

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 388**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.09.2008 E 12174216 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.08.2016 EP 2527371**

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

30 Prioridad:

06.09.2007 GB 0717337

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

29.12.2016

73 Titular/es:

**UCB PHARMA S.A. (100.0%)
Allee de la Recherche 60
1070 Bruxelles, BE**

72 Inventor/es:

**MARSHALL, DIANE y
SHAW, STEVAN GRAHAM**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 595 388 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Método para el tratamiento de la glomerulonefritis

La presente invención se refiere a un nuevo uso terapéutico para agentes que interactúan con la IL-6 o modulan su actividad. Más en concreto, la invención se refiere al uso de dichos agentes en la terapia de ciertos trastornos glomerulonefríticos. De modo específico, la invención proporciona inhibidores de la actividad IL6 para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con un trastorno vasculítico, tal como la enfermedad de Wegener, y dicho tratamiento y/o profilaxis comprende la localización y la regulación del polipéptido de IL-6, y agentes que interactúan con el polipéptido o modulan su actividad (Hirano *et al.*, 1986, Nature, 324, 73-76).

Se ha demostrado que la IL-6 desempeñan un papel fundamental en la regulación inmunológica, la inflamación, la hematopoyesis y la oncogénesis. Dentro del sistema inmunológico, la IL-6 induce la producción de anticuerpos de células B aumentado la cantidad de inmunoglobulinas policlonales. También induce la expresión del receptor de la interleuquina-2 (IL-2) sobre las células T (Nomo *et al.*, 1987, Immunol. Letters, 15, 3, 249-253) y estimula producción de IL-2 en células T activadas, induciendo con ello el crecimiento y la diferenciación de células T citotóxicas (Okada *et al.*, 1988, J. Immunol., 141, 5, 1543-1549). También se sabe que la IL-6 determina la diferenciación de monocitos en macrófagos (Chomarat *et al.*, 2000, Nature Immunol., 6:510-514).

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

El receptor de la IL-6, IL-6R, se une a la IL-6 con una afinidad baja. Debido a que el IL-6R no posee un dominio de transducción de señales intracelular, únicamente la unión de IL-6 al IL-6R no conduce a la activación celular, puesto que también es necesario el elemento transductor de señales, gp130. De modo similar, la expresión en la superficie celular de IL-6R no significa que la célula responda a la estimulación por IL-6. Una ruptura proteolítica conduce a la liberación de IL-6R soluble (sIL-6R; sgp80) que puede unirse a la IL-6 en la circulación y aumentar la semivida de la IL-6. Tanto el IL-6R unido a las células como el IL-6R soluble contribuyen a la activación celular. La señalización de la IL-6 a través del IL-6R unido a las células se ha denominado señalización cis, mientras que la activación celular a través del IL-6R soluble se ha denominado señalización trans. Las células que expresan gp130, pero no IL-6R, pueden ser estimuladas por la IL-6 a través del sIL-6R.

Se conocen anticuerpos neutralizantes y bloqueantes contra la IL-6 (Kalai *et al.*, 1997, Eur. J. Biochem., 249, 690-700; Brakenhoff *et al.*, 1990, Journal of Immunology, 145, 561-568; Wendling *et al.*, 1993, J. Rheumatology, 29, 259-262; patente de EEUU 5.856.135), así como anticuerpos neutralizantes (Hansen *et al.*, Eur. J. Immunol., 1995, 25, 348-354). También se han descrito anticuerpos terapéuticos contra IL-6R (documento WO2004039826; y Kishimoto, 2005, Ann. Rev. Immunol., 23: 1-21), y en esta última referencia se describe la eficacia en la artritis reumatoide. También se ha indicado que el mismo anticuerpo ha mostrado eficacia en un estudio de fase II de la enfermedad de Crohn. También ha sido demostrada su eficacia con anticuerpos anti-IL-6 y anti-IL-6R en la enfermedad similar al lupus en ratones NZBAV FI (Fink *et al.*, 1994, J. Clin. Invest., 94, 585; Mihara *et al.*, 1998, Clin. Exp. Immunol., 112, 397), y los anticuerpos neutralizantes contra el receptor de IL-6 murino suprimen la colitis en un modelo de transferencia adoptiva de enfermedad (Yamamoto *et al.*, 2000, J. Immunol., 164, 4878; Atreya *et al.*, 2000, Nature Med., 6, 583). Liang *et al.* (Immunology, 119, 296-305) describe un anticuerpo monoclonal anti-IL6 que inhibe las respuestas inmunológicas en un modelo murino de lupus eritematoso sistémico.

El síndrome de Goodpasture es una enfermedad autoinmunitaria que se caracteriza por el depósito de anticuerpos en la membrana basal glomerular (gbm) junto con el complemento, una glomerulonefritis progresiva y, a menudo, insuficiencia renal. La reacción cruzada con la membrana basal en los pulmones provoca hemorragia pulmonar. El síndrome de Goodpasture afecta principalmente a hombres jóvenes y blancos, con una preponderancia masculina de entre 2 y 9 a 1. Afecta a ambos sexos por igual en infantes. La clasificación puede resultar difícil, porque a veces están afectados los pulmones o los riñones, pero no ambos a la vez. Sin embargo, la presencia de autoanticuerpos contra la membrana basal glomerular es una característica diagnóstica, siendo el rasgo patológico característico una glomerulonefritis semilunar, en la que la mayoría de los glomérulos muestran semilunas de una edad similar (Salama y Pusey, 2002, Curr. Opin. Nephrology and Hypertension, 11:279-286).

En general, se emplean tres tipos de tratamiento del síndrome de Goodpasture. El tratamiento sin fármacos incluye intubación, ventilación asistida y hemodiálisis, que a menudo son necesarias en la fase aguda. Una plasmaféresis repetida elimina los anticuerpos anti-membrana basal glomerular de la circulación. Sin embargo, en la mayoría de los casos, en unos pocos meses se avanza hacia una insuficiencia renal de estadio final. La enfermedad renal de

estadio final puede ser gestionada mediante una hemodiálisis a largo plazo. El tratamiento con fármacos incluye altas dosis de corticosteroides con ciclofosfamida o azatioprina. La duración de la terapia inmunosupresora varía considerablemente y puede ser necesaria durante más de 12 a 18 meses en algunos pacientes. Con respecto a los tratamientos quirúrgicos, se ha descrito el cese de la hemorragia pulmonar después de una nefrectomía bilateral.

5 También se ha empleado el trasplante renal para gestionar la enfermedad en estadio final. Debido a la naturaleza grave de estos remedios, son necesarias terapias más específicas y dirigidas para el tratamiento de la glomerulonefritis asociada con el síndrome de Goodpasture.

La vasculitis incluye la vasculitis sistémica y de vasos pequeños, tal como la asociada con enfermedades con anticuerpos antineutrófilos en la circulación, por ejemplo, la enfermedad de Wegener (también denominada granulomatosis de Wegener). La enfermedad de Wegener implica la inflamación de las arterias de los pulmones, vías nasales y riñones.

10

La nefropatía de IgA (IgAN, también conocida como enfermedad de Berger) es una enfermedad de los riñones que afecta a los glomérulos. La nefropatía de IgA es la glomerulonefritis más habitual, con depósitos de IgA en los glomérulos. Aunque está en marcha un gran número de investigaciones, aún no se entiende por qué se deposita la IgA en los riñones y por qué provoca problemas, tales como la insuficiencia renal crónica.

15

Hasta la fecha no se sabía si la IL-6 desempeña un papel en la patogénesis del síndrome de Goodpasture, la enfermedad de Wegener o la nefropatía de IgA.

La presente invención se base en el sorprendente descubrimiento de que la IL-6 representa una diana terapéutica para el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con uno o más trastornos seleccionados del grupo que consiste en el síndrome de Goodpasture, un trastorno vasculítico, la enfermedad de Wegener, la nefropatía de IgA y una enfermedad inflamatoria con implicación de la membrana basal. La invención demuestra que los inhibidores de la actividad de la IL-6 son activos en un modelo animal del síndrome de Goodpasture. De modo específico, se ha demostrado que un anticuerpo anti-IL-6 que inhibe la actividad IL-6 es activo en modelos animales del síndrome de Goodpasture.

20

La invención proporciona un agente que interacciona con la IL-6 o modula su actividad para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con un trastorno vasculítico, tal como la enfermedad de Wegener.

25

Los agentes que interaccionan con la IL-6 o modulan su actividad se denominan en lo sucesivo "inhibidores" de la actividad IL-6, en particular la actividad de la IL-6 en un trastorno vasculítico, tal como la enfermedad de Wegener. Los inhibidores (agentes) según la presente invención pueden inhibir parcial o completamente la actividad IL-6. Los inhibidores para su uso en la presente invención incluyen, sin limitación, inhibidores que son capaces de interaccionar (por ejemplo, unirse o reconocer) con la IL-6 o el IL-6R, o que son capaces de inhibir la interacción entre IL-6 y IL-6R, o que son capaces de inhibir la interacción de IL-6 y gp130, o que son capaces de inhibir la interacción entre el complejo de IL-6/IL-6R y gp130.

30

Los inhibidores de la actividad IL-6 son muy conocidos en la técnica, así como los métodos para identificar y producir estos inhibidores. Estos inhibidores pueden ser, sin limitación, anticuerpos, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN, ARN, ARN antisentido y ARNmc), carbohidratos, lípidos, proteínas, polipéptidos, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas y otros fármacos. Un inhibidor adecuado según la invención es un anticuerpo que se une a la IL-6 o al IL-6R e interfiere con la interacción de IL-6R-ligando, un anticuerpo que se une a la IL-6 e interfiere con la interacción de IL-6-gp130. Así, los agentes para su uso según la invención incluyen, sin limitación, agentes que son capaces de interaccionar (por ejemplo, unirse o reconocer) con la IL-6, o son capaces de modular la interacción o la actividad de la IL-6.

35

Los inhibidores de la actividad IL-6 son muy conocidos en la técnica, así como los métodos para identificar y producir estos inhibidores. Los ejemplos incluyen avímeros, véase, por ejemplo, Silverman *et al.*, 2005, Nat. Biotechnol., 23(12):1556-1561; anticuerpos, tales como tocilizumab (Chugai Pharmaceutical Co. Ltd.); CNTO-328 (Centocor Inc.); y proteínas de fusión sgp130/sIL-6R alfa (Conaris Research Institute AG). Así, los ejemplos de agentes candidatos incluyen, pero no se limitan a anticuerpos, ácidos nucleicos (por ejemplo, ADN y ARN), carbohidratos, lípidos, proteínas, polipéptidos, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas (por ejemplo, NCE) y otros fármacos.

40

Los agentes pueden obtenerse empleando cualquiera de las numerosas estrategias en los métodos de bancos de combinación conocidos en la técnica, que incluyen: bancos biológicos; bancos en fase de disolución o en fase sólida en paralelo accesibles espacialmente; métodos de bancos sintéticos que requieren desconvolución; el método del banco de "una esfera-un compuesto"; y métodos de bancos sintéticos que emplean la selección por cromatografía de afinidad. La estrategia del banco biológico resulta adecuada para bancos de péptidos, mientras que las otras cuatro estrategias pueden aplicarse a bancos de compuestos peptídicos, de oligómeros no peptídicos o de moléculas pequeñas (Lam, 1997, Anticancer Drug Des., 12:145; documento U.S. 5.738.996; y documento U.S. 5.807.683).

45

50

55

En la técnica pueden encontrarse ejemplos de métodos adecuados basados en la presente descripción para la

síntesis de bancos moleculares, por ejemplo, en: DeWitt *et al.*, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 90:6909; Erb *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:11422; Zuckermann *et al.*, 1994, J. Med. Chem., 37:2678; Cho *et al.*, 1993, Science, 261:1303; Carrell *et al.*, 1994, Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 33:2059; Carell *et al.*, 1994, Angew. Chem., Int. Ed. Engl., 33:2061; y Gallop *et al.*, 1994, J. Med. Chem., 37:1233. Los bancos de compuestos pueden presentarse, por ejemplo, en disolución (por ejemplo, Houghten, 1992, Bio/Techniques, 13:412- 421), o sobre esferas (Lam, 1991, Nature, 354:82-84), chips (Fodor, 1993, Nature, 364:555-556), bacterias (documento 5.223.409), esporas (documentos US 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), plásmidos (Cull *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:1865-1869) o fagos (Scott y Smith, 1990, Science, 249:386-390; Devlin, 1990, Science, 249:404-406; Cwirla *et al.*, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 87:6378-6382; y Felici, 1991, J. Mol. Biol., 222:301-310).

En una realización muy preferida, el agente es un anticuerpo que preferiblemente reconoce específicamente a la IL-6 o al IL-6R. Así, el agente para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con un trastorno vasculítico, tal como la enfermedad de Wegener, es, de forma adecuada, un anticuerpo que interacciona (es decir, se une o reconoce) con la IL-6 o modula su actividad. Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo que es un inhibidor de la actividad IL-6 para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con un trastorno vasculítico, tal como la enfermedad de Wegener.

En un ejemplo, los anticuerpos interaccionan selectivamente con la IL-6. Los anticuerpos más preferidos son los anticuerpos que interaccionan específicamente con la IL-6, preferiblemente la IL-6 humana. Que interacciona específicamente (por ejemplo, reconoce o se une) significa que los anticuerpos tienen mayor afinidad por IL-6 que por otros polipéptidos. Los ejemplos de anticuerpos adecuados son los anticuerpos que inhiben la actividad de la IL-6 mediante su unión a la IL-6 de tal forma que evitan que sea biológicamente activa, por ejemplo, evitando la unión de la IL-6 a su receptor.

En otro ejemplo, los anticuerpos interaccionan selectivamente con el receptor de la IL-6, el IL-6R. Que interacciona selectivamente (por ejemplo, reconoce o se une) significa que los anticuerpos tienen mayor afinidad por el polipéptido de IL-6R que por otros polipéptidos. Los ejemplos de anticuerpos adecuados son los anticuerpos que evitan que la IL-6 se una al receptor de IL-6. Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-IL-6R para su uso en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con un trastorno vasculítico, tal como la enfermedad de Wegener.

En la presente también se describe un agente que es un ácido nucleico que interacciona con la IL-6 o el IL-6R. Se describe el uso de un ácido nucleico de IL-6 o de IL-6R que interacciona con un polipéptido de IL-6 de mamífero o modula su expresión o actividad, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con el síndrome de Goodpasture, un trastorno vasculítico, la nefropatía de IgA o una enfermedad inflamatoria con implicación de la membrana basal. Se indica que las moléculas de ácido nucleico de IL-6 o de IL-6R pueden emplearse como moléculas antisentido, para alterar la expresión de sus respectivos polipéptidos mediante su unión a ácidos nucleicos complementarios. Los ácidos nucleicos de IL-6 o de IL-6R pueden obtenerse empleando técnicas de clonación convencionales, por ejemplo, de ADN genómico o ADNc, o pueden sintetizarse empleando técnicas conocidas y disponibles en el mercado. Los ácidos nucleicos de IL-6 o de IL-6R pueden contener una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico de IL-6 o de IL-6R. Pueden emplearse técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica para introducir mutaciones, que incluyen, por ejemplo, la mutagénesis dirigida específica de sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Un ácido nucleico antisentido descrito en la presente incluye un ácido nucleico de IL-6 o de IL-6R capaz de hibridarse, por medio de cierta complementariedad de secuencia, con una porción de un ARN (preferiblemente ARNm) que codifica el respectivo polipéptido. El ácido nucleico antisentido puede ser complementario con una región codificadora y/o no codificadora de un ARNm que codifica dicho polipéptido. Los ácidos nucleicos antisentido producen la inhibición de la expresión del polipéptido de IL-6 o de IL-6R. Así, se describe un método para el tratamiento y/o la profilaxis de MS, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de un inhibidor de la actividad IL-6, en el que el inhibidor comprende al menos ocho nucleótidos que son antisentido con respecto a un gen o ADNc que codifica un polipéptido de IL-6 o de IL-6R. También se describe el uso de ácidos nucleicos que comprenden al menos ocho nucleótidos que son antisentido con respecto a un gen o ADNc que codifica un polipéptido de IL-6 o de IL-6R, para la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con uno o más trastornos seleccionados del grupo que consiste en el síndrome de Goodpasture, un trastorno vasculítico, la enfermedad de Wegener, la nefropatía de IgA y una enfermedad inflamatoria con implicación de la membrana basal, y en particular, el síndrome de Goodpasture.

Los polipéptidos de IL-6 o de IL-6R, o las células que expresan dichos polipéptidos, pueden emplearse para producir anticuerpos, por ejemplo, que reconocen específicamente dichos polipéptidos de IL-6 o de IL-6R. Los polipéptidos de IL-6 o de IL-6R puede ser polipéptidos 'maduros' o sus derivados o fragmentos biológicamente activos. Los polipéptidos de IL-6 o de IL-6R pueden prepararse mediante procesos muy conocidos en la técnica a partir de células hospedantes genéticamente modificadas que comprenden sistemas de expresión, o pueden recuperarse a partir de fuentes biológicas naturales. En la presente solicitud, el término "polipéptidos" incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Estos se emplean de manera intercambiable a menos que se indique lo contrario. Los polipéptidos de IL-6 o de IL-6R, en algunos casos, pueden ser parte de una proteína más grande, tal como una proteína de fusión,

por ejemplo, condensada con un marcador de afinidad. Pueden obtenerse anticuerpos generados contra un polipéptido de IL-6 o de IL-6R administrando los polipéptidos a un animal, preferiblemente un animal no humano, empleando protocolos muy conocidos y habituales; véase, por ejemplo, Handbook of Experimental Immunology, D.M. Weir (ed.), vol. 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, Reino Unido, 1986. Pueden inmunizarse muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, pollos, vacas o cerdos. Sin embargo, en general se prefieren ratones, conejos, cerdos y ratas.

El término 'anticuerpo', tal como se emplea en la presente, incluye anticuerpos completos y sus derivados o fragmentos funcionalmente activos, y pueden ser, pero no se limitan a anticuerpos policlonales, monoclonales, multivalentes, multiespecíficos, humanizados o quiméricos, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos Fab' y F(ab')₂, fragmentos producidos mediante un banco de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), y fragmentos de unión a epitopos de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech., 23(9):1126-1136). Los anticuerpos incluyen moléculas de inmunoglobulinas y porciones inmunológicamente activas de moléculas de inmunoglobulinas, es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une específicamente con un antígeno. Las moléculas de inmunoglobulina de la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD o IgA) o subclase de moléculas de inmunoglobulina.

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

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

Los anticuerpos para su uso en la invención también pueden generarse empleando métodos de anticuerpos de linfocitos individuales, mediante la clonación y la expresión de ADNc de una región variable de inmunoglobulina generado a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos, por ejemplo, mediante los métodos descritos en Babcook, J. *et al.*, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 93(15), 7843-7848; documentos WO 92/02551, WO2004/051268 y WO2004/106377.

Los anticuerpos quiméricos son anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulina que han sido genéticamente modificados de modo que los genes de la cadena ligera y pesada están compuestos de segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies.

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

Los métodos para crear y fabricar anticuerpos recombinantes son muy conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Boss *et al.*, documento US 4.816.397; Cabilly *et al.*, documento US 6.331.415; Simmons *et al.*, 2002, Journal of Immunological Methods, 263, 133-147; Shrader *et al.*, documento WO 92/02551; Orlandi *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3833; Riechmann *et al.*, 1988, Nature, 322, 323; Queen *et al.*, documento US 5.585.089; Adair, documento WO91/09967; Mountain y Adair, 1992, Biotechnol. Genet. Eng. Rev., 10, 1-142; Verma *et al.*, 1998, J. Immunol. Methods, 216:165-181; Holliger y Hudson, 2005, Nature Biotech., 23(9):1126-1136).

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

Además, pueden emplearse ratones transgénicos u otros organismos, que incluyen otros mamíferos, para producir anticuerpos (véase, por ejemplo, el documento US 6.300.129).

Los fragmentos de anticuerpos y los métodos para producirlos son muy conocidos en la técnica; véase, por ejemplo, Verma *et al.*, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181.

Los ejemplos concretos de fragmentos de anticuerpos para su uso en la presente invención son los fragmentos Fab' que poseen una región de bisagra nativa o modificada. Ya se ha descrito una serie de regiones de bisagra modificadas, por ejemplo, en los documentos US 5.677.425, WO9915549, y WO9825971, y estos se incorporan en la presente como referencia.

Otros ejemplos de fragmentos de anticuerpos concretos para su uso en la presente invención incluyen los descritos en las solicitudes de patente internacional WO2005003169, WO2005003170 y WO2005003171. En particular, se prefieren los fragmentos Fab de anticuerpos modificados descritos en el documento WO2005003169.

5 Los anticuerpos para su uso en la invención incluyen análogos y derivados que están modificados, por ejemplo, pero sin limitación, mediante la unión covalente de cualquier tipo de molécula. Preferiblemente, dicha unión no altera la unión inmuno-específica. Así, un anticuerpo para su uso en la presente invención puede conjugarse con una o más moléculas efectoras. Preferiblemente, una molécula efectora puede aumentar la semivida del anticuerpo *in vivo* y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o potenciar el transporte de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunológico. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, dextrano, hidroxipropilmetacrilamida (HPMA), albúmina, proteínas de unión a la albúmina o compuestos de unión a la albúmina, tales como los descritos en el documento WO2005117984.

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

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

20 Los ejemplos concretos de polímeros sintéticos incluyen polietilenglicol, polipropilenglicol o poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos, o sus derivados, en especial polietilenglicol opcionalmente sustituido, tal como metoxipolietilenglicol, o sus derivados.

Los polímeros naturales concretos incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o sus derivados.

25 Los "derivados", tal como se emplean en la presente, incluyen los derivados reactivos, por ejemplo, grupos reactivos con tiol selectivos, tales como maleimididas y similares. El grupo reactivo puede estar unido directamente o a través de un segmento conector al polímero. Se apreciará que el resto de dicho grupo, en algunos casos, formará parte del producto como el grupo conector entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.

30 El tamaño del polímero puede variar según se desee, pero en general estará en un intervalo de peso molecular promedio de 500 Da a 50000 Da, preferiblemente de 5000 a 40000 Da, y más preferiblemente de 20000 a 40000 Da. El tamaño del polímero puede seleccionarse, en particular, basándose en el uso previsto del producto, por ejemplo, la capacidad para posicionarse en ciertos tejidos, tales como tumores, o una mayor semivida en la circulación (para un análisis, véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Así, por ejemplo, cuando el producto está previsto para que abandone la circulación y penetre en un tejido, por ejemplo, para su uso en el tratamiento de la glomerulonefritis, puede resultar ventajoso emplear un polímero de peso molecular bajo, por ejemplo, con un peso molecular de aproximadamente 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede resultar ventajoso emplear un polímero con un peso molecular más alto, por ejemplo, que tenga un peso molecular en el intervalo de 20000 Da a 40000 Da.

Los polímeros particularmente preferidos incluyen un polímero de polialquileno, tal como polietilenglicol, o, en especial, un metoxipolietilenglicol, o uno de sus derivados, y en especial con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 15000 Da a aproximadamente 40000 Da.

40 En un ejemplo, los anticuerpos para su uso en la presente invención se unen a restos polietilenglicol (PEG). En un ejemplo concreto, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo, y las moléculas de PEG pueden unirse a través de cualquier grupo funcional de aminoácido terminal o cadena lateral de un aminoácido disponible localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Estos aminoácidos pueden aparecer de forma natural en el fragmento de anticuerpo o pueden introducirse en el fragmento empleando métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, el documento US 5.219.996; documento US 5.667.425; documento WO98/25971). En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado, en el que la modificación es la adición de uno o más aminoácidos al extremo C-terminal de su cadena pesada para permitir la unión de una molécula efectora. Preferiblemente, los aminoácidos adicionales forman una región de bisagra modificada que contiene uno o más restos cisteína a los cuales puede unirse la molécula efectora. Pueden emplearse múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG.

55 Preferiblemente, las moléculas de PEG se unen covalentemente a un grupo tiol de al menos un resto cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede estar unida covalentemente al átomo de azufre de un resto cisteína localizado en el fragmento. El enlace covalente será, en general, un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se emplea un grupo tiol como punto de unión, pueden emplearse moléculas efectoras activadas de modo apropiado, por ejemplo derivados selectivos para el tiol, tales como maleimididas y derivados de cisteína. Puede emplearse un polímero activado como material de partida para la preparación de fragmentos de anticuerpos modificados con polímeros, tal como se describió anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo

al tiol, tal como un éster o ácido α -halocarboxílico, por ejemplo, yodoacetamida, una imida, por ejemplo, maleimida, una vinil sulfona o un disulfuro. Estos materiales de partida pueden obtenerse en el mercado (por ejemplo, en Nektar, antes Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EEUU) o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles en el mercado empleando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG concretas incluyen 20K metoxi-PEG-amina (que puede obtenerse en Nektar, antes Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y MPEG-SPA (que puede obtenerse en Nektar, antes Shearwater).

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

En un ejemplo, la molécula efectora es PEG y se une empleando los métodos descritos en los documentos WO98/25971 y WO2004072116, por los cuales un grupo lisil-maleimida se une al resto cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada, y cada grupo amino del resto lisilo lleva unido covalentemente un resto metoxipolietilenglicol que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. Por tanto, el peso molecular total del PEG unido al anticuerpo es de aproximadamente 40.000Da.

El PEG se une a estos fragmentos reduciendo, en primer lugar, el enlace disulfuro intercatenario entre las cisteínas intercatenarias de CL y CH1, y después uniendo el PEG a los tioles libres. Tras haber unido el PEG a las cisteínas intercatenarias no existe ningún enlace disulfuro intercatenario entre la cadena pesada y ligera. Los agentes reductores adecuados para reducir los enlaces disulfuro intercatenarios son muy conocidos en el técnica, por ejemplo, los descritos en Singh *et al.*, 1995, *Methods in Enzymology*, 251, 167-173. Los ejemplos concretos incluyen agentes reductores con base de tiol, tales como glutatión reducido (GSH), β -mercaptoetanol (β -ME), β -mercaptoetilamina (β -MA) y ditioneitol (DTT). Otros métodos incluyen el empleo de métodos electrofíticos, tales como el método descrito en Leach *et al.*, 1965, *Div. Protein. Chem.*, 4, 23-27, y el empleo de métodos de fotoreducción, tales como el método descrito en Ellison *et al.*, 2000, *Biotechniques*, 28 (2), 324-326. Sin embargo, preferiblemente, el agente reductor es un agente reductor no basado en tiol, preferiblemente uno de los agentes reductores de trialkilfosfina (Ruegg, U.T. y Rudinger, J., 1977, *Methods in Enzymology*, 47, 111-126; Burns J. *et al.*, 1991, *J. Org. Chem.*, 56, 2648-2650; Getz *et al.*, 1999, *Analytical Biochemistry*, 273, 73-80; Han y Han, 1994, *Analytical Biochemistry*, 220, 5-10; Seitz *et al.*, 1999, *Euro. J. Nuclear Medicine*, 26, 1265-1273), cuyos ejemplos concretos incluyen tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP), tris-butilfosfina (TBP), tris-(2-cianoetil)fosfina, tris-(3-hidroxiopropil)fosfina (THP) y tris-(2-hidroxietil)fosfina. Los más preferidos son los agentes reductores TCEP y THP. Será evidente para los expertos en la técnica que la concentración del agente reductor puede determinarse de modo empírico, por ejemplo, variando la concentración del agente reductor y midiendo el número de tioles libres producidos. Generalmente, el agente reductor se emplea en exceso con respecto al fragmento de anticuerpo, por ejemplo, en un exceso molar entre 2 y 1000 veces. Preferiblemente, el agente reductor está en un exceso en 2, 3, 4, 5, 10, 100 o 1000 veces. En una realización, se emplea el reductante entre 2 y 5 mM.

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

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

Para identificar los inhibidores de la actividad IL-6, los expertos en la técnica pueden adoptar una serie de estrategias diferentes. En un ejemplo, los inhibidores se identifican identificando en primer lugar los agentes que interaccionan con IL-6 o IL-6R y después ensayando dichos agentes para identificar los que inhiben la actividad IL-6.

En uno de estos ejemplos, el agente es un anticuerpo.

Los agentes que interactúan con IL-6 o IL-6R pueden identificarse empleando cualquier método adecuado, por ejemplo, empleando un sistema de ensayo sin células o basado en células, en el que el polipéptido de IL-6 o de IL-6R se pone en contacto con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato para interactuar con el polipéptido. Preferiblemente, la capacidad de un agente candidato para interactuar con el polipéptido de IL-6 o de IL-6R se compara con un intervalo de referencia o control. Si se desea, este ensayo puede emplearse para seleccionar una pluralidad (por ejemplo, un banco) de agentes candidatos empleando una pluralidad de muestras de polipéptidos de IL-6 o de IL-6R. En un ejemplo de un ensayo sin células, una primera y una segunda muestra que comprenden un polipéptido de IL-6 o de IL-6R nativo o recombinante se ponen en contacto con un agente candidato o un agente control y se determina la capacidad del agente candidato para interactuar con el polipéptido comparando la diferencia en la interacción entre el agente candidato y el agente control. Preferiblemente, el polipéptido en primer lugar se inmoviliza, por ejemplo, poniendo en contacto el polipéptido con un anticuerpo inmovilizado que lo reconoce específicamente y se une a él, o poniendo en contacto una preparación purificada del polipéptido con una superficie diseñada para unirse a proteínas. El polipéptido puede estar parcial o totalmente purificado (por ejemplo, parcial o totalmente exento de otros polipéptidos) o ser parte de un lisado de células. Además, el polipéptido puede ser una proteína de fusión que comprende el polipéptido de IL-6 o de IL-6R, o una de sus porciones biológicamente activas, y un dominio, tal como glutatiónina-S-transferasa o la región Fc de IgG1. Como alternativa, el polipéptido puede biotinilarse empleando técnicas muy conocidas por los expertos en la técnica (por ejemplo, un kit de biotinylation, Pierce Chemicals, Rockford, IL). Puede determinarse la capacidad del agente candidato para interactuar con el polipéptido por medio de métodos muy conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, ELISA, BIAcore™, citometría de flujo o la tecnología de ensayo de microvolúmenes fluorescente (FMAT). En otro ejemplo, cuando se emplea un ensayo basado en células, una población de células que expresa la IL-6 o el IL-6R se pone en contacto con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato para interactuar con el polipéptido. Preferiblemente, la capacidad de un agente candidato para interactuar con IL-6 o con IL-6R se compara con un intervalo de referencia o control. La célula, por ejemplo, puede ser de origen eucariota (por ejemplo, de levadura o de mamífero) y puede expresar el polipéptido de IL-6 o de IL-6R de modo endógeno o puede modificarse genéticamente para que exprese el polipéptido. En algunos casos, el polipéptido de IL-6 o de IL-6R o el agente candidato se marca, por ejemplo, con un marcador radiactivo (tal como ³²P, ³⁵S o ¹²⁵I) o un marcador fluorescente (tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído o fluoescamina) para permitir la detección de una interacción entre un polipéptido y un agente candidato. También pueden emplearse métodos alternativos, tales como ELISA, citometría de flujo y FMAT.

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

(i) comparando la actividad de IL-6 en presencia de un agente candidato con la actividad de dicho polipéptido en ausencia del agente candidato o en presencia de un agente control; y

(ii) determinar si el agente candidato inhibe la actividad de IL-6.

Estos ensayos pueden emplearse para seleccionar agentes candidatos, en el control clínico o en el desarrollo de fármacos.

Tal como se describió anteriormente, los agentes pueden preseleccionarse cuando resulte apropiado para identificar agentes (por ejemplo, un anticuerpo) que interactúen con la IL-6 o el IL-6R antes de seleccionar los agentes que se unen por su capacidad para inhibir la actividad IL-6.

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

Se describen inhibidores de la IL-6 que pueden infrarregular la expresión del polipéptido de IL-6 o de IL-6R, por ejemplo, inhibidores antisentido. Estos inhibidores pueden identificarse mediante cualquier método conocido en la técnica. En un ejemplo, estos inhibidores se identifican en un sistema de ensayo basado en células. Por consiguiente, una población de células que expresan un ácido nucleico o un polipéptido de IL-6 o de IL-6R se pone en contacto con un agente candidato y se determina la capacidad del agente candidato para alterar la expresión del polipéptido o ácido nucleico de IL-6 o de IL-6R mediante la comparación con un intervalo de referencia o control. En un ejemplo, unas poblaciones de células que expresan un polipéptido de IL-6 o de IL-6R se ponen en contacto con un agente candidato o un agente control y se determina la capacidad del agente candidato para alterar la expresión del polipéptido o ácido nucleico de IL-6 o de IL-6R mediante la comparación de la diferencia en el nivel de expresión de los ácidos nucleicos o los polipéptidos de IL-6 o de IL-6R entre las poblaciones de células tratadas y control. Si se desea, este ensayo puede utilizarse para seleccionar una pluralidad (por ejemplo, un banco) de agentes candidatos. La célula, por ejemplo, puede ser de origen eucariota (por ejemplo, de levadura o de mamífero) y puede expresar el polipéptido de IL-6 o de IL-6R de modo endógeno, o puede modificarse genéticamente para que exprese un

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

- 5 Los agentes que inhiben la actividad de la IL-6 pueden identificarse o volverse a ensayar, por ejemplo, para determinar las cantidades terapéuticamente eficaces en uno o más modelos animales. Los ejemplos de animales adecuados incluyen, pero no se limitan a ratones, ratas, conejos, monos, cobayas, perros y gatos. Preferiblemente, el animal empleado representará un modelo de glomerulonefritis asociada con uno o más trastornos seleccionados del grupo que consiste en el síndrome de Goodpasture, un trastorno vasculítico, la enfermedad de Wegener, la nefropatía de IgA y una enfermedad inflamatoria con implicación de la membrana basal y, lo más preferiblemente, el síndrome de Goodpasture.

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

15 En otro ejemplo, puede determinarse la inhibición de la actividad IL-6 controlando una mejora en los síntomas de la enfermedad, una aparición retrasada o un avance lento de la enfermedad, por ejemplo, pero sin limitación, una reducción en la proteinuria. Las técnicas conocidas por los médicos familiarizados con la glomerulonefritis asociada con uno o más trastornos seleccionados del grupo que consiste en el síndrome de Goodpasture, un trastorno vasculítico, la enfermedad de Wegener, la nefropatía de IgA y una enfermedad inflamatoria con implicación de la membrana basal pueden emplearse para determinar si un agente candidato ha alterado uno o más síntomas asociados con la enfermedad.

20 Tal como se analiza en la presente, los agentes que interaccionan con un polipéptido de IL-6 pueden utilizarse en el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con un trastorno vasculítico, tal como la enfermedad de Wegener. Para tal uso, los agentes en general se administrarán en forma de una composición farmacéutica.

25 Así, según la invención se proporciona una composición farmacéutica que comprende un agente que interacciona con un polipéptido de IL-6, o que modula su expresión o su actividad, y un diluyente, excipiente y/o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones farmacéuticas también pueden emplearse como vacuna y pueden comprender otros componentes aceptables para un uso como vacuna y pueden comprender además uno o más adyuvantes adecuados, tal como conocen los expertos en la técnica.

30 En lo sucesivo, los agentes de uso en la invención y los polipéptidos de IL-6 y los ácidos nucleicos de IL-6 de uso en el tratamiento y/o la profilaxis se denominan 'agentes activos'. Cuando en la presente se menciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o un trastorno empleando un agente activo o combinación de agentes concretos, debe entenderse que dicha referencia pretende incluir el uso de ese agente activo o combinación de agentes para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la profilaxis de la enfermedad o el trastorno. Además, se proporciona un anticuerpo anti-IL-6 como agente activo para su uso en la terapia de la glomerulonefritis asociada con un trastorno vasculítico, tal como la enfermedad de Wegener. Este anticuerpo puede presentarse unido o asociado con una molécula efectora, tal como se ha descrito previamente.

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

40 Los agentes activos de la invención pueden administrarse a un sujeto a través de cualquiera de las vías que se emplean convencionalmente para la administración de fármacos, por ejemplo, pueden administrarse por vía parenteral, oral, tópica (que incluye bucal, sublingual o transdérmica, o empleando el transporte intracelular mediado por partículas directamente hacia el interior de las células de la piel) o mediante inhalación. El transporte mediado por partículas se describe en Haynes, J.R., 2004, Expert Opinion on Biological Therapy, 4:889-900. La vía de administración más adecuada en cualquier caso concreto dependerá del agente activo concreto, del trastorno implicado, del sujeto y de la naturaleza y gravedad de la enfermedad, y de la condición física del sujeto.

45 Los agentes activos pueden administrarse en combinación, por ejemplo, de modo simultáneo, secuencial o por separado, con uno o más compuestos terapéuticamente activos distintos, por ejemplo, antiinflamatorios.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse de modo conveniente en formas de dosificación unitarias que

contienen una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis. Esta unidad puede contener, por ejemplo, pero sin limitación, de 750 mg/kg a 0,1 mg/kg, dependiendo del trastorno que se está tratando, de la vía de administración y de la edad, el peso y la condición del sujeto.

5 Los vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso en la invención pueden tomar una amplia variedad de formas que dependen, por ejemplo, de la vía de administración.

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

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

25 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para la administración oral pueden presentarse como unidades discretas, tales como cápsulas, sellos o comprimidos, que contienen cada uno una cantidad predeterminada del agente activo, como polvo o gránulos, o como una disolución o una suspensión en un líquido acuoso, un líquido no acuoso, una emulsión de aceite en agua o una emulsión líquida de agua en aceite. Estas composiciones pueden prepararse por medio de cualquiera de los métodos de farmacia, pero todos los métodos incluyen la etapa de poner en contacto el agente activo y el vehículo, que constituye uno o más de los ingredientes necesarios. En general, las composiciones se preparan mezclando de modo uniforme e íntimo el agente activo con los vehículos líquidos o los vehículos sólidos finamente divididos o ambos, y después, si es necesario, dando forma al producto en la presentación deseada. Por ejemplo, un comprimido puede prepararse mediante compresión o moldeado, opcionalmente con uno o más ingredientes accesorios.

35 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral pueden prepararse como disoluciones o suspensiones de los agentes activos de la invención en agua mezclada de modo adecuado con un tensioactivo, tal como hidroxipropilcelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y sus mezclas en aceites. Bajo condiciones normales de conservación y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

40 Las formas farmacéuticas adecuadas para un uso inyectable incluyen disoluciones para inyección estériles acuosas o no acuosas que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostatos y solutos que hacen que la composición sea isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones estériles acuosas y no acuosas que pueden incluir agentes suspensores y agentes espesantes. Pueden prepararse disoluciones, dispersiones y suspensiones para una inyección improvisada a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

45 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Por ejemplo, en una realización preferida, una composición farmacéutica de la invención puede administrarse con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en los documentos US 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos conocidos útiles en la presente invención incluyen: documento US 4.487.603, que describe una bomba de microinfusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; documento US 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; documento US 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para administrar una medicación a una velocidad de infusión precisa; documento US 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua del fármaco; documento US 4.439.196, que describe un sistema de administración de fármacos osmótico que tiene compartimentos de múltiples cámaras; y documento US 4.475.196, que describe un sistema de administración de fármacos osmótico. Muchos otros implantes, sistemas de administración y módulos son conocidos por los expertos en la técnica.

55 En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden formularse para asegurar una distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica excluye a muchos compuestos muy hidrófilos y puede resultar preferible administrar las composiciones farmacéuticas en liposomas. Así, en una realización de la invención, los agentes activos de la invención se formulan en liposomas; en una realización más

preferida, los liposomas incluyen un resto de transporte dirigido.

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

10 Las composiciones pueden presentarse en recipientes de dosis unitarias o de dosis múltiples, por ejemplo, en viales y ampollas selladas y, para potenciar la estabilidad, pueden conservarse en forma liofilizada que solo requiera la adición del vehículo líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes del uso. El vehículo líquido estéril puede suministrarse en un vial o ampolla separada y puede ser un disolvente o medio de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglico y polietilenglico líquido), sus mezclas adecuadas, y aceites vegetales. De modo ventajoso, pueden incluirse agentes, tales como anestésicos locales, agentes conservantes y tamponantes, en el vehículo líquido estéril.

15 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica pueden formularse como ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, disoluciones, pastas, geles, vendas impregnadas, pulverizados, aerosoles o aceites, dispositivos transdérmicos, polvos secantes y similares. Estas composiciones pueden prepararse a través de métodos convencionales que contienen el agente activo. Así, también pueden comprender aditivos y vehículos convencionales compatibles, tales como conservantes, disolventes para ayudar a la penetración del fármaco, emolientes en cremas o ungüentos, y etanol o alcohol oleílico para lociones. Estos vehículos pueden estar presentes desde aproximadamente 1% hasta aproximadamente 98% de la composición. De forma más habitual, formarán hasta aproximadamente 80% de la composición. Solo como ilustración, una crema o ungüento se prepara mezclando cantidades suficientes de material hidrófilo y agua, que contiene aproximadamente 5-10% en peso del compuesto, en cantidades suficientes para producir una crema o un ungüento con la consistencia deseada.

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

25 Para aplicaciones a tejidos externos, por ejemplo, la boca y la piel, las composiciones se aplican preferiblemente como una crema o ungüento tópico. Cuando se formula como un ungüento, el agente activo puede emplearse con una base de ungüento parafínica o miscible en agua. Como alternativa, el agente activo puede formularse en una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de agua en aceite.

30 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica en la boca incluyen comprimidos para chupar, pastillas y colutorios.

Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración tópica al ojo incluyen colirios, en los que el agente activo se disuelve o se suspende en un vehículo adecuado, en especial un disolvente acuoso. También incluyen cremas o ungüentos tópicos como se indicó anteriormente.

35 Las composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración rectal, en las que el vehículo es un sólido, se presentan de la forma más preferida como supositorios de dosis unitarias. Los vehículos adecuados incluyen manteca de cacao u otros glicéridos o materiales que se emplean habitualmente en la técnica, y los supositorios pueden formarse de modo conveniente mezclando la combinación con el vehículo o vehículos ablandados o fundidos, seguido de la utilización de moldes de enfriamiento y conformación. También pueden administrarse como enemas.

40 Las composiciones farmacéuticas adaptadas para la administración vaginal pueden presentarse como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o composiciones pulverizadas. Estos pueden comprender emolientes o bases tal como se emplean habitualmente en la técnica.

45 La dosificación que se va a administrar de un agente activo variará según el agente activo concreto, el trastorno implicado, el sujeto, y la naturaleza y gravedad de la enfermedad, y la condición física del sujeto, la edad, el peso y el género del sujeto, la dieta, el momento y la frecuencia de la administración, la combinación o combinaciones de fármacos, las sensibilidades de reacción, la tolerancia/respuesta a la terapia, y la vía de administración seleccionada; un médico será, en último término, quien determine las dosificaciones apropiadas que se vayan a utilizar. Esta dosificación puede repetirse tan a menudo como sea apropiado. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz será de 0,01 mg/kg a 100 mg/kg, preferiblemente de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg. La frecuencia de la dosis dependerá de la semivida de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una semivida corta (por ejemplo, de 2 a 10 horas), podrá ser necesario administrar una o más dosis diarias. Como alternativa, si la molécula de anticuerpo tiene una semivida larga (por ejemplo, de 2 a 15 días), puede que solo sea necesario administrar una dosificación una vez diaria, una vez semanal o incluso una vez cada 1 o 2 meses. Si se desarrollan efectos secundarios, puede alterarse o reducirse la cantidad y/o la frecuencia de la dosificación, según la práctica clínica normal.

Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse de modo conveniente en formas de dosificación unitarias que

contengan una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis. En particular, la dosis a la que se administra una molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza del trastorno que se va a tratar, del grado de la inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo está siendo utilizada de modo profiláctico o para tratar un trastorno existente.

- 5 Para el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con uno o más trastornos seleccionados del grupo que consiste en el síndrome de Goodpasture, un trastorno vasculítico, la enfermedad de Wegener, la nefropatía de IgA y una enfermedad inflamatoria con implicación de la membrana basal y, en particular, en seres humanos y animales, pueden administrarse composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos a pacientes (por ejemplo, sujetos humanos) a dosificaciones terapéutica o profilácticamente eficaces (por ejemplo, dosificaciones que produzcan una reducción en la glomerulonefritis) empleando cualquier vía de administración adecuada, tal como una inyección y otras vías de administración conocidas en la técnica para productos clínicos basados en anticuerpos.

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

- 15 Las composiciones pueden administrarse individualmente a un paciente o puede administrarse en combinación (por ejemplo, de modo simultáneo, secuencial o por separado) con otros agentes, fármacos u hormonas.

- 20 En la presente se describe un ácido nucleico que puede administrarse como un inhibidor a través de terapia génica (véase, por ejemplo, Hoshida, T. *et al.*, 2002, *Pancreas*, 25:111-121; Ikuno, Y., 2002, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2002, 43:2406-2411; Bollard, C., 2002, *Blood*, 99:3179-3187; Lee E., 2001, *Mol. Med.*, 7:773-782). La terapia génica se refiere a la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En un ejemplo, este es un ácido nucleico de IL-6 o de IL-6R o sus porciones.

- 25 La administración del ácido nucleico terapéutico hacia el interior de un paciente puede ser una terapia génica *in vivo* (es decir, el paciente se expone directamente al ácido nucleico o a un vector que contiene el ácido nucleico) o una terapia génica indirecta *ex vivo* (es decir, las células primero se transforman con el ácido nucleico *in vitro* y luego se trasplantan al paciente).

Por ejemplo, para la terapia génica *in vivo*, puede administrarse un vector de expresión que contenga el ácido nucleico de IL-6 o de IL-6R de tal forma que deviene intracelular, es decir, mediante una infección empleando un vector retroviral defectuoso o atenuado u otros vectores víricos, tal como se describe, por ejemplo, en el documento US 4.980.286, o en Robbins *et al.*, 1998, *Pharmacol. Ther.*, 80:35-47.

- 30 En la técnica se conocen diversos vectores retrovirales, tales como los descritos en Miller *et al.* (1993, *Meth. Enzymol.*, 217:581-599), que se han modificado para delecionar las secuencias retrovirales que no son necesarias para la encapsulación del genoma vírico y la posterior integración en el ADN de la célula hospedante. También pueden emplearse vectores adenovirales que son ventajosos debido a su capacidad para infectar células que no se encuentran en división, y estos vectores adenovirales de alta capacidad se describen en Kochanek (1999, *Human Gene Therapy*, 10:2451-2459). Los vectores víricos quiméricos que pueden utilizarse son los descritos en Reynolds *et al.* (1999, *Molecular Medicine Today*, 1:25-31). También pueden emplear vectores híbridos y se describen en Jacoby *et al.* (1997, *Gene Therapy*, 4:1282-1283).

- 40 En la terapia génica también puede emplearse la inyección directa de ADN desnudo o mediante el uso de bombardeo de micropartículas (por ejemplo, Gene Gun®; Biolistic, Dupont) o revistiéndolo con lípidos. Pueden emplearse receptores de la superficie celular/compuestos transfectores o la encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o la administración del ácido nucleico unido a un péptido que se sabe que entra en el núcleo o su administración unido a un ligando predispuesto a una endocitosis mediada por receptores (véase, Wu y Wu, 1987, *J. Biol. Chem.*, 262:4429-4432) para el transporte dirigido a tipos celulares que expresen específicamente los receptores de interés.

- 45 En la terapia génica *ex vivo*, un gen se traslada hacia el interior de las células *in vitro* empleando un cultivo de tejido, y las células se administran al paciente por medio de diversos métodos, que incluyen la inyección subcutánea, la aplicación de las células a un injerto de piel, y la inyección intravenosa de células sanguíneas recombinantes, tales como células progenitoras o pluripotenciales hematopoyéticas.

- 50 Las células en que puede introducirse el ácido nucleico de IL-6 o de IL-6R para realizar una terapia génica incluyen, por ejemplo, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos y células sanguíneas. Las células sanguíneas que pueden emplearse incluyen, por ejemplo, linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos, células hematopoyéticas o células progenitoras y similares.

- 55 En la presente se describe una composición farmacéutica que comprende un ácido nucleico de IL-6 o de IL-6R, en el que dicho ácido nucleico es parte de un vector de expresión que expresa un polipéptido de IL-6 o de IL-6R, o una proteína quimérica de este, en un hospedante adecuado. En particular, este ácido nucleico tiene un promotor unido operablemente a la región codificadora del polipéptido, y dicho promotor es inducible o constitutivo (y,

opcionalmente, específico de tejido).

Los polipéptidos de IL-6 recombinantes pueden prepararse mediante procesos muy conocidos en la técnica a partir de células hospedantes modificadas genéticamente que comprenden sistemas de expresión. Por consiguiente, la presente invención también se refiere a sistemas de expresión que comprenden un polipéptido de IL-6 o un ácido nucleico de IL-6, a células hospedantes que se modifican genéticamente con dichos sistemas de expresión, y a la producción de polipéptidos de IL-6 mediante técnicas recombinantes. También pueden emplearse sistemas de traducción sin células para producir polipéptidos recombinantes (por ejemplo, lisado de reticulocitos de conejo, lisado de germen de trigo, kits de transcripción y traducción de *E. coli* HY T&T y RTS 100 *in vitro* SP6/T7 de Roche Diagnostics Ltd., Lewes, Reino Unido, y el sistema de transcripción/traducción acoplado TNT Quick de Promega UK, Southampton, Reino Unido.

Para la producción del polipéptido de IL-6 recombinante, pueden modificarse genéticamente células hospedantes para que incorporen sistemas de expresión, o sus porciones, para ácidos nucleicos de IL-6. Esta incorporación puede realizarse empleando métodos muy conocidos en la técnica, tales como transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAD-dextrano, transvección, microinyección, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, cargado de legrado, introducción balística o infección (véase, por ejemplo, Davis *et al.*, Basic Methods in Molecular Biology, 1986; y Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY, 1989).

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

Puede emplearse una amplia diversidad de sistemas de expresión, tales como, sin limitación, sistemas cromosómicos, episómicos y derivados de virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, de bacteriófagos, de transposones, de episomas de levadura, de elementos de inserción, de elementos cromosómicos de levadura, de virus, tales como baculovirus, papovavirus, tales como SV40, virus de vaccinia, adenovirus, virus de la viruela de las aves de corral, virus de la pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de sus combinaciones, tales como los derivados de elementos genéticos de bacteriófagos y plásmidos, tales como cósmidos y fágmidos. Los sistemas de expresión pueden contener regiones de control que regulan, así como engendran, la expresión. En general, puede utilizarse cualquier sistema o vector que sea capaz de mantener, propagar o expresar un ácido nucleico para producir un polipéptido en un hospedante. La secuencia de ácido nucleico apropiada puede insertarse en un sistema de expresión por medio de cualquiera de las diversas técnicas conocidas y habituales, tales como las indicadas en in Sambrook *et al.*, supra. Pueden incorporarse señales de secreción apropiadas en el polipéptido de IL-6 para permitir la secreción de la proteína traducida hacia el lumen del retículo endoplásmico, el espacio periplásmico o el entorno extracelular. Estas señales pueden ser endógenas al polipéptido de IL-6 o pueden ser señales heterólogas.

Los polipéptidos de IL-6 pueden recuperarse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes o de otras fuentes biológicas por métodos muy conocidos que incluyen precipitación con sulfato de amonio o etanol, extracción con ácidos, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de hidroxilapatito, cromatografía de tamices moleculares, métodos de centrifugación, métodos de electroforesis y cromatografía de lectina. En una realización, se emplea una combinación de estos métodos. En otra realización, se emplea una cromatografía líquida de alta resolución. En otra realización, puede emplearse un anticuerpo que se une específicamente a un polipéptido de IL-6 para depurar una muestra que comprende un polipéptido de IL-6 de dicho polipéptido o para purificar dicho polipéptido. Pueden emplearse técnicas muy conocidas en la técnica para el replegamiento, para regenerar las conformaciones nativas o activas de los polipéptidos de IL-6 cuando los polipéptidos han sido desnaturalizados durante el aislamiento y/o la purificación. En el contexto de la presente invención, pueden obtenerse polipéptidos de IL-6 a partir de una muestra biológica procedente de cualquier fuente, tal como, y sin limitación, una muestra de sangre.

Los ácidos nucleicos de IL-6 o de IL6R pueden obtenerse empleando técnicas de clonación y selección convencionales, a partir de un banco de ADNc derivado de ARNm en células humanas, empleando un análisis de marcador de secuencia expresada (EST) (Adams, M. *et al.*, 1991, Science, 252:1651-1656; Adams, M. *et al.*, 1992, Nature, 355:632-634; Adams, M. *et al.*, 1995, Nature, 377, supl.:3-174). Los ácidos nucleicos de IL-6 también pueden obtenerse a partir de fuentes naturales, tales como bancos de ADN genómico, o pueden sintetizarse empleando técnicas conocidas y disponibles en el mercado. Los ácidos nucleicos de IL-6 o de IL-6R que comprenden la secuencia codificadora para los polipéptidos de IL-6 o de IL-6R pueden utilizarse para la producción recombinante de dichos polipéptidos. Los ácidos nucleicos de IL-6 o de IL-6R pueden incluir la secuencia codificadora para el polipéptido maduro solamente; o la secuencia codificadora para el polipéptido maduro en un marco de lectura con otras secuencias codificadoras, tales como las que codifican una secuencia conductora o secretora, una secuencia de pre-, pro- o prepro-proteína, una secuencia escindible u otras porciones de péptidos de fusión, tales como un marcador de afinidad o una secuencia adicional que confiere estabilidad durante la producción del polipéptido. Los marcadores de afinidad preferidos incluyen múltiples restos histidina (por ejemplo, véase Gentz

et al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:821-824), un marcador FLAG, un marcador HA o un marcador myc. Los ácidos nucleicos de IL-6 también pueden contener secuencias no codificadoras 5' y 3', tales como secuencias transcritas, no traducidas, señales de corte y empalme y de poliadenilación, sitios de unión a ribosomas y secuencias que estabilizan el ARNm.

5 Los anteriores derivados de polipéptidos de IL-6 o de IL-6R pueden crearse introduciendo una o más sustituciones, adiciones o deleciones de nucleótidos en la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico de IL-6 o de IL-6R, de modo que dichas una o más sustituciones, adiciones o deleciones se introducen en la proteína codificada. Pueden emplearse técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica para introducir mutaciones, que incluyen, por ejemplo, la mutagénesis específica dirigida a sitio y la mutagénesis mediada por PCR. Preferiblemente, se realizan sustituciones de aminoácidos conservadoras en uno o más restos aminoácidos no esenciales previstos.

10 Un ácido nucleico de IL-6 o de IL-6R que codifica un polipéptido de IL-6 o de IL-6R, incluyendo los homólogos y ortólogos de especies distintas a la humana, puede obtenerse mediante un proceso que comprende las etapas de una selección en un banco apropiado bajo condiciones de hibridación rigurosas con una sonda marcada y el aislamiento de ADNc de longitud completa y clones genómicos que contienen dicha secuencia de ácido nucleico. Estas técnicas de hibridación son muy conocidas en la técnica. Un ejemplo de unas condiciones de hibridación rigurosas es cuando la hibridación prevista se realiza a una temperatura de aproximadamente 35 °C a aproximadamente 65 °C empleando una disolución salina de aproximadamente 0,9 M. Sin embargo, los expertos en la técnica serán capaces de variar dichas condiciones según sea apropiado para tomar en cuenta variables tales como la longitud de la sonda, la composición de bases, el tipo de iones presentes, etc. Para un alto grado de selectividad, se emplean condiciones relativamente rigurosas, tales como unas condiciones de bajo contenido salino o alta temperatura, para formar dúplex. Las condiciones muy rigurosas incluyen una hibridación para filtrar el ADN unido en NaHPO₄ 0,5 M, dodecilsulfato de sodio (SDS) al 7%, EDTA 1 mM, a 65 °C, y un lavado en 0,1 x SSC/SDS al 0,1% SDS a 68 °C (Ausubel F.M. *et al.*, eds., 1989, Current Protocols in Molecular Biology, vol. I, Green Publishing Associates, Inc., and John Wiley & Sons, Inc., Nueva York, en la p. 2.10.3). Para algunas aplicaciones, son necesarias unas condiciones menos rigurosas para la formación de dúplex. Una condiciones moderadamente rigurosas incluyen un lavado en 0,2 x SSC/SDS al 0,1% a 42 °C (Ausubel *et al.*, 1989, supra). Las condiciones de hibridación también se pueden hacer más rigurosas mediante la adición de cantidades crecientes de formamida, para desestabilizar el dúplex híbrido. Así, las condiciones de hibridación concretas pueden manipularse con facilidad y, en general, se elegirán las apropiadas. En general, unas temperaturas de hibridación convenientes en presencia de formamida al 50% son: 42 °C para una sonda que es 95-100% idéntica al fragmento de un gen que codifica un polipéptido según se define en la presente, 37 °C para una identidad del 90-95%, y 32 °C para una identidad del 70-90%.

15 Los expertos en la técnica entenderán que, en muchos casos, una secuencia de ADNc aislada será incompleta, debido a que la región codificadora para el polipéptido se ha recortado en el extremo 5' del ADNc. Esto es consecuencia de la transcriptasa inversa, una enzima con una procesabilidad inherentemente baja (una medida de la capacidad de la enzima para permanecer unida al molde durante la reacción de polimerización), por lo que falla en completar una copia de ADN del molde de ARNm durante la síntesis de la primera hebra del ADNc.

20 Los métodos para obtener ADNc de longitud completa o para extender ADNc cortos son muy conocidos en la técnica, por ejemplo RACE (amplificación rápida de extremos de ADNc; por ejemplo, Frohman *et al.*, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8998-9002). Recientes modificaciones de la técnica, ejemplificadas por la tecnología Marathon™ (Clontech Laboratories Inc.) han simplificado significativamente la búsqueda de ADNc más largos. Esta tecnología emplea ADNc preparados a partir de ARNm extraído de un tejido elegido, seguido del acoplamiento de una secuencia adaptadora en cada extremo. Después se realiza una PCR para amplificar el extremo 5' que falta del ADNc empleando una combinación de cebadores oligonucleotídicos específicos de gen y específicos de adaptador. Después se repite la reacción de PCR empleando cebadores anidados que se han diseñado para que se reasocien con el producto amplificado, generalmente un cebador específico de adaptador que se reasocia en un punto más 3' en la secuencia del adaptador, y un cebador específico de gen que se reasocia en un punto más 5' en la secuencia génica conocida. Los productos de esta reacción entonces pueden analizarse mediante secuenciación de ADN y puede construirse un ADNc de longitud completa uniendo el producto directamente al ADNc existente para producir una secuencia completa, o realizando una PCR de longitud completa separada empleando la nueva información de secuencia para el diseño del cebador 5'.

25 Las características preferidas de cada realización de la invención son como las de cada una de las otras realizaciones, *mutatis mutandis*.

30 La invención se describirá a continuación remitiéndose a los siguientes ejemplos, que son solo ilustrativos y no debe considerarse que limitan el alcance de la presente invención de ninguna forma.

Leyendas de las figuras

35 La figura 1 es una histoquímica que muestra una glomerulonefritis semilunar típica en el riñón de ratones CD1 12 semanas después de una inmunización con $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ recombinante. La flecha indica una semiluna fibrosa.

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

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

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

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

Ejemplo 2: Modelo murino del síndrome de Goodpasture

10 Ratones CD1 fueron inmunizados con $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ recombinante en CFA s.c. en la base de la cola, seguido de dos recuerdos en IFA s.c. 1 y 2 semanas después. Los ratones desarrollan anticuerpos anti-membrana basal glomerular en la circulación y depositados, una proteinuria y una glomerulonefritis proliferativa focal para la semana 6 después de la inyección, que avanza a una glomerulonefritis semilunar grave para la semana 12. La histología de un animal
15 inmunizado muestra unas cicatrices glomerulares marcadas con semilunas fibrosas, cicatrices tubulointersticiales con atrofia tubular, e inflamación tubulointersticial en el riñón, tal como se muestra en la figura 1.

Ejemplo 3: Tratamiento con anticuerpos IL-6

Grupos de ratones of CD1 (n = 10) recibieron anticuerpos irrelevantes (control positivo) o anticuerpos monoclonales anti-IL-6 a una dosis de 30 mg/kg (subcutánea) semanal durante 12 semanas desde el día anterior a la inmunización con $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ recombinante.

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

Los resultados sugieren que puede inducirse de forma fiable una glomerulonefritis autoinmunitaria en el ratón CD1, y que el mAb anti-IL-6 mAb es eficaz para la prevención de las lesiones glomerulares en este modelo. Por tanto, los resultados demuestran la importancia del papel de la IL-6 en el desarrollo de una glomerulonefritis autoinmunitaria experimental e indican que las estrategias dirigidas a la IL-6 pueden proporcionar una nueva estrategia para el tratamiento de la glomerulonefritis humana.

30

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un inhibidor de la actividad IL-6 que es un anticuerpo, o un fragmento funcionalmente activo, en el que dicho anticuerpo o fragmento funcionalmente activo interacciona selectivamente con un polipéptido de IL-6 o un polipéptido de IL-6R, para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con un trastorno vasculítico.
- 2.- Un inhibidor de la actividad IL-6 que es un anticuerpo, o un fragmento funcionalmente activo, en el que dicho anticuerpo o fragmento funcionalmente activo se une a la IL-6 o al IL-6R e interfiere con la interacción IL-6R-ligando, o se une a la IL-6 e interfiere con la interacción IL-6-gp130, para su uso en el tratamiento y/o la profilaxis de la glomerulonefritis asociada con un trastorno vasculítico.
- 10 3.- Un inhibidor de la actividad IL-6 según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el anticuerpo es una IgG.
- 4.- Un inhibidor de la actividad IL-6 según las reivindicaciones 1, 2 o 3, que es tocilizumab.
- 5.- Un inhibidor de la actividad IL-6 según las reivindicaciones 1, 2 o 3, en el que el anticuerpo es monoclonal, policlonal, quimérico, humanizado o biespecífico.
- 15 6.- Un inhibidor de la actividad IL-6 según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el trastorno vasculítico es la enfermedad de Wegener.

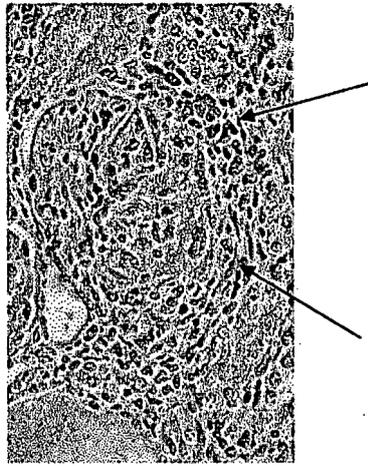


Figura 1

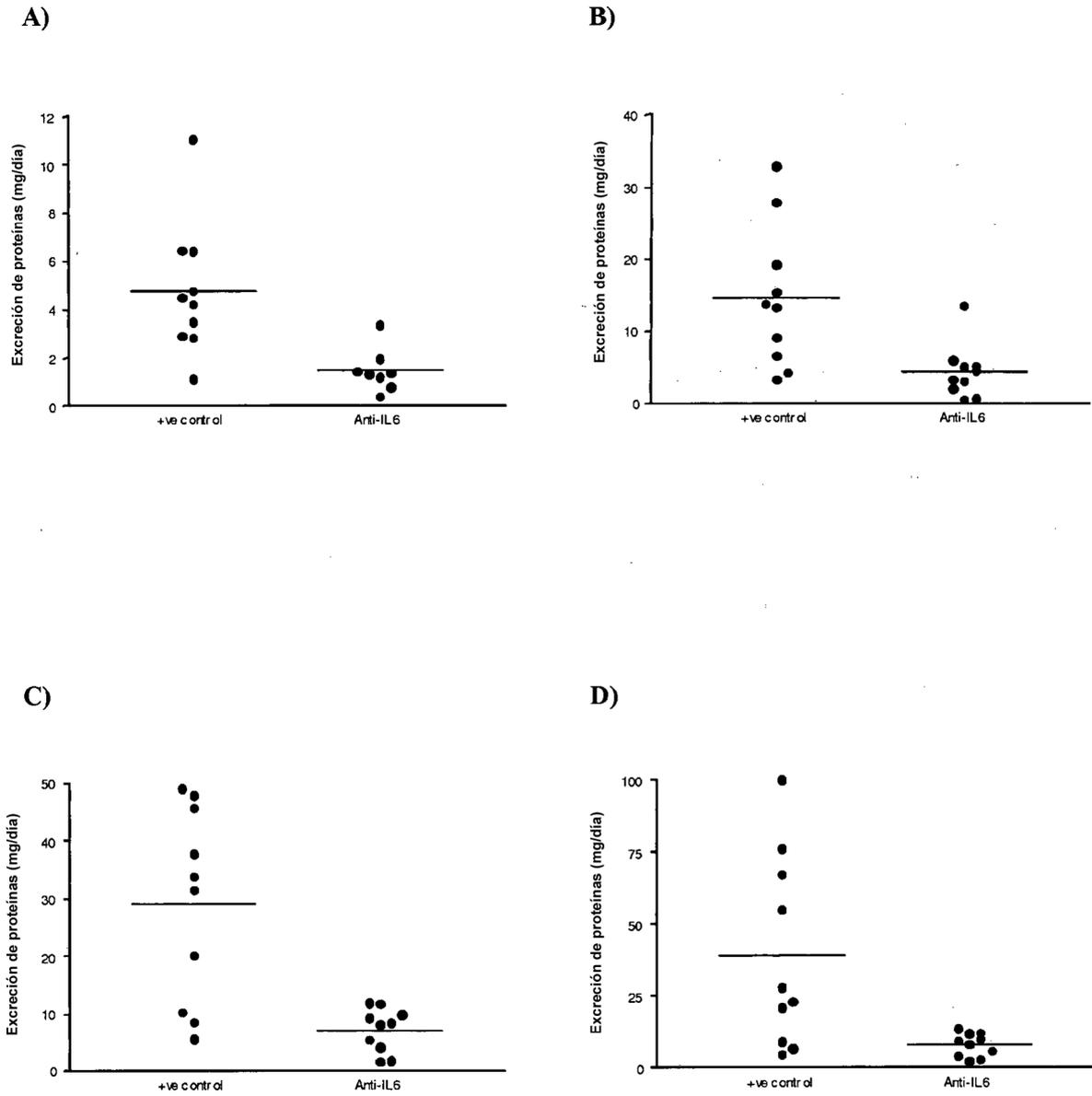


Figura 2

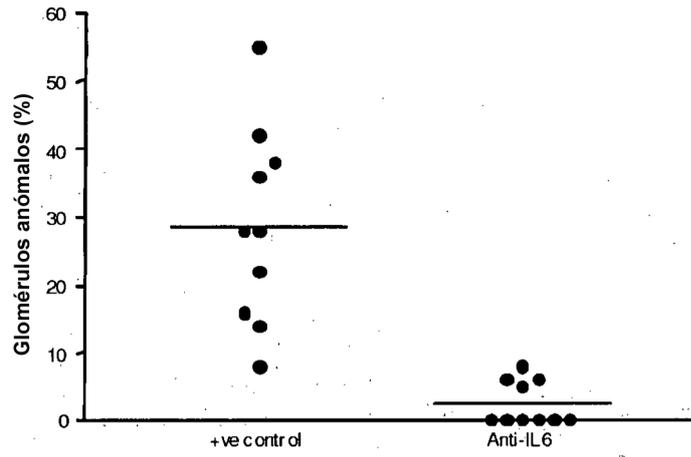


Figura 3