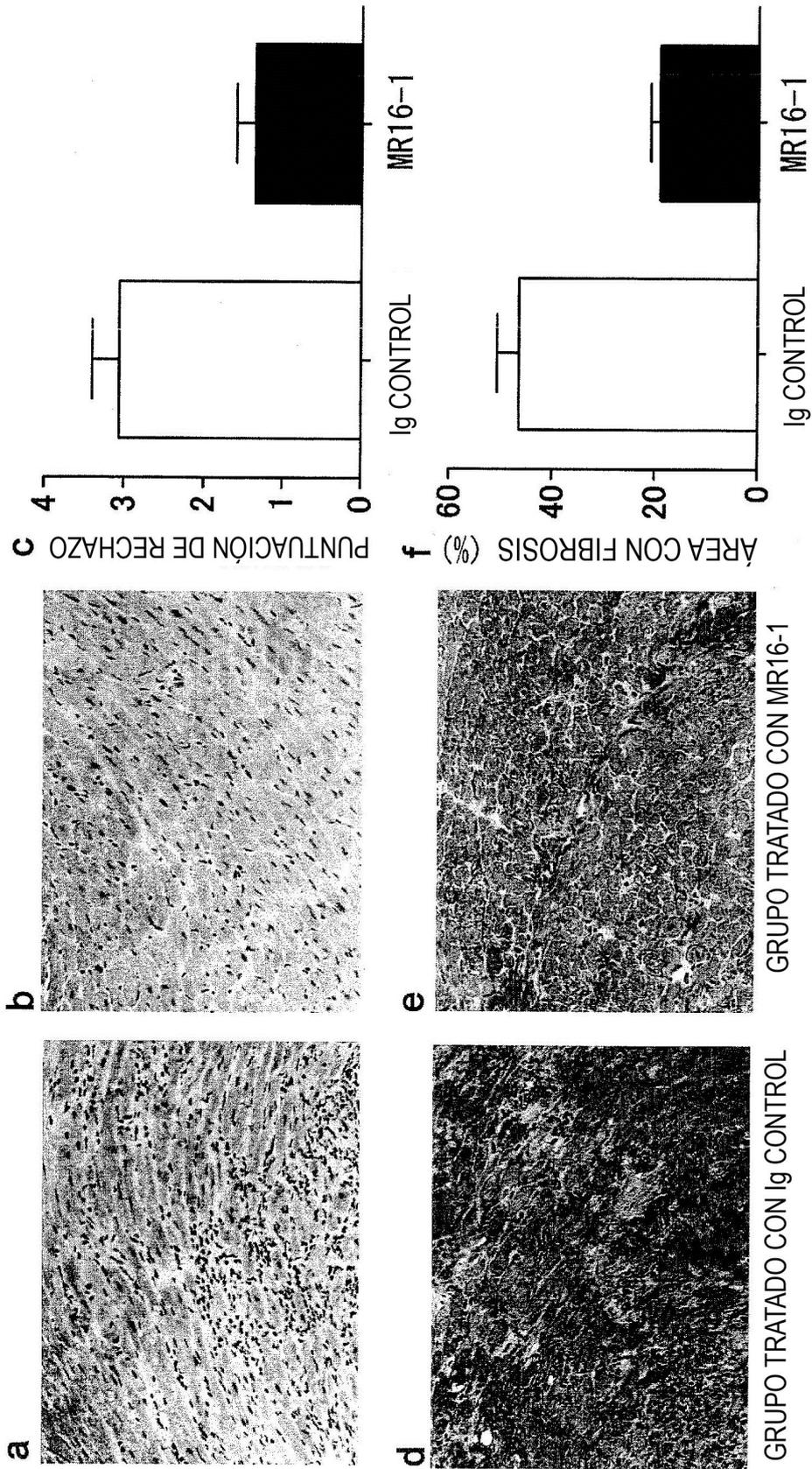


FIG. 1



FIG. 2