

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 915**

51 Int. Cl.:

A61K 45/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 27/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2007 E 16189561 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.06.2018 EP 3135298**

54 Título: **Agentes terapéuticos para enfermedades que implican neovascularización coroidea**

30 Prioridad:

27.01.2006 JP 2006018543

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

15.10.2018

73 Titular/es:

KEIO UNIVERSITY (50.0%)

15-45 Mita 2-chome, Minato-ku

Tokyo 108-8345, JP y

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (50.0%)

72 Inventor/es:

ISHIDA, SUSUMU

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 685 915 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

Agentes terapéuticos para enfermedades que implican neovascularización coroidea

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a agentes preventivos y/o terapéuticos para enfermedades que implican neovascularización coroidea, que comprenden inhibidores de IL-6 como principios activos, y usos de los mismos. La presente divulgación también se refiere a inhibidores de la neovascularización coroidea que comprenden inhibidores de IL-6 como principios activos, y usos de los mismos.

Técnica anterior

La degeneración macular asociada a la edad es una enfermedad que produce anomalía en la mácula de la retina; es la principal causa de pérdida de visión en Europa y los Estados Unidos. En Japón, la enfermedad también está aumentando cada vez más debido al envejecimiento de la población. La mácula está localizada en el centro de la retina, y la región está densamente poblada con conos de la retina entre las células fotorreceptoras. Rayos de la luz procedentes de fuera son reflejados por la córnea y el cristalino, y entonces convergen en la mácula, la fovea central en particular. La capacidad de leer letras depende de la función de esta área. En la degeneración macular asociada a la edad, la mácula, que es un área importante como se ha descrito anteriormente, degenera con la edad y produce deficiencia visual, principalmente en forma de distorsión de la imagen (anortopía) y escotoma central.

La forma húmeda de la degeneración macular asociada a la edad es una enfermedad con un mal pronóstico, que produce deficiencia visual rápida y grave. La principal afección patológica es la neovascularización coroidea (en el presente documento más adelante, abreviada algunas veces como "NVC"). La NVC se refiere al crecimiento ectópico de vasos coroideos, que penetran a través de la membrana de Bruch y los epitelios pigmentarios de la retina. En la degeneración macular asociada a la edad húmeda, la hemorragia y fuga de componentes del plasma que comprenden la grasa del plexo vascular prematuro es la causa indirecta de la rápida deficiencia funcional de la retina neural. Se cree que la NVC es inducida por células inflamatorias que principalmente comprenden macrófagos que se infiltran para fagocitar drusas acumuladas en el área macular subretiniana. Células inflamatorias tales como macrófagos también son fuentes de producción de factores angiogénicos, tales como factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y funcionan potenciando la neovascularización en sitios de inflamación. Este proceso se llama "neovascularización inflamatoria". Mientras tanto, las drusas comprenden productos finales de glucación avanzada (AGE) y amiloide β , que son sustancias que estimulan la producción de VEGF; estas sustancias estimulan los epitelios pigmentarios de la retina que han migrado para engullir drusas, produciendo la secreción de VEGF, y se cree que esto es otro posible mecanismo por el que se desarrolla NVC.

Enfermedades que implican a la NVC incluyen neovascularización coroidea miópica y neovascularización coroidea idiopática, además de degeneración macular asociada a la edad. El desarrollo de enfermedades que implican NVC puede algunas veces atribuirse a estrías angioides, lesión, uveítis, o similares. Se ha sugerido que el daño tisular principalmente de la membrana de Bruch y epitelios pigmentarios de la retina en el área macular subretiniana, y la posterior inflamación, está implicado en el mecanismo de aparición de NVC en estas enfermedades, además de en degeneración macular asociada a la edad.

Estudios recientes demostraron que VEGF producido en asociación con inflamación estaba implicado en NVC. Enfermedades que implican a NVC han sido tratadas usando antagonistas de VEGF, tales como aptámeros anti-VEGF, con cierto grado de éxito. Los antagonistas de VEGF se administran en un estado avanzado, cuando se desarrolla la neovascularización; sin embargo, esto es problemático por que el daño neurológico irreversible e incurable seguirá cuando las terapias empiezan después de entrar en esta etapa avanzada.

IL-6 es una citocina llamada factor 2 estimulante de linfocitos B (BSF2) o interferón β 2. La IL-6 fue descubierta como un factor de diferenciación implicado en la activación de linfocitos de linfocitos B (Documento no de patente 1), y después se reveló que era una citocina multifuncional que influía en la función de diversas células (Documento no de patente 2). Se ha informado que IL-6 induce la maduración de células de linfocitos T (Documento no de patente 3).

IL-6 transmite su actividad biológica mediante dos tipos de proteínas en la célula. El primer tipo de proteína es el receptor de IL-6, que es una proteína de unión a ligando a la que se une IL-6; tiene un peso molecular de aproximadamente 80 kDa (Documentos no de patente 4 a 5). El receptor de IL-6 está presente en una forma unida a la 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.

El otro tipo de proteína es la proteína de membrana gp130, que tiene un peso molecular de aproximadamente 130 kDa y participa en la transducción de señales de unión a ligando. La actividad biológica de IL-6 se transmite a la célula mediante la formación de un complejo de IL-6/receptor de IL-6 por el IL-6 y el receptor de IL-6, seguido de la unión del complejo con gp130 (Documento no de patente 6).

Los inhibidores de IL-6 son sustancias que inhiben la transmisión de la actividad biológica de IL-6. Actualmente, inhibidores de IL-6 conocidos incluyen anticuerpos contra IL-6 (anticuerpos anti-IL-6), anticuerpos contra el receptor de IL-6 (anticuerpos anti-receptor de IL-6), anticuerpos contra gp130 (anticuerpos anti-gp130), variantes de IL-6, péptidos parciales de IL-6 o receptor de IL-6, y similares.

Hay varios informes referentes a los anticuerpos anti-receptor de IL-6 (Documentos no de patente 7 a 8 y Documentos de patente 1 a 3). Un informe tal detalla un anticuerpo contra PM-1 humanizado, que se obtiene por trasplante de la región determinante de la complementariedad (CDR) del anticuerpo PM-1 de ratón (Documento no de patente 9), que es un anticuerpo anti-receptor de IL-6, en un anticuerpo humano (Documento de patente 4).

Se ha informado recientemente que el nivel de citocina inflamatoria IL-6 en pacientes con degeneración macular asociada a la edad es elevado (Documento no de patente 10). Sin embargo, sigue sin aclararse la función de IL-6 en enfermedades que implican NVC.

La bibliografía del estado de la técnica referente a la presente invención de la presente solicitud se muestra a continuación.

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 Estados Unidos N.º 5216128

Documento de patente 4: Publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 92/19759

Documento no de patente 1: Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76

Documento no de patente 2: Akira, S. et al., Adv. In Immunology (1993) 54, 1-78

Documento no de patente 3: Lotz, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258

Documento no de patente 4: Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981

Documento no de patente 5: Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828

Documento no de patente 6: Taga, T. et al., Cell (1989) 58, 573-581

Documento no de patente 7: Novick, D. et al., Hybridoma (1991) 10, 137-146

Documento no de patente 8: Huang, Y. W. et al., Hybridoma (1993) 12, 621-630

Documento no de patente 9: Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906

Documento no de patente 10: Seddon J. M., Arch Ophthalmol. 2005 Jun, 123(6), 774-82

El documento WO2004/045507 desvela usos antiangiogénicos de antagonistas de IL-6.

El documento US2005/0096257 desvela terapia de combinación para el tratamiento de trastornos neovasculares oculares.

Divulgación de la invención

[Problemas a resolver por la invención]

La presente invención se logró en vista de la situación anterior. Es un objetivo de la presente invención proporcionar agentes preventivos y/o terapéuticos para enfermedades que implican neovascularización coroidea, que comprenden anticuerpos que reconocen una IL-6 como inhibidores de IL-6 como principios activos. Es otro objetivo de la presente invención proporcionar inhibidores de neovascularización coroidea, que comprenden inhibidores de IL-6 como principios activos.

Es todavía otro objetivo de la presente invención proporcionar métodos de tratamiento de enfermedades que implican neovascularización coroidea, que comprenden la etapa de administrar un inhibidor de IL-6 a un sujeto que ha desarrollado una enfermedad que implica neovascularización coroidea.

[Medios para resolver los problemas]

Con el fin de resolver los problemas anteriores, los presentes inventores observaron que la NVC se potencia por inflamación en el área macular subretiniana, y así desarrollaron agentes para suprimir el inicio o avance de la neovascularización inducida por factores angiogénicos tales como VEGF. Específicamente, los presentes inventores descubrieron que el avance de NVC podría inhibirse administrando anticuerpo monoclonal anti-receptor de IL-6 a ratones en los que la NVC ha sido inducida por fotocoagulación con láser.

Es decir, los presentes inventores descubrieron que el avance de NVC podría suprimirse administrando inhibidores de IL-6, y así se completó la presente invención.

Más específicamente, la presente invención proporciona los siguientes [1] a [9]:

[1] Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de IL-6 como principio activo para su uso en prevenir y/o tratar una enfermedad que implica neovascularización coroidea, en la que el inhibidor de IL-6 es un

anticuerpo que reconoce una IL-6, en la que la enfermedad que implica neovascularización coroidea es degeneración macular asociada a la edad, neovascularización coroidea miópica o neovascularización coroidea idiopática.

[2] Uso de un inhibidor de IL-6 para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar una enfermedad que implica neovascularización coroidea, en la que el inhibidor de IL-6 es un anticuerpo que reconoce una IL-6, en la que la enfermedad que implica neovascularización coroidea es degeneración macular asociada a la edad, neovascularización coroidea miópica o neovascularización coroidea idiopática.

[3] La composición farmacéutica para uso o el uso de [1] o [2], en la que dicho inhibidor de IL-6 es para administración a un sujeto que ha desarrollado dicha enfermedad que implica neovascularización coroidea.

[4] Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de IL-6 como principio activo para su uso en inhibir la neovascularización coroidea en una enfermedad que implica neovascularización coroidea, en la que el inhibidor de IL-6 es un anticuerpo que reconoce una IL-6, en la que la enfermedad que implica neovascularización coroidea es degeneración macular asociada a la edad, neovascularización coroidea miópica o neovascularización coroidea idiopática.

[5] Uso de un inhibidor de IL-6 para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir neovascularización coroidea en una enfermedad que implica neovascularización coroidea, en el que el inhibidor de IL-6 es un anticuerpo que reconoce una IL-6, en la que la enfermedad que implica neovascularización coroidea es degeneración macular asociada a la edad, neovascularización coroidea miópica o neovascularización coroidea idiopática.

[6] La composición farmacéutica para uso o el uso de [4] o [5], en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

[7] La composición farmacéutica para uso o el uso de una cualquiera de [4] a [6], en la que el anticuerpo reconoce una IL-6 humana.

[8] La composición farmacéutica para uso o el uso de una cualquiera de [4] a [7], en la que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante.

[9] La composición farmacéutica para uso o el uso de [8], en la que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un conjunto de fotografías que muestran secciones de NVC, obtenidas usando un microscopio confocal para visualizar muestras de montajes en plano coroides teñidos con lectina.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación volumétrica del volumen de NVC después de la administración de anticuerpo anti-receptor de IL-6.

Mejor modo para llevar a cabo la invención

Los presentes inventores descubrieron que el desarrollo de NVC podría suprimirse administrando anticuerpos anti-receptor de IL-6. La presente invención se logró basándose en este hallazgo.

La presente divulgación se refiere a agentes preventivos y/o terapéuticos para enfermedades que implican neovascularización coroidea, e inhibidores de neovascularización coroidea, que comprenden inhibidores de IL-6 como principios activos.

La presente invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

En el presente documento, un "inhibidor de IL-6" es una sustancia que bloquea la transducción de señales mediadas por IL-6 e inhibe la actividad biológica de IL-6. Preferentemente, los inhibidores de IL-6 son sustancias que tienen función inhibidora contra la unión de una IL-6, receptor de IL-6 o gp130.

Los inhibidores de IL-6 incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, 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 una IL-6 o receptor de IL-6 y compuestos de bajo peso molecular que muestran actividades similares. Los inhibidores de IL-6 de la presente invención son anticuerpos que reconocen IL-6.

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

Los anticuerpos anti-IL-6 usados en la presente invención pueden obtenerse como anticuerpos policlonales o monoclonales usando medios conocidos. En particular, se prefieren los anticuerpos monoclonales derivados de mamíferos como los anticuerpos anti-IL-6 usados en la presente invención. Anticuerpos monoclonales derivados de mamíferos incluyen aquellos producidos a partir de hibridomas y aquellos producidos por métodos de ingeniería genética a partir de hospedadores transformados con un vector de expresión que comprende un gen de anticuerpo. Uniéndose a IL-6, el anticuerpo inhibe que IL-6 se una a un receptor de IL-6 y así bloquea la transmisión de la actividad biológica de IL-6 en la célula.

Tales anticuerpos incluyen MH166 (Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956), anticuerpo SK2 (Sato, K. et al., transacción de la 21ª Reunión Anual de la Sociedad Japonesa de Inmunología (1991) 21, 166), etc.

Básicamente, pueden prepararse hibridomas que producen los anticuerpos anti-IL-6 usando técnicas conocidas, del siguiente modo: Específicamente, tales hibridomas pueden prepararse usando IL-6 como antígeno sensibilizante para llevar a cabo la inmunización usando un método de inmunización convencional, entonces fusionando las células inmunitarias obtenidas con células parentales conocidas usando un método de fusión de células convencionales, y cribando para células productoras de anticuerpos monoclonales usando un método de cribado convencional.

Más específicamente, pueden producirse anticuerpos anti-IL-6 del siguiente modo: Por ejemplo, puede obtenerse IL-6 humana para su uso como el antígeno sensibilizante para obtener anticuerpos usando un gen de IL-6 y/o secuencia de aminoácidos desvelada en Eur. J. Biochem. (1987) 168, 543-550; J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541; y/o Agr. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688.

Después de transformar una célula hospedadora apropiada con un sistema de vector de expresión conocido insertado con una secuencia de genes de IL-6, la proteína IL-6 deseada se purifica desde el interior de la célula hospedadora o del sobrenadante de cultivo, usando métodos conocidos. La proteína IL-6 purificada puede usarse como un antígeno sensibilizante. Alternativamente, pueden usarse una proteína de fusión de la IL-6 proteína y otra proteína como antígeno sensibilizante.

Los anticuerpos de receptores anti-IL6 pueden obtenerse como anticuerpos policlonales o monoclonales usando métodos 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 aquellos producidos a partir de hibridomas y aquellos producidos usando métodos de ingeniería genética de hospedadores transformados con un vector de expresión que comprende un gen de anticuerpo. Uniéndose a un receptor de IL-6, el anticuerpo inhibe la unión de IL-6 al receptor de IL-6, y así bloquea la transmisión de actividad biológica de IL-6 en la célula.

Tales anticuerpos incluyen anticuerpo contra MR16-1 (Tamura, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924-11928); anticuerpo contra PM-1 (Hirata, Y et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906); anticuerpo contra AUK12-20, anticuerpo contra ALTK64-7 y anticuerpo contra AUK146-15 (publicación solicitud de patente internacional N.º WO 92/19759); etc. El anticuerpo contra PM-1 es un ejemplo de un anticuerpo monoclonal preferido contra el receptor de IL-6 humana, y el anticuerpo contra MR16-1 es un ejemplo de un anticuerpo monoclonal preferido contra el receptor de IL-6 de ratón.

Básicamente, pueden prepararse hibridomas productores de un anticuerpo monoclonal anti-receptor de IL-6 usando técnicas conocidas, del siguiente modo: Específicamente, tales hibridomas pueden prepararse usando un receptor de IL-6 como antígeno sensibilizante para llevar a cabo la inmunización usando un método de inmunización convencional, luego fusionando las células inmunitarias obtenidas con una célula parental conocida usando un método de fusión de células convencional, y cribando para células productoras de anticuerpo monoclonal usando un método de cribado convencional.

Más específicamente, pueden producirse anticuerpos anti-receptor de IL-6 del siguiente modo: Por ejemplo, puede obtenerse un receptor de IL-6 de humana o receptor de IL-6 de ratón para su uso como antígeno sensibilizante para obtener anticuerpos usando los genes de receptor de IL-6 y/o secuencias de aminoácidos desveladas 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 (sin examinar, solicitud de patente japonesa publicada), respectivamente.

Hay dos tipos de receptor de proteínas IL-6: una expresada sobre la membrana celular y la otra separada de la membrana celular (receptores de IL-6 solubles) (Yasukawa, K. et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676). El receptor de IL-6 soluble consiste esencialmente en la región extracelular del receptor de IL-6 unido a la membrana celular, y se diferencia del receptor de IL-6 unido a la membrana por que carece de la región transmembranaria, o carece de tanto las regiones transmembranarias como intracelulares. Puede emplearse cualquier receptor de IL-6 como proteína de receptor de IL-6, mientras que pueda usarse como antígeno sensibilizante para producir un anticuerpo anti-receptor de IL-6.

Después de transformar una célula hospedadora apropiada con un sistema de vector de expresión conocido insertado con una secuencia de genes de receptor de IL-6, la proteína de receptor de IL-6 deseada se purifica desde el interior de la célula hospedadora o del sobrenadante de cultivo usando un método conocido. Esta proteína de receptor de IL-6 purificada puede usarse como antígeno sensibilizante. Alternativamente, puede usarse una célula que expresa un receptor de IL-6 o una proteína de fusión de una proteína de receptor de IL-6 y otra proteína como antígeno sensibilizante.

Los anticuerpos anti-gp130 pueden obtenerse como anticuerpos policlonales o monoclonales usando métodos conocidos. En particular, los anticuerpos anti-gp130 son preferentemente anticuerpos monoclonales derivados de

mamíferos. Anticuerpos monoclonales derivados de mamífero incluyen aquellos producidos de hibridomas y aquellos producidos usando métodos de ingeniería genética de hospedadores transformados con un vector de expresión que comprende un gen de anticuerpo. Uniéndose a gp130, el anticuerpo inhibe la unión de gp130 al complejo de IL-6/receptor de IL-6, y así bloquea la transmisión de actividad biológica de IL-6 en la célula.

5 Tales anticuerpos incluyen anticuerpo contra AM64 (JP-A (Kokai) H03-219894); anticuerpo contra 4B11 y anticuerpo contra 2H4 (documento US 5571513); anticuerpo contra B-S12 y anticuerpo contra B-P8 (JP-A (Kokai) H08-291199); etc.

10 Básicamente, los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales anti-gp130 pueden prepararse usando técnicas conocidas, del siguiente modo: Específicamente, tales hibridomas pueden prepararse usando gp130 como antígeno sensibilizante para llevar a cabo la inmunización usando un método de inmunización convencional, entonces fusionando las células inmunitarias obtenidas con una célula parental conocida usando un método de fusión de células convencional, y cribando células productoras de anticuerpo monoclonal usando un método de
15 cribado convencional.

Más específicamente, pueden producirse anticuerpos monoclonales del siguiente modo: Por ejemplo, pueden obtenerse gp130 para su uso como un antígeno sensibilizante para obtener anticuerpos usando el gen gp130 y/o secuencia de aminoácidos desvelada en la publicación de solicitud de patente europea N.º EP 411946.

20 Después de transformar una célula hospedadora apropiada con un sistema de vector de expresión conocido insertado con una secuencia de genes gp130, la proteína gp130 deseada se purifica desde el interior de la célula hospedadora o del sobrenadante de cultivo, usando un método conocido. Esta proteína gp130 purificada puede usarse como antígeno sensibilizante. Alternativamente, pueden usarse una célula que expresa gp130 o una proteína de fusión de la proteína gp130 y otra proteína como antígeno sensibilizante.
25

Mamíferos que van a inmunizarse con un antígeno sensibilizante no están particularmente limitados, pero están seleccionados preferentemente en vista de la compatibilidad con la célula parental usada para la fusión celular. Generalmente, se usan roedores tales como ratones, ratas y hámsteres.

30 Los animales se inmunizan con antígenos sensibilizantes según métodos conocidos. Por ejemplo, como método general, se inmunizan animales por inyección intraperitoneal o subcutánea de un antígeno sensibilizante. Específicamente, el antígeno sensibilizante se diluye o suspende preferentemente en una cantidad apropiada de solución salina tamponada con fosfato (PBS), solución salina fisiológica o tal, mezcla con una cantidad apropiada de un adyuvante general (por ejemplo, adyuvante completo de Freund), se emulsiona, y entonces se administra a un mamífero varias veces, cada cuatro a 21 días. Además, puede usarse un vehículo apropiado para inmunización con un antígeno sensibilizante.
35

Tras tal inmunización, se confirma un elevado nivel de un anticuerpo deseado en suero y entonces se obtienen células inmunitarias del mamífero para fusión celular. Células inmunitarias preferidas para fusión celular incluyen células del bazo en particular.

40 Las células de mieloma de mamífero usadas como células parentales, es decir, como células compañeras que van a fusionarse con las células inmunitarias anteriores, incluyen diversas cepas de células conocidas, por ejemplo, P3X63Ag8.653 (Kearney, J. F. et al., J. Immunol. (1979) 123,1548-1550), P3X63Ag8U.1 (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), F0 (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 tales.
45

50 Básicamente, la fusión de células de las células inmunitarias y células de mieloma anteriormente mencionadas puede realizarse usando métodos conocidos, por ejemplo, el método de Milstein et al. (Kohler, G. y Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46), y similares.

55 Más específicamente, la fusión de células anteriormente mencionada se logra en medio de cultivo nutriente general en presencia de un agente de potenciamiento de células. Por ejemplo, se usan polietilenglicol (PEG), virus de Sendai (HVJ), y similares, como agentes de potenciamiento de la fusión. Además, para potenciar la eficiencia de fusión, pueden añadirse agentes auxiliares tales como sulfóxido de dimetilo dependiendo de las necesidades.

60 Un ejemplo preferible de la relación de células inmunitarias con respecto a células de mieloma que va a usarse es 1 a 10 células inmunitarias por célula de mieloma. El medio de cultivo usado para la fusión de células anteriormente mencionada es, por ejemplo, medio de cultivo RPMI1640 o MEM, que son adecuados para la proliferación de las células de mieloma anteriormente mencionadas. También puede usarse un medio de cultivo general usado para cultivar este tipo de célula. Además, pueden usarse complementos del suero tales como suero bovino fetal (FCS) en combinación.
65

Para la fusión de células, las células de fusión (hibridomas) de interés se forman mezclando cantidades predeterminadas de una célula inmunitaria anteriormente mencionada y célula de mieloma en un medio de cultivo anteriormente mencionado, y entonces añadiendo o mezclando una concentración del 30 % al 60 % (peso/volumen) de solución de PEG (por ejemplo, una solución de PEG con un peso molecular medio de aproximadamente 1.000 a 6.000), precalentada a aproximadamente 37 °C. Entonces, pueden eliminarse los agentes de fusión de células y similares que no son adecuados para el crecimiento de hibridomas añadiendo repetidamente un medio de cultivo apropiado y entonces eliminando el sobrenadante por centrifugación.

Los hibridomas anteriores se seleccionan cultivando 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 periodo suficiente para destruir células distintas de los hibridomas de interés (células sin fusionar), generalmente varios días a varias semanas. Entonces, se realiza un método de dilución limitada estándar para cribar y clonar hibridomas que producen un anticuerpo de interés.

Además de los métodos para inmunizar animales no humanos con antígenos para obtener los hibridomas anteriormente mencionados, pueden obtenerse anticuerpos humanos deseados con la actividad de unión a un antígeno deseado o célula que expresa antígeno sensibilizando un linfocito humano con una proteína de antígeno deseada o célula que expresa antígeno *in vitro*, y fusionando el linfocito B sensibilizado con una célula de mieloma humana (por ejemplo, U266) (véase la publicación de solicitud de patente japonesa Kokoku N.º (JP-B) H01-59878 (examinada, solicitud de patente japonesa autorizada publicada para oposición)). Además, puede obtenerse un anticuerpo humano deseado administrando un antígeno o célula que expresa antígeno a un animal transgénico que tiene un repertorio de genes de anticuerpo humano, y entonces siguiendo el método anteriormente mencionado (véase 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).

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

Cuando se obtienen anticuerpos monoclonales a partir de los hibridomas anteriormente mencionados, pueden emplearse los siguientes métodos: métodos donde los hibridomas se cultivan según métodos convencionales y los anticuerpos se obtienen como un sobrenadante de cultivo; métodos donde los hibridomas son proliferados administrándolos a un mamífero compatible y los anticuerpos se obtienen como ascitis; etc. Se prefiere el método para obtener anticuerpos con alta pureza, y se prefiere el último para la producción a gran escala de anticuerpos.

Por ejemplo, pueden prepararse hibridomas productores de anticuerpos anti-receptor de IL-6 por el método desvelado en JP-A (Kokai) H03-139293. Tales hibridomas pueden prepararse inyectando un hibridoma productor de anticuerpos PM-1 en la cavidad abdominal de un ratón BALB/c, obteniéndose ascitis, y luego purificando un anticuerpo contra PM-1 de la ascitis; o cultivando el hibridoma en un medio apropiado (por ejemplo, medio RPMI1640 que contiene 10 % de suero bovino fetal y 5 % de BM-Condimed H1 (Boehringer Mannheim); medio SFM de hibridomas (GIBCO-BRL); medio PFHM-II (GIBCO-BRL), etc.) y luego obteniendo anticuerpo contra PM-1 del sobrenadante de cultivo.

Pueden usarse anticuerpos recombinantes como los anticuerpos monoclonales para la presente invención, en los que los anticuerpos se producen usando técnicas de recombinación genética, clonando un gen de anticuerpo de un hibridoma, insertando el gen en un vector apropiado, y luego introduciendo el vector en un hospedador (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, se aíslan ARNm que codifican regiones variables (V) de anticuerpo de células que producen anticuerpos de interés, tales como hibridomas. Pueden aislarse ARNm preparando ARN totales según métodos conocidos, tales como el método de ultracentrifugación de guanidina (Chirgwin, J. M. et al., *Biochemistry* (1979) 18, 5294-5299) y el método de AGPC (Chomczynski, P. et al., *Anal. Biochem.* (1987) 162, 156-159), y preparando ARNm usando un kit de purificación de ARNm (Pharmacia) y similares. Alternativamente, pueden prepararse directamente ARNm usando un kit de purificación de ARNm QuickPrep (Pharmacia).

Se sintetizan ADNc de las regiones V de anticuerpo a partir de los ARNm obtenidos usando transcriptasa inversa. Pueden sintetizarse ADNc usando un kit de síntesis de ADNc de primera cadena con transcriptasa inversa AMV, etc. Además, para sintetizar y amplificar los ADNc, puede emplearse el método de 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 entonces se ligaron con un vector ADN. Entonces, se prepara un vector recombinante usando el ADN anterior, y se introduce en *Escherichia coli* o similar, y entonces sus colonias se seleccionan preparando un vector recombinante deseado. La secuencia de nucleótidos del ADN de interés se confirma por, por ejemplo, el método de desoxi.

Cuando se obtiene un ADN que codifica la región V de un anticuerpo de interés, el ADN se liga con un ADN que codifica una región constante (región C) de anticuerpo deseada, y se inserta en un vector de expresión. Alternativamente, puede insertarse un ADN que codifica una región V de anticuerpo en un vector de expresión que comprende un ADN de una región C de anticuerpo.

5 Para producir un anticuerpo que va a usarse en la presente invención, como se describe a continuación, se inserta un gen de anticuerpo en un vector de expresión de forma que se expresa bajo el control de una región reguladora de la expresión, por ejemplo, un potenciador y promotor. Entonces, el anticuerpo puede expresarse transformando una célula hospedadora con este vector de expresión.

10 En la presente invención, para reducir la heteroantigenicidad contra seres humanos y similares, pueden usarse anticuerpos recombinantes genéticos artificialmente modificados, por ejemplo, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, o anticuerpos humanos. Estos anticuerpos modificados pueden prepararse usando métodos conocidos.

15 Puede obtenerse un anticuerpo quimérico ligando un ADN que codifica una región V de anticuerpo, obtenida como antes, con un ADN que codifica una región C de anticuerpo humano, luego insertando el ADN en un vector de expresión e introduciéndolo en un hospedador 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). Este método conocido puede usarse para obtener anticuerpos quiméricos útiles para la presente invención.

20 También se denominan los anticuerpos humanizados anticuerpos humanos reformados, y son anticuerpos en los que las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo de un mamífero distinto de un ser humano (por ejemplo, un anticuerpo de ratón) se transfieren a las CDR de anticuerpos humanos. También son conocidos métodos generales para esta recombinación génica (véase la publicación de solicitud de patente europea N.º EP 125023, publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 92/19759).

25 Más específicamente, secuencias de ADN diseñadas de forma que una CDR de un anticuerpo de ratón se une con las regiones estructurales (FR) de un anticuerpo humano se sintetizan por PCR a partir de varios oligonucleótidos producidos para contener porciones de solapamiento en sus extremos. Se une un ADN obtenido con un ADN que codifica una región C de anticuerpo humano y entonces se inserta en un vector de expresión. El vector de expresión se introduce en un hospedador para producir un anticuerpo humanizado (véase la publicación de solicitud de patente europea N.º EP 239400, publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 92/19759).

30 Las FR del anticuerpo humano que van a unirse mediante las CDR están seleccionadas de manera que las CDR formen sitios de unión al antígeno adecuados. El (Los) aminoácido(s) dentro de las FR de la región variable del anticuerpos pueden estar sustituidas según sea necesario de manera que las CDR del anticuerpo humano reformado formen un sitio de unión al antígeno apropiado (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

35 Se usan regiones C de anticuerpo humano para los anticuerpos quiméricos y humanizados. Las regiones C de anticuerpo humano incluyen Cy. Por ejemplo, puede usarse Cy1, Cy2, Cy3 o Cy4. Además, para mejorar la estabilidad de los anticuerpos o su producción, pueden modificarse las regiones C de anticuerpo humano.

40 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; anticuerpos humanizados consisten en las CDR de un anticuerpo derivado de un mamífero no humano y las regiones estructurales y regiones constantes derivadas de un anticuerpo humano. Ambas tienen antigenicidad reducida en el cuerpo humano, y son así útiles como anticuerpos para su uso en la presente invención.

45 Ejemplos específicos preferidos de anticuerpos humanizados para su uso en la presente invención incluyen el anticuerpo contra PM-1 humanizado (véase la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 92/19759).

50 Adicionalmente, además de los métodos anteriormente mencionados para obtener anticuerpos humanos, también son conocidas técnicas para obtener anticuerpos humanos por inmunopurificación usando una biblioteca de anticuerpos humanos. Por ejemplo, pueden expresarse las regiones variables de anticuerpos humanos sobre superficies de fago como anticuerpos monocatenarios (scFv) usando el método de presentación en fagos, y entonces pueden seleccionarse fagos de unión al antígeno. Analizando los genes de los fagos seleccionados, pueden determinarse secuencias de ADN que codifican las regiones variables de anticuerpo humano que se unen al antígeno. Una vez se revela la secuencia de ADN de un scFv que se une al antígeno, puede construirse un vector de expresión apropiado que comprende la secuencia para obtener un anticuerpo humano. Estos métodos son ya conocidos, y pueden usarse las publicaciones de los documentos WO 92/01047, WO 92/20791, WO93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388 como referencia.

55 Los genes de anticuerpo construidos anteriormente pueden expresarse según métodos convencionales. Cuando se usa una célula de mamífero, el gen de anticuerpo puede expresarse usando un ADN en el que el gen de anticuerpo que va a expresarse está funcionalmente unido a un promotor útil comúnmente usado y una señal de poliA en la

dirección 3' del gen de anticuerpo, o un vector que comprende el ADN. Ejemplos de un promotor/potenciador incluyen el promotor/potenciador temprano inmediato del citomegalovirus humano.

5 Otros promotores/potenciadores que pueden usarse para expresar los anticuerpos para su uso en la presente invención incluyen promotores virales/potenciadores de retrovirus, virus del poliovirus, adenovirus, virus 40 simio (SV40) y similares; y también incluyen promotores/potenciadores derivados de célula de mamífero tales como factor 1 α de elongación humano (HEF1 α).

10 Por ejemplo, cuando se usa promotor/potenciador de SV40, la expresión puede ser fácilmente realizada siguiendo el método de Mulligan et al. (Mulligan, R. C. et al., Nature (1979) 277, 108-114). Alternativamente, en el caso del promotor/potenciador de HEF1 α , puede usarse el método de Mizushima et al. (Mizushima, S. y Nagata S., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322).

15 Cuando se usa *E. coli*, puede expresarse un gen de anticuerpo uniendo funcionalmente un promotor convencional, una secuencia señal para la secreción de anticuerpo y el gen de anticuerpo que va a expresarse. Ejemplos del promotor incluyen un promotor lacZ, promotor araB y similares. Cuando se usa un promotor lacZ, pueden expresarse genes según el método 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 puede usarse el promotor araB según el método de Better et al. (Better, M. et al., Science (1988) 240, 1041-1043).

20 Cuando el anticuerpo se produce en el periplasma de *E. coli*, puede usarse la secuencia señal pel B (Lei, S. P. et al., J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383) como una secuencia señal para la secreción de anticuerpos. Los anticuerpos producidos en el periplasma se aíslan, y entonces se usan después de replegar apropiadamente la estructura de anticuerpo (véase, por ejemplo, el documento WO 96/30394).

25 Puede usarse un origen de replicación derivado de SV40, virus del poliovirus, adenovirus, virus del papiloma bovino (BPV) y similares. Además, para potenciar el número de copias génicas en un sistema de célula hospedadora, 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 similares como marcador de selección.

30 Puede usarse 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 aquellos usando células eucariotas o células procariotas.

35 Los sistemas de producción usando células eucariotas incluyen aquellos usando células de animales, células vegetales o células fúngicas. Tales células de animales incluyen: (1) células de mamífero, por ejemplo, CHO, COS, mieloma, riñón de hámster bebé (BHK), HeLa, Vero y similares; (2) células de anfibio, por ejemplo, ovocito de *Xenopus*; y (3) células de insecto, por ejemplo, sf9, sf21, Tn5 y similares. Células vegetales conocidas incluyen células derivadas de *Nicotiana tabacum*, que pueden cultivarse como callo. Células fúngicas conocidas incluyen levaduras tales como *Saccharomyces* (por ejemplo, *S. cerevisiae*), hongos de mohos tales como *Aspergillus* (por ejemplo, *A. niger*), y similares.

40 Sistemas de producción usando células procariotas incluyen aquellas usando células bacterianas. Células bacterianas conocidas incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*.

45 Pueden obtenerse anticuerpos usando transformación para introducir un gen de anticuerpo de interés en estas células, y entonces cultivando las células transformadas *in vitro*. Se realizan cultivos según métodos conocidos. Por ejemplo, puede usarse DMEM, MEM, RPMI1640, IMDM como medio de cultivo, y pueden usarse suplementos de suero tales como FCS en combinación. Además, las células introducidas con genes de anticuerpo pueden transferirse a la cavidad abdominal o similar de un animal para producir los anticuerpos *in vivo*.

50 Por otra parte, sistemas de producción *in vivo* incluyen aquellos usando animales o plantas. Sistemas de producción usando animales incluyen aquellos que usan mamíferos o insectos.

55 Mamíferos que pueden usarse incluyen cabras, cerdos, ovejas, ratones, bovinos y similares (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). Además, insectos que pueden usarse incluyen gusanos de seda. Si se usan plantas, puede usarse tabaco, por ejemplo.

60 Se introduce un gen de anticuerpo en estos animales o plantas, el anticuerpo se produce en el cuerpo de los animales o plantas, y entonces se recupera este anticuerpo. Por ejemplo, puede prepararse un gen de anticuerpo como un gen de fusión insertándolo en el centro de un gen que codifica una proteína tal como caseína β de cabra, que es únicamente producida en leche. Fragmentos de ADN que comprenden el gen de fusión, que incluye el gen de anticuerpo, se inyectan en embriones de cabra, y los embriones se introducen en cabras hembra. El anticuerpo deseado se obtiene a partir de leche producida por los animales transgénicos nacidos de las cabras que recibieron los embriones, o producidos a partir de las progenies de estos animales. Las cabras transgénicas pueden ser

administradas con hormonas para aumentar el volumen de leche que contiene el anticuerpo deseado que producen (Ebert, K. M. et al., *Bio/Technology* (1994) 12, 699-702).

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

10 Cuando se producen anticuerpos usando sistemas de producción *in vitro* o *in vivo*, como se ha descrito anteriormente, los ADN que codifican una cadena pesada del anticuerpo (cadena H) y cadena ligera (cadena L) pueden insertarse en vectores de expresión separados y se co-transforma un hospedador con los vectores. 15 Alternativamente, los ADN pueden insertarse en un único vector de expresión para transformar un hospedador (véase la publicación de solicitud de patente internacional N.º WO 94/11523).

20 Los anticuerpos usados en la presente invención pueden ser fragmentos de anticuerpos o productos modificados de los mismos, mientras que pueden ser adecuadamente usados en la presente invención. Por ejemplo, fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, F(ab')₂, Fv y Fv monocatenario (scFv), en los que los Fv de las cadenas H y L están unidos mediante un conector apropiado.

25 Específicamente, los fragmentos de anticuerpos se producen tratando anticuerpos con enzimas, por ejemplo, papaína o pepsina, o alternativamente, genes que codifican estos fragmentos se construyen, introducen en vectores de expresión, y éstos se expresan en células hospedadoras apropiadas (véase, por ejemplo, Co, M. S. et al., *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H., *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496; Plueckthun, A. & 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).

30 Puede obtenerse un scFv uniendo la región V de la cadena H y la región V de la cadena L de un anticuerpo. En scFv, la región V de la cadena y la región V de la cadena L se unen mediante un conector, preferentemente mediante un conector 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 scFv pueden derivar de cualquiera de los anticuerpos descritos anteriormente. 35 Conectores peptídicos para unir las regiones V incluyen, por ejemplo, péptidos monocatenarios arbitrarios que consisten en 12 a 19 restos de aminoácidos.

40 Puede obtenerse 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 anteriormente mencionados como moldes, usando PCR para amplificar una porción de ADN que codifica la secuencia de aminoácidos deseada en la secuencia de molde y usando cebadores que definen los extremos de la porción, y entonces amplificando adicionalmente la porción de ADN amplificado con un ADN que codifica una porción de conector peptídico y pares de cebadores que unen ambos extremos del conector a la cadena H y la cadena L.

45 Una vez se ha obtenido un ADN que codifica scFv, puede obtenerse un vector de expresión que comprende el ADN y un hospedador transformado con el vector según métodos convencionales. Además, puede obtenerse scFv según métodos convencionales usando el hospedador.

50 Como antes, estos fragmentos de anticuerpos pueden producirse a partir del hospedador obteniendo y expresando sus genes. En el presente documento, un "anticuerpo" engloba tales fragmentos de anticuerpos.

55 También pueden usarse anticuerpos unidos a diversas moléculas, tales como polietilenglicol (PEG), como anticuerpos modificados. En el presente documento, un "anticuerpo" engloba tales anticuerpos modificados. Estos anticuerpos modificados pueden obtenerse modificando químicamente los anticuerpos obtenidos. Tales métodos ya están publicados en la materia.

60 Los anticuerpos producidos y expresados como antes pueden aislarse desde del interior o exterior de las células o a partir de los hospedadores, y entonces purificarse a homogeneidad. Los anticuerpos para su uso en la presente invención pueden aislarse y/o purificarse usando cromatografía de afinidad. Las columnas que van a usarse para la cromatografía de afinidad incluyen, por ejemplo, columnas de proteína A y columnas de proteína G. Vehículos usados para las columnas de proteína A incluyen, por ejemplo, HyperD, POROS, Sepharose FF y similares. Además de los anteriores, pueden usarse otros métodos usados para el aislamiento y/o la purificación de proteínas comunes, y no están limitados de ningún modo.

65 Por ejemplo, los anticuerpos usados para la presente invención pueden aislarse y/o purificarse seleccionando apropiadamente y combinando apropiadamente cromatografías, además de cromatografía de afinidad, filtros,

ultrafiltración, precipitación por sales, diálisis, y similares. Las cromatografías incluyen, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel, y similares. Estas cromatografías pueden aplicarse a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Alternativamente, puede usarse HPLC de fase inversa.

5 La concentración de los anticuerpos obtenidos como antes puede determinarse por medición de absorbancia, ELISA, o similares. Específicamente, la absorbancia se determina diluyendo apropiadamente la solución de anticuerpo con PBS(-), midiendo la absorbancia a 280 nm, y calculando la concentración (1,35 DO = 1 mg/ml). Alternativamente, si se usa ELISA, la medición puede realizarse del siguiente modo: Específicamente, se añaden 100 µl de cabra IgG anti-humana (TAG) diluida a 1 µg/ml con tampón bicarbonato 0,1 M (pH 9,6) a una placa de 96 pocillos (Nunc) y se incuba durante la noche a 4 °C para inmovilizar el anticuerpo. Después de bloquear, se añaden 100 µl de un anticuerpo apropiadamente diluido de la presente invención o una muestra apropiadamente diluida que comprende el anticuerpo, y se añaden IgG humana (Cappel) como patrón, y se incuban durante una hora a temperatura ambiente.

15 Después de lavar, se añaden 100 µl de 5.000x IgG anti-humana marcada con fosfatasa alcalina diluida (BIO SOURCE) y se incuban 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 lector de microplacas modelo 3550 (Bio-Rad) para calcular la concentración del anticuerpo de interés.

20 Las variantes de IL-6 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 IL-6 para unirse a receptores de IL-6, pero dejan de transmitir actividad biológica de IL-6 y, por tanto, bloquean la transducción de señales mediada por IL-6.

25 Las variantes de IL-6 se producen introduciendo mutación (mutaciones) sustituyendo restos de aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de IL-6. El origen de IL-6 usado como base de las variantes de IL-6 no está limitado, pero es preferentemente IL-6 humana en vista de la antigenicidad y similares.

Más específicamente, se realizan sustituciones de aminoácidos que predicen la estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos de IL-6 usando programas de modelado molecular conocidos (por ejemplo, WHAT IF; Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56), y evaluando adicionalmente la influencia del (de los) resto(s) de aminoácido sustituido(s) en la molécula completa. Después de determinar el resto de aminoácido apropiado que va a sustituirse, se llevan a cabo métodos de PCR comúnmente realizados usando una secuencia de nucleótidos que codifica un gen de IL-6 humana como molde, y se introducen mutaciones para producir sustituciones de aminoácidos, y así se obtienen genes que codifican variantes de IL-6. Si se necesita, este gen se inserta en un vector de expresión apropiado, y la variante de IL-6 puede obtenerse aplicando los métodos anteriormente mencionados para la expresión, producción y purificación de anticuerpos recombinantes.

Ejemplos específicos de las variantes de IL-6 se desvelan en Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93, Savino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367, documentos WO 96/18648 y WO 96/17869.

40 Los péptidos de IL-6 parciales y del receptor de IL-6 son sustancias con la actividad de unión al receptor de IL-6 y a IL-6, respectivamente, y que no transmiten actividad biológica de IL-6. Concretamente, uniendo a y capturando un receptor de IL-6 o IL-6, los péptidos parciales de IL-6 o péptidos parciales de receptor de IL-6 pueden inhibir específicamente la unión de IL-6 al receptor de IL-6. Como resultado, no se transmite la actividad biológica de IL-6, y se bloquea la transducción de señales mediada por IL-6.

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

55 Los péptidos parciales de IL-6 o péptidos parciales de receptor de IL-6 pueden producirse según métodos generalmente conocidos, por ejemplo, técnicas de ingeniería genética o métodos de síntesis de péptidos, especificando la región de la secuencia de aminoácidos de IL-6 o del receptor de IL-6 que participa en la unión entre IL-6 y el receptor de IL-6, y usando una porción o totalidad de la secuencia de aminoácidos de la región especificada.

60 Cuando se prepara un péptido parcial de IL-6 o receptor de péptido parcial de IL-6 usando métodos de ingeniería genética, se inserta una secuencia de ADN que codifica el péptido deseado en un vector de expresión, y entonces el péptido puede obtenerse aplicando los métodos anteriormente mencionados para expresar, producir y purificar anticuerpos recombinantes.

65 Cuando se produce un péptido parcial de IL-6 o péptido parcial de receptor de IL-6 usando métodos de síntesis de péptidos, pueden usarse métodos de síntesis de péptidos generalmente usados, por ejemplo, métodos de síntesis en fase sólida o métodos de síntesis en fase líquida.

Específicamente, los péptidos pueden sintetizarse según el método descrito en "Continuation of Development of Pharmaceuticals, Vol. 14, Peptide Synthesis (en japonés) (ed. Haruaki Yajima, 1991, Hirokawa Shoten)". Como método de síntesis en fase sólida, por ejemplo, puede emplearse el siguiente método: el aminoácido correspondiente al extremo C del péptido que va a sintetizarse se une a un soporte que es insoluble en disolventes orgánicos, entonces la hebra de péptido se alarga repitiendo alternativamente (1) la reacción de condensación de aminoácidos cuyos grupos α -amino y grupos funcionales de cadena ramificada se protegen con grupos protectores apropiados, uno cada vez en una dirección de extremo C a N; y (2) la reacción de eliminación de los grupos protectores de los grupos α -amino de los aminoácidos o péptidos unidos a resina. La síntesis de péptidos en fase sólida se clasifica ampliamente en el método de Boc y el método de Fmoc, dependiendo del tipo de grupos protectores usados.

Después de sintetizar una proteína de interés como antes, se llevan a cabo las reacciones de desprotección, entonces la cadena de péptido se escinde de su soporte. Para la reacción de escisión de la hebra de péptido, generalmente se usa fluoruro de hidrógeno o ácido trifluorometanosulfónico para el método de Boc, y generalmente se usa TFA para el método de Fmoc. En el método de Boc, por ejemplo, la resina de péptido protegida anteriormente mencionada se trata con fluoruro de hidrógeno en presencia de anisol. Entonces, el péptido se recupera eliminando los grupos protectores y escindiendo el péptido de su soporte. Por liofilización del péptido recuperado, puede obtenerse un péptido en bruto. En el método de Fmoc, por otra parte, puede realizarse la reacción de desprotección y la reacción para escindir la hebra de péptido del soporte en TFA usando un método similar a aquellos descritos anteriormente, por ejemplo.

Pueden separarse péptidos en bruto obtenidos y/o purificarse aplicando HPLC. La elución puede realizarse en condiciones óptimas usando un sistema de disolventes agua-acetonitrilo, que se usa generalmente para la purificación de proteínas. Se recogen las fracciones correspondientes a los picos del perfil cromatográfico obtenido y se liofilizan. Así, se identifican fracciones de péptido purificadas por análisis de peso molecular mediante análisis de espectro de masas, análisis de la composición de aminoácidos, análisis de secuencias de aminoácidos, o similares.

Ejemplos específicos de péptidos parciales de IL-6 y péptidos parciales de receptor de IL-6 se desvelan en los documentos JP-A (Kokai) H02-188600, JP-A (Kokai) H07-324097, 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 conjugarse con anticuerpos que están unidos a diversas moléculas, tales como polietilenglicol (PEG), sustancias radiactivas y toxinas. Tales anticuerpos conjugados pueden obtenerse modificando químicamente los anticuerpos obtenidos. Métodos de modificación de los anticuerpos ya están establecidos en la materia. Los "anticuerpos" de la presente invención engloban estos anticuerpos conjugados.

Los agentes preventivos y/o terapéuticos para enfermedades que implican NVC y los inhibidores de NVC de la presente invención pueden usarse para prevenir y/o tratar enfermedades que implican NVC.

En la presente invención, NVC se refiere a crecimiento ectópico de vasos coroideos, que penetran a través de la membrana de Bruch y epitelios pigmentarios de la retina. Se cree que la NVC en degeneración macular asociada a la edad se induce por células inflamatorias, principalmente que comprenden macrófagos que se infiltran para fagocitar drusas acumuladas cerca de los epitelios pigmentarios de la retina tras el estrés por oxidación con la edad. Una reacción inflamatoria débil crónica persistente permite que las células inflamatorias produzcan factores angiogénicos, tales como VEGF, y se produce neovascularización inflamatoria como resultado. La hemorragia y fuga de componentes del plasma que comprenden grasa del plexo de vasos prematuros crecidos a través de NVC altera rápidamente la función de la retina neural, y así produce enfermedades que provocan trastornos visuales graves.

Enfermedades representativas que implican NVC incluyen degeneración macular asociada a la edad, neovascularización coroidea miópica, neovascularización coroidea idiopática.

Degeneración macular asociada a la edad se refiere a enfermedades en las que la deficiencia visual resulta de la degeneración macular con la edad y los principales síntomas son la distorsión de la imagen (anortopía) y escotoma central. La forma húmeda de la degeneración macular asociada a la edad es una enfermedad con mal pronóstico que produce deficiencia visual rápida y grave, siendo la principal afección patológica la NVC. Los síntomas oftalmoscópicos son cambios exudativos, tales como desprendimiento del epitelio pigmentario de la retina, desprendimiento seroso de retina, hemorragia subretiniana y exudado blanco duro.

La neovascularización coroidea miópica es la enfermedad más común que causa deficiencia visual en personas con miopía patológica. Cuando los vasos son recientemente generados en el área macular, frecuentemente se forman cicatrices fibrosas pigmentadas, que producen escotoma en el centro de visión. Se produce excesiva miopía, que es común en las personas japonesas, por la anormal extensión de la longitud antero-posterior del ojo (el eje del ojo). Como resultado, se desarrollan diversas lesiones del fondo de ojo específicas de miopía, tales como NVC, en el polo posterior del fondo de ojo, que pueden producir trastornos visuales.

La neovascularización coroidea idiopática frecuentemente se desarrolla en un ojo en mujeres jóvenes, y puede diagnosticarse cuando pueden negarse miopía, uveítis, lesión, enfermedad de colágeno, infección, y similares. Pueden encontrarse tejidos vasculares minúsculos recién generados, hemorragia y cambios exudativos, tales como edema, bajo la retina. Se ha sugerido la participación de la inflamación en esta enfermedad, ya que se alivia después de algunos meses de tratamiento con esteroides antiinflamatorios.

En la presente divulgación, las enfermedades que implican NVC no se limitan a las enfermedades descritas anteriormente, y también incluyen enfermedades que implican NVC que son causadas por otras enfermedades que producen daño al nivel de la membrana de Bruch y epitelios pigmentarios de la retina y posterior neovascularización inflamatoria, tal como uveítis posterior, ruptura coroidea traumática, estrías angioides y síndrome de histoplasmosis ocular.

En la presente invención, "tratamiento de enfermedades que implican NVC" se refiere a enfermedades que implican NVC, donde un síntoma producido por una enfermedad anterior es suprimido o mejorado. El tratamiento de enfermedades que implican NVC también se refiere a suprimir la progresión de NVC y deficiencia funcional de la retina neural producida por hemorragia o fuga de componentes del plasma de los vasos anormales recién generados. Además, "prevención de enfermedades que implican NVC" significa que la aparición de NVC es suprimida en etapas inflamatorias, antes del avance de la neovascularización.

En la presente invención, "suprimir NVC" también se refiere a suprimir la inflamación en la retina (suprimir el crecimiento de células inflamatorias en la retina) y suprimir la producción de factores angiogénicos por células inflamatorias, además de suprimir la neovascularización. Una reacción de inflamación en la retina puede inducirse por una lesión, o por acumulación de productos de descomposición metabólica, tales como drusas.

En la presente invención, puede confirmarse que se suprime NVC detectando el tamaño (volumen) de neovascularización usando angiografía de fondo con fluoresceína o similares. Cuando el volumen de neovascularización se reduce después de la administración de un agente de la presente invención, se considera la NVC suprimida. Métodos de detección de NVC no se limitan a los métodos descritos anteriormente, y pueden detectarse NVC por métodos conocidos, y también por los métodos descritos en los ejemplos en el presente documento.

Como una enfermedad que implica progresos de NVC, la visión se altera debido a la distorsión de imágenes, escotoma central, y similares. En tales casos de deficiencia visual, cuando mejora la agudeza visual tras la administración de un agente de la presente invención, el agente es considerado como útil para pacientes con una enfermedad tal que implica NVC.

En la presente invención, la actividad de inhibidores de IL-6 en inhibir la transducción de señales de IL-6 puede evaluarse por métodos convencionales. Específicamente, se añade IL-6 a cultivos de líneas de células de mieloma humano dependientes de IL-6 (S6B45 y KPMM2), línea celular de linfoma de Lennert T humano KT3, o línea celular dependiente de IL-6 MH60.BSF2; y la captación de ³H-timidina por las células dependientes de IL-6 se mide en presencia de un inhibidor de IL-6. Alternativamente, se cultivan células U266 que expresan receptor de IL-6, e IL-6 marcada con ¹²⁵I y un inhibidor de IL-6 se añaden al cultivo al mismo tiempo; y entonces se cuantifica la IL-6 marcada con ¹²⁵I unida a las células que expresan el receptor de IL-6. Además del inhibidor del grupo 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 en inhibir IL-6 puede evaluarse comparando los resultados de ambos grupos.

Como se muestra en los ejemplos descritos a continuación, se encontró que administrar un anticuerpo anti-receptor de IL-6 suprimía el avance de NVC. Esto sugiere así que los inhibidores de IL-6, tales como anticuerpos anti-receptor de IL-6, son útiles como agentes preventivos y/o terapéuticos para enfermedades que implican NVC, y como inhibidores de NVC.

Los sujetos que van a administrarse con los agentes preventivos y/o terapéuticos para enfermedades que implican NVC, y con los inhibidores de NVC de la presente invención, son mamíferos. Seres humanos son un mamífero preferido.

Los agentes preventivos y/o terapéuticos para enfermedades que implican NVC y los inhibidores de NVC usados en la presente invención pueden administrarse en forma de productos farmacéuticos, y pueden administrarse por vía sistémica o localmente por vías orales o parenterales. Por ejemplo, pueden seleccionarse inyecciones intravenosas tales como infusiones por goteo, inyecciones intramusculares, inyecciones intraperitoneales, inyecciones subcutáneas, supositorios, enemas, comprimidos entéricos orales, o similares. Pueden seleccionarse métodos de administración apropiados dependiendo de la edad y síntomas de un paciente. Una dosis eficaz por administración está seleccionada del intervalo de 0,01 a 100 mg/kg de peso corporal. Alternativamente, la dosis puede seleccionarse del intervalo de 1 a 1000 mg/paciente, preferentemente del intervalo de 5 a 50 mg/paciente. Una dosis y método de administración preferido es del siguiente modo: Por ejemplo, cuando se usa un anticuerpo anti-receptor de IL-6, la dosis eficaz es una cantidad de forma 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), y preferentemente 1 a 20 mg/kg de peso corporal/mes, mediante una inyección intravenosa tal como una infusión por goteo, inyección subcutánea o similar, una vez a varias veces al mes, por ejemplo, dos veces a la semana, una vez a la semana, una vez cada dos semanas, o una vez cada cuatro semanas. Aunque se observa la afección del paciente después de la administración y considerando las tendencias de los valores de los análisis de sangre, el programa de administración puede ajustarse para ensanchar el intervalo de administración de dos veces a la semana o una vez a la semana a una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, o una vez cada cuatro semanas.

En la presente invención, los agentes preventivos y/o terapéuticos para enfermedades que implican NVC y los inhibidores de NVC pueden añadirse con vehículos farmacéuticamente aceptables, tales como conservantes y estabilizadores. Un "vehículo farmacéuticamente aceptable" puede referirse a un material farmacéuticamente aceptable que puede administrarse junto con un agente descrito anteriormente; el propio material puede o puede no producir el efecto de suprimir un aumento en NVC. Alternativamente, en combinación con un inhibidor de IL-6, el material puede producir un efecto estabilizante sinérgico o aditivo incluso cuando no tenga efecto en suprimir un aumento en NVC.

Materiales farmacéuticamente aceptables incluyen, por ejemplo, agua estéril, solución salina fisiológica, estabilizadores, excipientes, tampones, conservantes, detergentes, agentes quelantes (EDTA y similares), y aglutinantes.

En la presente invención, los detergentes incluyen detergentes no iónicos, y ejemplos típicos de tales incluyen ésteres de sorbitano de ácidos grasos tales como monocaprilato de sorbitano, monolaurato de sorbitano y monopalmitato de sorbitano; ésteres de glicerina de ácidos grasos tales como monocaprilato de glicerina, monomiristato de glicerina y monoestearato de glicerina; ésteres de poliglicerina de ácidos grasos tales como monoestearato de decaglicerilo, diestearato de decaglicerilo y monolinoleato de decaglicerilo; ésteres de polioxietilensorbitano de ácidos grasos tales como monolaurato de polioxietilensorbitano, monooleato de polioxietilensorbitano, monoestearato de polioxietilensorbitano, monopalmitato de polioxietilensorbitano, trioleato de polioxietilensorbitano y tristearato de polioxietilensorbitano; ésteres de polioxietilensorbitol de ácidos grasos tales como tetraestearato de polioxietilensorbitol y tetraoleato de polioxietilensorbitol; ésteres de polioxietilenglicerina de ácidos grasos tales como monoestearato de polioxietilenglicerilo; ésteres de polietilenglicol de ácidos grasos tales como diestearato de polietilenglicol; polioxietilen alquil éteres tales como polioxietilen lauril éter; polioxietilen polioxipropilen alquil éteres tales como polioxietilenpolioxipropilenglicol, polioxietilen polioxipropilen propil éter y polioxietilen polioxipropilen cetil éter; polioxietilen alquil fenil éteres tales como polioxietilen nonilfenil éter; aceites de ricino endurecidos con polioxietileno tales como aceite de polioxietilenricino y aceite de ricino endurecido con polioxietileno (aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno); derivados de cera de abeja de polioxietileno tales como cera de abeja de polioxietilensorbitol; derivados de polioxietilenlanolina tales como polioxietilenlanolina; y polioxietilenamidas de ácidos grasos y similares con un HLB de seis a 18, tal como amida de ácido polioxietilenesteárico.

Detergentes también incluyen detergentes aniónicos, y ejemplos típicos de tales 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 promedio molar de óxido de etileno añadido es 2 a 4, tal como polioxietilen lauril sulfato de sodio; sales de éster de alquilsulfosuccinato que tienen un grupo alquilo con ocho a 18 átomos de carbono, tal como éster de laurilsulfosuccinato de sodio; detergentes naturales, por ejemplo, lecitina; glicerofosfolípidos; esfingofosfolípidos tales como esfingomielina; y ésteres de sacarosa de ácidos grasos en los que los ácidos grasos tienen 12 a 18 átomos de carbono.

Uno, dos o más de los detergentes descritos anteriormente pueden combinarse y añadirse a los agentes usados en la presente invención. Detergentes que se usan preferentemente en las preparaciones de la presente invención incluyen ésteres de polioxietilensorbitano de ácidos grasos, tales como polisorbato 20, 40, 60 y 80. Los polisorbato 20 y 80 son particularmente preferidos. También se prefieren polioxietilenpolioxipropilenglicoles, tales como poloxámero (Pluronic F-68® y similares).

La cantidad de detergente añadida varía dependiendo del tipo de detergente usado. Cuando se usa polisorbato 20 o 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, y más preferentemente en el intervalo de 0,005 a 2 mg/ml.

En la presente invención, tampones incluyen tampón fosfato, 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 ácido carbónico, tampón Tris, tampón histidina y tampón imidazol.

Pueden formularse preparaciones líquidas disolviendo los agentes en tampones acuosos conocidos en el campo de las preparaciones líquidas. La concentración de tampón está en general en el intervalo de 1 a 500 mM, preferentemente en el intervalo de 5 a 100 mM, y más preferentemente en el intervalo de 10 a 20 mM.

Los agentes usados en la presente invención también pueden comprender otros polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas tales como albúmina de suero, gelatina, e inmunoglobulina; aminoácidos; azúcares e hidratos de carbono tales como polisacáridos y monosacáridos, alcoholes de azúcar, y similares.

5 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, concretamente aminoácidos de fosfato). Cuando se usan aminoácidos libres, el pH se ajusta a un valor preferido añadiendo sustancias tampón 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. En este caso, el uso de fosfato es particularmente beneficioso debido a que da bastantes productos liofilizados estables. El fosfato es particularmente ventajoso cuando las preparaciones no contienen sustancialmente ácidos orgánicos, tales como ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico y ácido fumárico, o no contienen aniones correspondientes (ión malato, ión tartrato, ión citrato, ión succinato, ión fumarato, y similares). Aminoácidos preferidos son arginina, lisina, histidina y ornitina. También pueden usarse 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-acetil-triptófano.

En el presente documento, 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, alcoholes de azúcar incluyen, por ejemplo, manitol, sorbitol e inositol.

25 Cuando los agentes usados en la presente invención se preparan como soluciones acuosas para inyección, los agentes pueden mezclarse con, por ejemplo, solución salina fisiológica y/o soluciones isotónicas que contienen glucosa u otros agentes auxiliares (tales como D-sorbitol, D-manosa, D-manitol y cloruro sódico). Las soluciones acuosas pueden usarse en combinación con agentes solubilizantes apropiados tales como alcoholes (etanol y similares), polialcoholes (propilenglicol, PEG, y similares), o detergentes no iónicos (polisorbato 80 y HCO-50).

30 Los agentes pueden comprender además, si se requiere, diluyentes, solubilizantes, agentes de ajuste del pH, agentes calmantes, agentes reductores que contienen azufre, antioxidantes, y similares.

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 tioalcanoicos que tienen uno a siete átomos de carbono.

40 Además, los antioxidantes en la presente invención incluyen, por ejemplo, ácido eritórbico, dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, α -tocoferol, tocoferol acetato, ácido L-ascórbico y sales de los mismos, 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 etilendiaminetetraacetato de disodio (EDTA), pirofosfato de sodio y metafosfato de sodio.

45 Si se requiere, los agentes pueden encapsularse en microcápsulas (microcápsulas de hidroximetilcelulosa, gelatina, poli[ácido metilmetacrílico] o tales) o prepararse como sistemas coloidales de administración de fármacos (liposoma, microesferas de albúmina, microemulsión, nanopartículas, nanocápsulas, y similares) (véase "Remington's Pharmaceutical Science 16ª edición", Oslo Ed., 1980, y similares). Además, también son conocidos métodos de preparación de agentes como agentes de liberación sostenida, y son aplicables a la presente invención (Langer et al., J. Biomed. Mater. Res. (1981) 15, 167-277; Langer, 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 documento EP 133.988).

Los vehículos farmacéuticamente aceptables usados están seleccionados apropiadamente de aquellos descritos anteriormente, o se combinan dependiendo del tipo de forma de dosificación, pero no se limitan a éstos.

55 La presente divulgación se refiere a métodos de tratamiento de enfermedades que implican neovascularización coroidea, que comprenden la etapa de administrar inhibidores de IL-6 a sujetos que han desarrollado una enfermedad que implica NVC.

60 En la presente invención, un "sujeto" se refiere a un organismo o parte del cuerpo del organismo que va a administrarse con un agente preventivo y/o terapéutico para una enfermedad que implica NVC o un inhibidor de NVC de la presente invención. Los organismos incluyen animales (por ejemplo, seres humanos, especies de animales domésticos y animales salvajes), pero no están particularmente limitados.

65 Las "partes del cuerpo del organismo" no están particularmente limitadas, pero preferentemente incluyen las partes coroidea y periférica del corioide.

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

5 La administración parenteral incluye, por ejemplo, administración mediante inyección. Tales inyecciones incluyen, por ejemplo, inyecciones intravenosas tales como infusiones, inyecciones subcutáneas, inyecciones intramusculares e inyecciones intraperitoneales. Los efectos de los métodos de la presente invención pueden lograrse introduciendo genes que comprenden oligonucleótidos que van a administrarse a cuerpos vivos usando técnicas de terapia génica. Alternativamente, los agentes usados en la presente invención pueden administrarse localmente a las áreas de tratamiento previstas. Por ejemplo, los agentes pueden administrarse por inyección local durante la cirugía, usando catéteres, o por administración génica dirigida de ADN que codifican péptidos. Los agentes usados en la presente invención pueden administrarse simultáneamente con métodos terapéuticos conocidos para enfermedades que implican NVC, por ejemplo, fotocoagulación con láser, cirugía submacular, translocación de la fovea, terapia fotodinámica y farmacoterapia, o en momentos diferentes.

15 Ejemplos

En el presente documento a continuación, la presente invención se ilustrará específicamente con referencia a los ejemplos, pero no debe interpretarse como limitantes de la misma.

20 [Ejemplo 1]

Se investigó la función de la transducción de señales relacionada con el receptor de IL-6 en el desarrollo de NVC usando un modelo de ratón de NVC.

25 Primero, se trataron ratones C57BL/6 por fotocoagulación con láser para inducir NVC. Los niveles de proteína y ARNm de IL-6 en el corioide de los ratones tres días después de la fotocoagulación con láser se determinaron por ELISA y RT-PCR, respectivamente. Los resultados mostraron que los niveles de proteína y ARNm de IL-6 en el corioide de ratones con NVC fueron notablemente superiores a en ratones de control normales de la misma edad ($p < 0,05$).

30 A continuación, se administró el anticuerpo monoclonal de rata anti-receptor de IL-6 de ratón MR16-1 a la cavidad peritoneal a una dosis de 10 o 100 $\mu\text{g/g}$ de peso corporal (BW) inmediatamente después de la fotocoagulación. Una semana después de la fotocoagulación, se produjeron muestras de montajes planos teñidos con lectina y se evaluó el volumen de NVC calculando la suma de las áreas de NVC para cada plano de 1 μm de espesor usando un microscopio confocal (Figs. 1 y 2).

35 Los resultados mostraron que el tratamiento con MR16-1 suprimió notablemente el volumen de NVC de un modo dependiente de la dosis (ratones tratados a una dosis de 10 $\mu\text{g/g}$ de BW: $400427 + 95917 \mu\text{m}^3$; ratones tratados a una dosis de 100 $\mu\text{g/g}$ de BW: $290256 + 74982 \mu\text{m}^3$) en comparación con ratones tratados con el vehículo solo ($496216 + 81286 \mu\text{m}^3$) (Figs. 1 y 2).

40 Los hallazgos descritos anteriormente demuestran que la inhibición de la transducción de señales relacionada con el receptor de IL-6 produce supresión del desarrollo de NVC. Estos resultados sugieren que la inhibición del receptor de IL-6 puede usarse como estrategia terapéutica para suprimir NVC asociada a AMD.

45 Aplicabilidad industrial

50 Los agentes terapéuticos de la presente invención tienen como objetivo suprimir la inflamación que acompaña a NVC. Los agentes pueden usarse en etapas inflamatorias antes del avance de la neovascularización estimulada por VEGF. En tales casos, los agentes pueden suprimir la reducción de la función de retina neural producida por hemorragia y fuga de componentes del plasma de los vasos anormalmente generados, sin incurrir en los daños neurológicos irreversibles incurables que son inevitables con tratamientos que empiezan durante las etapas avanzadas de la neovascularización.

55 Hasta la fecha, aptámeros anti-VEGF son autorizados para venta en varios países (Estados Unidos, Canadá, Brasil, y otros países), y están sometidos a ensayos clínicos en Japón. El tratamiento con aptámeros anti-VEGF revierte la neovascularización y los grupos tratados muestran menos deficiencia visual que los grupos de control, pero nunca se ha logrado mejoría visual. Esto implica que cuando las retinas neurales son dañadas debido a hemorragia y edema, son irreversiblemente degeneradas. Esto sugiere un límite para las terapias anti-neovascularización realizadas una vez ha avanzado la neovascularización. El único procedimiento terapéutico autorizado por el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar en Japón para tratar NVC producida por degeneración macular asociada a la edad es la terapia fotodinámica, que logra que la formación de coágulos ocluya vasos recién generados potenciando localmente el sistema de coagulación en los vasos recién generados. Sin embargo, al igual que la terapia con aptámeros anti-VEGF, este procedimiento terapéutico proporciona solo un mal pronóstico para la visión.

5 Como se ha descrito anteriormente, en el tratamiento clínico de degeneración macular asociada a la edad, se desea el desarrollo de métodos terapéuticos que se dirigen a afecciones patológicas tempranas, antes del daño funcional en la retina neural. Desde este punto de vista, los agentes terapéuticos usados en la presente invención tienen como objetivo proporcionar un mejor pronóstico para la visión, y se espera que sean buenas noticias para los pacientes con degeneración macular asociada a la edad, para los que no se espera que los métodos terapéuticos existentes ofrezcan mejoras suficientes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de IL-6 como principio activo para su uso en prevenir y/o tratar una enfermedad que implica neovascularización coroidea, en la que el inhibidor de IL-6 es un anticuerpo que reconoce una IL-6, en la que la enfermedad que implica neovascularización coroidea es degeneración macular asociada a la edad, neovascularización coroidea miópica o neovascularización coroidea idiopática.
- 10 2. Uso de un inhibidor de IL-6 para la preparación de una composición farmacéutica para prevenir y/o tratar una enfermedad que implica neovascularización coroidea, en la que el inhibidor de IL-6 es un anticuerpo que reconoce una IL-6, en la que la enfermedad que implica neovascularización coroidea es degeneración macular asociada a la edad, neovascularización coroidea miópica o neovascularización coroidea idiopática.
- 15 3. La composición farmacéutica para su uso o el uso de la reivindicación 1 o 2, en la que dicho inhibidor de IL-6 es para administración a un sujeto que ha desarrollado dicha enfermedad que implica neovascularización coroidea.
- 20 4. Una composición farmacéutica que comprende un inhibidor de IL-6 como principio activo para su uso en inhibir neovascularización coroidea en una enfermedad que implica neovascularización coroidea, en la que el inhibidor de IL-6 es un anticuerpo que reconoce una IL-6, en la que la enfermedad que implica neovascularización coroidea es degeneración macular asociada a la edad, neovascularización coroidea miópica o neovascularización coroidea idiopática.
- 25 5. Uso de un inhibidor de IL-6 para la preparación de una composición farmacéutica para inhibir neovascularización coroidea en una enfermedad que implica neovascularización coroidea, en la que el inhibidor de IL-6 es un anticuerpo que reconoce una IL-6, en la que la enfermedad que implica neovascularización coroidea es degeneración macular asociada a la edad, neovascularización coroidea miópica o neovascularización coroidea idiopática.
- 30 6. La composición farmacéutica para su uso o el uso de la reivindicación 4 o 5, en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
- 35 7. La composición farmacéutica para su uso o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que el anticuerpo reconoce una IL-6 humana.
8. La composición farmacéutica para su uso o el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en la que el anticuerpo es un anticuerpo recombinante.
9. La composición farmacéutica para su uso o el uso de la reivindicación 8, en la que el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, humanizado o humano.

FIG. 1

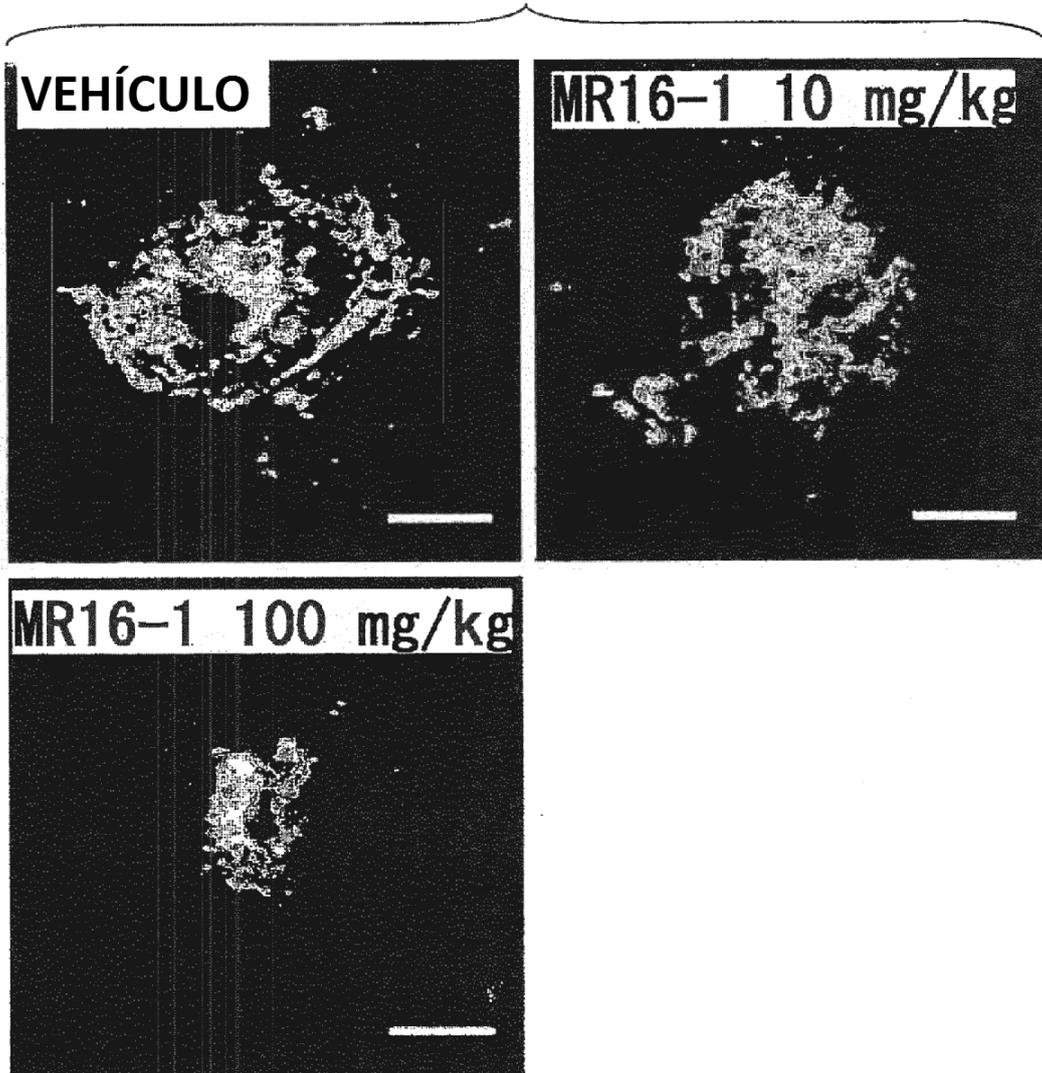


FIG. 2

