



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0806812-7 B1

(22) Data do Depósito: 23/01/2008

(45) Data de Concessão: 03/08/2021



(54) Título: AGENTE PARA SUPRIMIR REAÇÃO DE REJEIÇÃO CRÔNICA E USO DE UM INIBIDOR DE IL-6

(51) Int.Cl.: A61K 45/00; A61K 39/395; A61P 37/06.

(30) Prioridade Unionista: 23/01/2007 JP 2007-012572.

(73) Titular(es): SHINSHU UNIVERSITY; CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA.

(72) Inventor(es): MASAFUMI TAKAHASHI; ATSUSHI IZAWA.

(86) Pedido PCT: PCT JP2008050842 de 23/01/2008

(87) Publicação PCT: WO 2008/090901 de 31/07/2008

(85) Data do Início da Fase Nacional: 22/07/2009

(57) Resumo: AGENTE PARA SUPRIMIR REAÇÃO DE REJEIÇÃO CRÔNICA E USO DE UM INIBIDOR DE IL-6. A presente invenção refere-se ao efeito de anticorpos de receptor anti-IL-6 suprimindo reação de rejeição crônica. Foi avaliado o efeito da administração de anticorpo de receptor de IL-6 anticamundongo (MR16-1) na supressão da reação de rejeição crônica usando um modelo de camundongo para rejeição crônica pós- transplante de coração. O resultado de análise histopatológica de corações transplantados extirpados 60 dias após o transplante revelou que a fibrose de lesões estenóticas vasculares e do miocárdio, que são condições patológicas características da reação de rejeição crônica, foram significativamente suprimidos no grupo tratado com MR16-1 quando comparado ao grupo de controle. Desse modo, a administração de MR16-1 foi demonstrada ter o efeito de suprimir reação de rejeição crônica. Especificamente, a presente invenção descobriu pela primeira vez que a reação de rejeição na fase crônica após transplante de órgão foi suprimida administrando-se um anticorpo de receptor anti-IL-6.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"AGENTE PARA SUPRIMIR REAÇÃO DE REJEIÇÃO CRÔNICA E USO DE UM INIBIDOR DE IL-6"**.

Campo Técnico

[0001] A presente invenção refere-se aos agentes para suprimir reação de rejeição crônica, que compreende um inibidor de IL-6 como um ingrediente ativo, e uso do mesmo. A presente invenção também refere-se aos métodos para suprimir reação de rejeição crônica, que compreende a etapa de administrar um inibidor de IL-6 aos recipientes.

Antecedente da Técnica

[0002] IL-6 também é uma citocina chamada fator 2 estimulante de célula B (BSF2) ou interferon $\beta 2$. IL-6 foi descrito como um fator de diferenciação envolvido na ativação de linfócitos de célula B (Documento de Não-Patente 1), e depois foi revelado ser uma citocina multifuncional que influencia a função de várias células (Documento de Não-Patente 2). IL-6 foi reportado induzir a maturação de células de linfócito T (Documento de Não-Patente 3).

[0003] IL-6 transmite sua atividade biológica por dois tipos de proteínas em células. O primeiro é o receptor de IL-6, que é uma proteína de ligação de ligando à qual IL-6 se liga, com um peso molecular de cerca de 80 kDa (Documentos de Não-Patente 4 e 5). O receptor de IL-6 está presente em uma forma ligada à membrana que penetra e é expressa na membrana de célula, e também como um receptor de IL-6 solúvel que principalmente consiste na região extracelular da forma ligada à membrana.

[0004] O outro tipo de proteína é a proteína de membrana gp130, que tem um peso molecular de cerca de 130 kDa e está envolvida na transdução de sinal de ligação de não-ligante. A atividade biológica de IL-6 é transmitida na célula por formação de um complexo de IL-6/receptor de IL-6 por IL-6 e receptor de IL-6, seguido por ligação do

complexo com gp130 (Documento de Não-Patente 6).

[0005] Os inibidores de IL-6 são substâncias que inibem a transmissão de atividade biológica de IL-6. Atualmente, os inibidores de IL-6 conhecidos incluem anticorpos contra IL-6 (anticorpos anti-IL-6), anticorpos contra receptor de IL-6 (anticorpos de receptor anti-IL-6), anticorpos contra gp130 (anticorpos anti-gp130), IL-6 variantes, peptídeos parciais de IL-6 ou receptor de IL-6, e tais.

[0006] Há vários relatos com respeito aos anticorpos de receptor anti-IL-6 (Documentos de Não-Patente 7 e 8, e Documento de Patente 1 a 3). Tal relato detalha um anticorpo de PM-1 humanizado que é obtido transplantando-se a região de determinação de complementaridade (CDR) de anticorpo de camundongo PM-1 (Documento de Não-Patente 9) que é um anticorpo de receptor anti-IL-6, em um anticorpo humano (Documento de Patente 4).

[0007] Devido a avanços em terapia de multifármaco e aplicação clínica de vários imunossuppressores, estratégias terapêuticas para a reação de rejeição aguda que segue transplante de órgão são quase estabelecidas, e a taxa de sobrevivência de um ano após vários transplantes de órgão foi significativamente melhorada. Porém, a reação de rejeição crônica, que fica problemática após um ano seguinte o transplante, ocorre até mesmo em casos clínicos onde a reação de rejeição aguda foi superada através de terapia imunossupressiva convencional, e onde tal terapia foi continuada a longo prazo. Desse modo, nem métodos preventivos nem terapêuticos eficazes contra a reação de rejeição crônica foi estabelecido. Além disso, o mecanismo por trás desta condição patológica não foi elucidado completamente, e é difícil de diagnosticá-lo comparado com à reação de rejeição aguda. Desse modo, a reação de rejeição crônica é conhecida por ser uma complicação que afeta prognose a longo prazo em recipientes (Documentos de Não-Patente 10 e 11).

[0008] Os aspectos patológicos conhecidos característicos da reação de rejeição crônica incluem fibroses de interstício e estenose de lúmen devido ao espessamento da íntima de tecidos lúmenais em órgãos transplantados. Em particular, angioestenose é um aspecto patológico importante, e é referido como lesão vascular pós-transplante ou arteriosclerose pós-transplante. Uma variedade de fatores é considerada complicadamente influenciar a progressão da condição patológica, tal como prolongação da reação de rejeição por ambas as imunidades celular e humoral, distúrbios de reperfusão de isquemia de órgãos, distúrbios funcionais de endotelia vascular, fatores de risco comuns para arteriosclerose (diabete, hiperlipidemia, hipertensão, e similares) em recipientes, efeitos colaterais de imunossuppressores, fatores genéticos, e infecção pós-transplante de citomegalovírus (Documentos de Não-Patente 12 e 13).

[0009] Entre agentes farmacêuticos existentes, os inibidores de calcineurina tal como ciclosporina e tacrolimo são em particular ineficazes para a reação de rejeição crônica, e seus efeitos colaterais tal como hipertensão, hiperlipidemia, e diabete são considerados problemáticos. Além disso, a terapia imunossupressiva a longo prazo após transplante é requerida em particular em recipientes pediátricos. Desse modo, o desenvolvimento de agentes farmacêuticos eficazes para a reação de rejeição crônica e tendo poucos efeitos colaterais (Documentos de Não-Patente 13 e 14) foi antecipado.

[00010] A exigência descrita acima para desenvolver uma nova terapia imunossupressiva para suprimir a reação de rejeição crônica é o fundamento do estudo presente.

[00011] Os documentos de técnicas anteriores relacionadas para a presente invenção são descritos abaixo.

[00012] [Documento de Patente 1] Publicação de Pedido de Patente Internacional No. WO 95/09873

- [00013] [Documento de Patente 2] Pedido de Patente Francês No. FR 2694767
- [00014] [Documento de Patente 3] Patente dos Estados Unidos No. 5216128
- [00015] [Documento de Patente 4] WO 92/19759
- [00016] [Documento de Não-Patente 1] Hirano, T., e outros., Nature (1986) 324, 73-76,
- [00017] [Documento de Não-Patente 2] Akira, S., e outros., Adv. em Immunology (1993) 54, 1-78,
- [00018] [Documento de Não-Patente 3] Lotz, M., e outros., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258
- [00019] [Documento de Não-Patente 4] Taga, T., e outros., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981
- [00020] [Documento de Não-Patente 5] Yamasaki, K., e outros., Science (1988) 241, 825-828,
- [00021] [Documento de Não-Patente 6] Taga, T., e outros., Cell (1989) 58, 573-581,
- [00022] [Documento de Não-Patente 7] Novick, D., e outros., Hibridoma (1991) 10, 137-146,
- [00023] [Documento de Não-Patente 8] Huang, Y., W. e outros., Hibridoma (1993) 12, 621-630,
- [00024] [Documento de Não-Patente 9] Hirata, Y., e outros., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906
- [00025] [Documento de Não-Patente 10] Wong, B., W. e outros., Cardiovasc. Pathol. (2005) 14, 176-80
- [00026] [Documento de Não-Patente 11] Hornick, P., e outros., Methods Mol. Biol. (2006) 333, 131-44
- [00027] [Documento de Não-Patente 12] Ramzy, D., e outros., Can. J. Surg. (2005) 48, 319-327
- [00028] [Documento de Não-Patente 13] Valantine, H., J. Heart

Lung Transplant (2004) 23(5 Suppl), S187-93

[00029] [Documento de Não-Patente 14] Webber, S., A. e outros., Lancet (2006) 368, 53-69,

[00030] [Documento de Não-Patente 15] Izawa, A., e outros., Circ. J. (2007) 71(Suppl I), 392 (Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society, Kobe, Mar 15-Mar 17, 2007; Abstract PE-269)

[00031] [Documento de Não-Patente 16] Izawa, A., e outros., Am. J. Transplante. (2007) 7(Suppl 11), 426 (American Transplant Congress, San Francisco, CA, Mar 5-Mar 9, 2007; Abstract 1084)

Descrição da Invenção

Problemas a serem Resolvidos pela Invenção

[00032] A presente invenção foi administrada sob as circunstâncias descritas acima. Um objetivo da presente invenção é fornecer os agentes para suprimir a reação de rejeição crônica, que compreende um inibidor de IL-6 como ingredientes ativos.

[00033] Outro objetivo da presente invenção é fornecer métodos para suprimir a reação de rejeição crônica, que compreende a etapa de administrar um inibidor de IL-6 aos pacientes.

Meios para Resolver os Problemas

[00034] Para alcançar os objetivos descritos acima, os presentes inventores testaram anticorpos de receptor anti-IL-6 quanto ao efeito de suprimir a reação de rejeição crônica.

[00035] Os presentes inventores avaliaram o efeito de supressão de reação de rejeição crônica de administração de anticorpo de receptor de IL-6 anticamundongo (MR16-1) usando um modelo de camundongo para rejeição crônica pós-transplante do coração. O resultado da análise histopatológica dos corações transplantados extirpados 60 dias após o transplante revelou que a fibrose de miocárdio e lesões estenóticas vasculares, que são condições patológicas características da reação de rejeição crônica, foram significativamente suprimidas no

grupo tratado por MR16-1 quando comparado ao grupo de controle. Desse modo, a administração de MR16-1 foi demonstrada ter o efeito de suprimir a reação de rejeição crônica.

[00036] Desse modo, os presentes inventores descobriram pela primeira vez que a administração de anticorpos de receptor anti-IL-6 suprime a reação de rejeição na fase crônica após transplante de órgão, e desse modo completou a presente invenção.

[00037] Mais especificamente, a presente invenção fornece as seguintes invenções:

[1] um agente para suprimir a reação de rejeição crônica, compreendendo como um ingrediente ativo um inibidor de IL-6;

[2] o agente para suprimir reação de rejeição crônica de [1], em que o inibidor de IL-6 é um anticorpo que reconhece um IL-6;

[3] o agente para suprimir a reação de rejeição crônica de [1], em que o inibidor de IL-6 é um anticorpo que reconhece um receptor de IL-6;

[4] o agente para suprimir a reação de rejeição crônica de [2] ou [3], em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal;

[5] o agente para suprimir a reação de rejeição crônica de [2] ou [3], em que o anticorpo é um anticorpo que reconhece uma IL-6 humana ou receptor de IL-6 humana;

[6] o agente para suprimir a reação de rejeição crônica de [2] ou [3], em que o anticorpo é um anticorpo recombinante;

[7] o agente para suprimir a reação de rejeição crônica de qualquer um de [2] a [6], em que o anticorpo é um anticorpo quimérico, humanizado, ou humano;

[8] o agente para suprimir a reação de rejeição crônica de qualquer um de [1] a [7] que é usado para suprimir reação de rejeição crônica em transplante de coração;

[9] um método para suprimir reação de rejeição crônica que

compreende a etapa de administrar um inibidor de IL-6 a um paciente;

[10] o método de [9], em que o inibidor de IL-6 é um anticorpo que reconhece uma IL-6;

[11] o método de [9], em que o inibidor de IL-6 é um anticorpo que reconhece um receptor de IL-6;

[12] o método de [10] ou [11], em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal;

[13] o método de [10] ou [11], em que o anticorpo é um anticorpo que reconhece uma IL-6 humana ou receptor de IL-6 humana;

[14] o método de [10] ou [11], em que o anticorpo é um anticorpo recombinante;

[15] o método de qualquer um de [10] a [14], em que o anticorpo é um anticorpo quimérico, humanizado, ou humano;

[16] o método de qualquer um de [9] a [15] que suprime a reação de rejeição crônica em transplante de coração;

[17] uso de um inibidor de IL-6 produzindo um agente para suprimir a reação de rejeição crônica;

[18] o uso de [17], em que o inibidor de IL-6 é um anticorpo que reconhece um IL-6;

[19] o uso de [17], em que o inibidor de IL-6 é um anticorpo que reconhece um receptor de IL-6;

[20] o uso de [18] ou [19], em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal;

[21] o uso de [18] ou [19], em que o anticorpo é um anticorpo que reconhece uma IL-6 humana ou receptor de IL-6 humana;

[22] o uso de [18] ou [19], em que o anticorpo é um anticorpo recombinante;

[23] o uso de qualquer um de [18] a [22], em que o

anticorpo é um anticorpo quimérico, humanizado, ou humano; e

[24] um inibidor de IL-6 para uso na supressão de reação de rejeição crônica.

Modo para Realizar a Invenção

[00038] Os presentes inventores descobriram que a administração de um anticorpo de receptor anti-IL-6 pode suprimir a reação de rejeição crônica. A presente invenção é com base nestas descobertas.

[00039] A presente invenção refere-se aos agentes para suprimir a reação de rejeição crônica, que compreende um inibidor de IL-6 como um ingrediente ativo.

[00040] Aqui, um "inibidor de IL-6" é uma substância que bloqueia transdução de sinal mediada por IL-6 e inibe a atividade biológica de IL-6. Preferivelmente, o inibidor de IL-6 é uma substância que tem uma função inibidora contra a ligação IL-6, receptor de IL-6, ou gp130.

[00041] Os inibidores de IL-6 da presente invenção incluem, porém não estão limitados a, por exemplo, anticorpos anti-IL-6, anticorpos de receptor anti-IL-6, anticorpos anti-gp130, variantes de IL-6, variantes de receptor de IL-6 solúveis, e peptídeos parciais de IL-6 ou receptor de IL-6, e proteínas e compostos de peso molecular baixo (por exemplo, C326 Avimer (Nature Biotechnology (2005) 23, 1556-61)) que mostra atividades semelhantes. Os inibidores de IL-6 preferíveis da presente invenção incluem anticorpos que reconhecem os receptores de IL-6.

[00042] A fonte dos anticorpos não é particularmente restrita na presente invenção; porém, os anticorpos são preferivelmente derivados de mamíferos, e mais preferivelmente derivados de humanos.

[00043] Os anticorpos anti-IL-6 usados na presente invenção podem ser obtidos como anticorpos policlonais ou monoclonais usando meios conhecidos. Em particular, os anticorpos monoclonais

derivados de mamíferos são preferidos como os anticorpos anti-IL-6 usados na presente invenção. Os anticorpos monoclonais derivados de mamíferos incluem aqueles produzidos de hibridomas e aqueles produzidos por métodos de engenharia genética de hospedeiros transformados com um vetor de expressão que compreende um gene de anticorpo. Ao se ligar a IL-6, o anticorpo inibe IL-6 de se ligar a um receptor de IL-6 e desse modo bloqueia a transmissão da atividade biológica de IL-6 na célula.

[00044] Tais anticorpos incluem, MH166 (Matsuda, T., e outros., Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956), anticorpo de SK2 (Sato, K., e outros., transaction of the 21st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (1991) 21, 166), e assim por diante.

[00045] Basicamente, os hibridomas de produção de anticorpo anti-IL-6 podem ser preparadas usando técnicas conhecidas, como segue: Especificamente, tais hibridomas podem ser preparados usando IL-6 como um antígeno sensibilizante para realizar imunização usando um método de imunização convencional, fundindo as células imunes obtidas com células de origem conhecidas por um método de fusão de célula convencional, e avaliando quanto às células produção de anticorpo monoclonal usando um método de avaliação convencional.

[00046] Mais especificamente, os anticorpos anti-IL-6 podem ser produzidos como segue: Por exemplo, IL-6 humano para uso como o antígeno sensibilizante para obter anticorpos pode ser obtido usando o gene de IL-6 e/ou sequências de aminoácido descritas em Eur. J. Biochem. (1987) 168, 543-550; J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541; e/ou Agr. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688.

[00047] Após transformar uma célula hospedeira apropriada com um sistema de vetor de expressão conhecido inserido com uma sequência de gene de IL-6, a proteína de IL-6 desejada é purificada usando métodos conhecidos do interior da célula hospedeira ou do

sobrenadante de cultura. Esta proteína de IL-6 purificada pode ser usada como um antígeno sensibilizante. Alternativamente, uma proteína de fusão da proteína de IL-6 e outra proteína podem ser usadas como um antígeno sensibilizante.

[00048] Os anticorpos de receptor anti-IL6 usados para a presente invenção podem ser obtidos como anticorpos policlonais ou monoclonais usando métodos conhecidos. Em particular, os anticorpos de receptor anti-IL-6 usados na presente invenção são preferivelmente anticorpos monoclonais derivados de mamíferos. Os anticorpos monoclonais derivados de mamíferos incluem aqueles produzidos de hibridomas e aqueles produzidos usando métodos de engenharia genética de hospedeiros transformados com um vetor de expressão que compreende um gene de anticorpo. Ligando-se a um receptor de IL-6, os anticorpos inibem IL-6 de ligar-se ao receptor de IL-6, e desse modo bloqueia a transmissão da atividade biológica de IL-6 na célula.

[00049] Tais anticorpos incluem, anticorpo de MR16-1 (Tamura, T., e outros., Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. (1993) 90, 11924-11928); anticorpo de PM-1 (Hirata, Y., e outros., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906); anticorpo de AUK12-20, anticorpo de AUK64-7 e anticorpo de AUK146-15 (Publicação de Pedido de Patente Internacional No. WO 92/19759), e assim por diante. Destes, o anticorpo de PM-1 pode ser exemplificado como um anticorpo monoclonal preferido contra o receptor de IL-6 humano, e o anticorpo de MR16-1 como um anticorpo monoclonal preferido contra o receptor de IL-6 de camundongo.

[00050] Basicamente, os hibridomas que produzem um anticorpo monoclonal de receptor de anti-IL-6 pode ser preparado usando técnicas conhecidas, como segue: Especificamente, tais hibridomas podem ser preparados usando um receptor de IL-6 como o antígeno sensibilizante para realizar imunização por um método de imunização convencional, fundindo as células imunes obtidas com uma célula

origem conhecida usando um método de fusão de célula convencional, e avaliando quanto às células de produção de anticorpo monoclonal usando um método de avaliação convencional.

[00051] Mais especificamente, os anticorpos de receptor anti-IL-6 podem ser produzidos como segue: por exemplo, um receptor de IL-6 humano ou receptor de IL-6 de camundongo para uso como um antígeno sensibilizante para obter anticorpos pode ser obtido usando os genes de receptor de IL-6 e/ou as sequências de aminoácido descritas na Publicação do Pedido de Patente Europeu No. EP 325474 e Publicação Kokai de Pedido de Patente Japonês No. (JP-A) H03-155795 (Pedido de Patente Japonês publicada, não examinado), respectivamente.

[00052] Há dois tipos de proteínas de receptor de IL-6: uma expressa na membrana de célula e a outra separada da membrana de célula (receptores de IL-6 solúveis) (Yasukawa, K., e outros., J. Biochem. (1990) 108, 673-676). O receptor de IL-6 solúvel consiste essencialmente na região extracelular do receptor de IL-6 ligado a membrana de célula, e difere do receptor de IL-6 ligado a membrana pelo fato de que ele não tem a região de transmembrana ou ambas as regiões de transmembrana e intracelular. Qualquer receptor de IL-6 pode ser empregado como uma proteína de receptor de IL-6, contanto que possa ser usada como um antígeno sensibilizante para produzir um anticorpo de receptor anti-IL-6 usado na presente invenção.

[00053] Após transformar uma célula hospedeira apropriada com um sistema de vetor de expressão conhecido inserido com uma sequência de gene de receptor de IL-6, a proteína de receptor de IL-6 desejada é purificada no interior da célula hospedeira ou no sobrenadante de cultura usando um método conhecido. Esta proteína de receptor de IL-6 purificada pode ser usada como um antígeno sensibilizante. Alternativamente, uma célula que expressa o receptor

de IL-6 ou uma proteína de fusão da proteína de receptor de IL-6 e outra proteína pode ser usada como um antígeno sensibilizante.

[00054] Os anticorpos anti-gp130 usados na presente invenção podem ser obtidos como anticorpos policlonais ou monoclonais usando métodos conhecidos. Em particular, os anticorpos anti-gp130 usados na presente invenção são preferivelmente anticorpos monoclonais derivados de mamíferos. Os anticorpos monoclonais derivados de mamífero incluem aqueles produzidos de hibridomas e aqueles produzidos usando métodos de engenharia genética de hospedeiros transformados com um vetor de expressão que compreende um gene de anticorpo. Por ligação a gp130, o anticorpo inibe gp130 de se ligar ao complexo de IL-6/receptor de IL-6, e desse modo bloqueia a transmissão de atividade biológica de IL-6 na célula.

[00055] Tais anticorpos incluem, anticorpo de AM64 (JP-A (Kokai) H03-219894), anticorpo 4B11 e anticorpo 2H4 (EUA 5571513), anticorpo de B-S12 e anticorpo de B-P8 (JP-A (Kokai) H08-291199), e assim por diante.

[00056] Basicamente, os hibridomas de produção de anticorpo monoclonal anti-gp130 podem ser preparados usando técnicas conhecidas, como segue: Especificamente, tais hibridomas podem ser preparados usando gp130 como um antígeno sensibilizante para realizar a imunização usando um método de imunização convencional, fundindo as células imunes obtidas com uma célula origem conhecida por um método de fusão de célula convencional, e avaliando quanto às células de produção de anticorpo monoclonal usando um método de avaliação convencional.

[00057] Mais especificamente, os anticorpos monoclonais podem ser produzidos como segue: por exemplo, gp130 para uso como um antígeno sensibilizante para obter anticorpos, pode ser obtido usando o gene de gp130 e/ou sequência de aminoácido descritos na

Publicação de Pedido de Patente Europeu No. EP 411946.

[00058] Após transformar uma célula hospedeira apropriada com um sistema de vetor de expressão conhecido inserido com uma sequência de gene de gp130, a proteína de gp130 desejada é purificada por um método conhecido dentro da célula hospedeira ou do sobrenadante de cultura. Esta proteína gp130 purificada pode ser usada como um antígeno sensibilizante. Alternativamente, uma célula que expressa gp130 ou uma proteína de fusão da proteína gp130 e outra proteína pode ser usada como um antígeno sensibilizante.

[00059] Os mamíferos a serem imunizados com um antígeno sensibilizante não são particularmente limitados, porém são preferivelmente selecionados considerando a compatibilidade com a célula de origem usada para fusão de célula. Geralmente, roedores como camundongos, ratos, e *hamsters* são usados.

[00060] Os animais são imunizados com antígenos sensibilizantes de acordo com métodos conhecidos. Por exemplo, como um método geral, os animais são imunizados por injeção intraperitoneal ou subcutânea de um antígeno sensibilizante. Especificamente, o antígeno sensibilizante é preferivelmente diluído ou suspenso em uma quantidade apropriada de salina tamponada de fosfato (PBS), salina fisiológica ou tal, misturado com uma quantidade apropriada de um adjuvante geral (por exemplo, adjuvante completo de Freund), emulsificado, e em seguida administrado a um mamífero várias vezes, cada quatro a 21 dias. Além disso, um veículo apropriado pode ser usado para imunização com um antígeno sensibilizante.

[00061] Em seguida à tal imunização, um nível aumentado de um anticorpo desejado no soro é confirmado e então células imunes são obtidas do mamífero para fusão de célula. As células imunes preferidas para fusão de célula incluem, em particular, células do baço.

[00062] As células de mieloma de mamífero usadas como células

origem, isto é, como células parceiras a serem fundidas com as células imunes acima, incluem várias cepas de célula conhecidas, por exemplo, P3X63Ag8.653 (Kearney, J., F. e outros., J. Immunol (1979) 123, 1548-1550), P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G., e Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, D., H. e outros., Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M., e outros., Nature (1978) 276, 269-270), F0 (de St. Groth, S., F. e outros., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21), S194 (Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323), R210 (Galfre, G., e outros., Nature (1979) 277, 131-133), e outros.

[00063] Basicamente, a fusão de célula das células imunes acima mencionadas e células de mieloma, pode ser realizada usando métodos conhecidos, por exemplo, o método de Milstein e outros (Kohler, G., e Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46), e outros.

[00064] Mais especificamente, a fusão de célula acima mencionada é obtida em meio de cultura nutriente geral na presença de um agente de realce de fusão de célula. Por exemplo, polietileno glicol (PEG), vírus de Sendai (HVJ), e similares são usados como agentes de realce de fusão. Além disso, para aumentar a eficiência da fusão, agentes auxiliares tal como sulfóxido de dimetila podem ser adicionados dependendo da necessidade.

[00065] A relação de células imunes para células de mieloma usadas é preferivelmente, por exemplo, 1 a 10 células imunes para cada célula de mieloma. O meio de cultura usado para a fusão de célula acima mencionada é, por exemplo, o meio de cultura de RPMI1640 ou MEM, que é adequado para proliferação das células de mieloma acima mencionadas. Um meio de cultura geral usado para cultivar este tipo de célula também pode ser usado. Além disso, os

suplementos de soro tais como soro de bezerro fetal (FCS) podem ser usados em combinação.

[00066] Para fusão de célula, as células de fusão (hibridomas) de interesse são formadas misturando-se quantidades predeterminadas de uma célula imune acima mencionada e célula de mieloma em um meio de cultura acima mencionado, e então adicionando e misturando uma concentração de 30% a 60% (peso/volume) de solução de PEG (por exemplo, uma solução de PEG com um peso molecular médio de cerca de 1.000 a 6.000) pré-aquecida a cerca de 37°C. Em seguida, os agentes de fusão de célula e similares que são inadequados para o crescimento de hibridomas podem ser removidos repetidamente adicionando-se um meio de cultura apropriado e então removendo o sobrenadante através de centrifugação.

[00067] Os hibridomas acima são selecionados cultivando-se células em um meio de cultura de seleção geral, por exemplo, meio de cultura de HAT (um meio de cultura que contém hipoxantina, aminopterina, e timidina). A cultura em meio de cultura de HAT é continuada durante um período suficiente, geralmente vários dias a várias semanas, para matar células diferentes de hibridomas de interesse (células não-fundidas). Em seguida, um método de diluição limitado padrão é realizado para avaliar e clonar hibridomas que produzem um anticorpo de interesse.

[00068] Além dos métodos para imunizar os animais não-humanos com antígenos para obter os hibridomas acima mencionados, os anticorpos humanos desejados com a atividade de ligação a um antígeno ou célula de expressão de antígeno desejado podem ser obtidos sensibilizando-se um linfócito humano com uma proteína de antígeno desejada ou célula expressão de antígeno *in vitro*, e fundindo o linfócito B sensibilizado com uma célula de mieloma humana (por exemplo, U266) (veja, Publicação de Kokoku de Pedido de Patente

Japonês No. (JP-B) H01-59878 (Pedido de Patente Japonês examinado, aprovado publicado para oposição)). Além disso, um anticorpo humano desejado pode ser obtido administrando um antígeno ou célula de expressão de antígeno a um animal transgênico que tenha um repertório de genes de anticorpo humanos, e então em seguida ao método acima mencionado (veja Publicação de Pedido de Patente Internacional Nos. WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, e WO 96/33735).

[00069] Os hibridomas desse modo preparados que produzem anticorpos monoclonais podem ser subcultivados em um meio de cultura convencional e armazenados em nitrogênio líquido durante um período longo.

[00070] Ao obter anticorpos monoclonais dos hibridomas acima mencionados, os seguintes métodos podem ser empregados: (1) métodos onde os hibridomas são cultivados de acordo com métodos convencionais e os anticorpos são obtidos como um sobrenadante de cultura; (2) métodos onde os hibridomas são proliferados administrando-os a um mamífero compatível e os anticorpos são obtidos como ascite; e assim por diante. O método anterior é preferido para obter anticorpos com pureza elevada, e o posterior é preferido para produção de anticorpo em grande escala.

[00071] Por exemplo, os hibridomas de produção de anticorpo de receptor anti-IL-6 podem ser preparados pelo método descrito em JP-A (Kokai) H03-139293. Tais hibridomas podem ser preparados injetando-se um hibridoma de produção de anticorpo PM-1 na poço abdominal de um camundongo BALB/c, obtendo ascite, e então purificando um anticorpo PM-1 do ascite; ou cultivando-se o hibridoma em um meio apropriado (por exemplo, Meio de RPMI1640 que contém 10% de soro bovino fetal, e 5% de BM-Condimed H1 (Boehringer Mannheim); meio de SFM de hibridoma (GIBCO-BRL); meio de PFHM-II (GIBCO-BRL),

etc.) e então obtendo anticorpo PM-1 do sobrenadante de cultura.

[00072] Os anticorpos recombinantes podem ser usados como os anticorpos monoclonais da presente invenção, em que os anticorpos são produzidos usando técnicas de recombinação genéticas através de clonagem de um gene de anticorpo de um hibridoma, inserindo o gene em um vetor apropriado, e em seguida introduzindo o vetor em um hospedeiro (veja, por exemplo, Borrebaeck, C., A. K. e Larrick, J., W., *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, publicado no Reino Unido por Macmillan Publishers Ltd, 1990).

[00073] Mais especificamente, mRNAs que codificam para regiões variáveis de anticorpo (V) são isolados de células que produzem anticorpos de interesse, tal como hibridomas. mRNAs podem ser isolados preparando-se RNAs totais de acordo com métodos conhecidos, tal como o método de ultracentrifugação de guanidina (Chirgwin, J., M. e outros., *Biochemistry* (1979) 18, 5294-5299) e o método de AGPC (Chomczynski, P., e outros., *Anal. Biochem.* (1987) 162, 156-159), e preparando mRNAs usando o *Kit* de Purificação de mRNA (Pharmacia) e similar. Alternativamente, os mRNAs podem ser diretamente preparados usando um Kit de Purificação de mRNA QuickPrep (Pharmacia).

[00074] Os cDNAs das regiões de anticorpo V são sintetizados dos mRNAs obtidos usando transcriptase reversa. Os cDNAs podem ser sintetizados usando um Kit de Síntese de cDNA de Primeira Cepa de Transcriptase Reversa AMV e assim por diante. Além disso, para sintetizar e ampliar os cDNAs, o método de 5'-RACE (Frohman, M., A. e outros., *Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A.* (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A., e outros., *Nucleic Acids Res.* (1989) 17, 2919-2932) usando Kit RACE 5'-Ampli FINDER (Clontech) e PCR pode ser empregado. Um fragmento de DNA de interesse é purificado dos produtos de PCR obtidos e então ligado com um DNA de vetor. Então,

um vetor recombinante é preparado usando o DNA anterior e introduzido em *Escherichia coli* (*E. coli*) ou similar, e então suas colônias são selecionadas para preparar um vetor recombinante desejado. A sequência de nucleotídeo do DNA de interesse é confirmada, por exemplo, pelo método de dideoxi.

[00075] Quando um DNA que codifica a região V de um anticorpo de interesse é obtido, o DNA é ligado com um DNA que codifica uma região de anticorpo constante desejada (região C), e inserido em um vetor de expressão. Alternativamente, um DNA que codifica uma região de anticorpo V pode ser inserido em um vetor de expressão que compreende um DNA de uma região de anticorpo C.

[00076] Para produzir um anticorpo a ser usado na presente invenção, como descrito abaixo, um gene de anticorpo é inserido em um vetor de expressão tal que seja expresso sob do controle de uma região de regulamento de expressão, por exemplo, um realçador e promotor. Então, o anticorpo pode ser expresso transformando-se uma célula hospedeira com este vetor de expressão.

[00077] Na presente invenção, para reduzir a heteroantigenicidade contra os humanos e similares, os anticorpos recombinantes genéticos artificialmente modificados, por exemplo, anticorpos de quimérico, anticorpos humanizados, ou anticorpos humanos podem ser usados. Estes anticorpos modificados podem ser preparados usando métodos conhecidos.

[00078] Um anticorpo quimérico pode ser obtido através de ligação de um DNA que codifica uma região de anticorpo V, obtido como acima, com um DNA que codifica uma região de anticorpo C de humano, em seguida inserindo o DNA em um vetor de expressão e introduzindo isto em um hospedeiro para produção (veja, Publicação de Pedido de Patente Europeu No. EP 125023; Publicação de Pedido de Patente Internacional No. WO 92/19759). Este método conhecido

pode ser usado para obter anticorpos quiméricos úteis para a presente invenção.

[00079] Os anticorpos humanizados também são chamados anticorpos humanos reformados, e são anticorpos em que as regiões de determinação de complementaridade (CDRs) de um anticorpo de um mamífero diferente de humano (por exemplo, um anticorpo de camundongo) são transferidos nos CDRs de anticorpos humanos. Os métodos gerais para esta recombinação de gene também são conhecidos (veja, Publicação de Pedido de Patente Européia No. EP 125023, Publicação de Pedido de Patente Internacional No. WO 92/19759).

[00080] Mais especificamente, as sequências de DNA designadas tal como os CDRs de um anticorpo de camundongo são ligadas com as regiões de esqueleto (FRs) de um anticorpo humano são sintetizados por PCR de vários oligonucleotídeos produzidos para conter porções de sobreposição em sua terminação. O DNA obtido é ligado com um DNA de codificação de região de anticorpo C humano e em seguida inserido em um vetor de expressão. O vetor de expressão é introduzido em um hospedeiro para produzir o anticorpo humanizado (veja, Publicação de Pedido de Patente Europeu No. EP 239400, Publicação de Pedido de Patente Internacional No. WO 92/19759).

[00081] Os FRs de anticorpo humano a serem ligados pelos CDRs são selecionados de forma que os CDRs formem sítios de ligação de antígeno adequados. O aminoácido(s) nos FRs das regiões variáveis de anticorpo pode ser substituído quando necessário de forma que os CDRs do anticorpo humano reformado formem um sítio de ligação de antígeno apropriado (Sato, K., e outros., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

[00082] As regiões de anticorpo C humano são usadas para os anticorpos quiméricos e humanizados, e incluem C γ . Por exemplo,

Cy1, Cy2, Cy3, ou Cy4 pode ser usado. Além disso, para melhorar a estabilidade dos anticorpos ou sua produção, as regiões de anticorpo C humano podem ser modificadas.

[00083] Anticorpos quiméricos consistem na região variável de um anticorpo derivado de um mamífero não-humano e na região constante de um anticorpo derivados de um humano; anticorpos humanizados consistem nos CDRs de um anticorpo derivado de um mamífero não-humano e nas regiões de esqueleto e regiões constantes derivadas de um anticorpo humano. Ambos reduziram antigenicidade no corpo humano, e são desse modo, úteis como anticorpos para uso na presente invenção.

[00084] Os exemplos específicos preferidos de anticorpos humanizados para uso na presente invenção incluem o anticorpo PM-1 humanizado (veja, Publicação de Pedido de Patente Internacional No. WO 92/19759).

[00085] Além disso, além dos métodos acima mencionados para obter anticorpos humanos, técnicas para obtenção de anticorpos humanos por panicleação usando uma biblioteca de anticorpo humano também são conhecidas. Por exemplo, as regiões variáveis de anticorpos humanos podem ser expressas em superfícies de fago como anticorpos de cadeia única (scFv) usando o método de exibição de fago, e os fagos de ligação de antígeno podem então ser selecionados. Ao analisar os genes dos fagos selecionados, as sequências de DNA que codificam para as regiões variáveis de anticorpo humano que se ligam ao antígeno podem ser determinadas. Uma vez que a sequência de DNA de um scFv que se liga ao antígeno é revelada, um vetor de expressão apropriado que compreende a sequência pode ser construído para obter um anticorpo humano. Estes métodos já são conhecidos, e as publicações de WO 92/01047, WO 92/20791, WO93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438,

e WO 95/15388 podem ser usadas como referência.

[00086] Os genes de anticorpo construídos acima podem ser expressos de acordo com métodos convencionais. Quando uma célula de mamífero é usada, o gene de anticorpo pode ser expresso usando um DNA no qual o gene de anticorpo a ser expresso é funcionalmente ligado a um promotor geralmente usado útil e um sinal poli A a jusante do gene de anticorpo, ou um vetor que compreende o DNA. Os exemplos de um promotor/realçador incluem o promotor/realçador inicial imediato de citomegalovírus humano.

[00087] Além disso, outros promotores/realçadores que podem ser usados para expressar os anticorpos para uso na presente invenção incluem promotores/realçadores virais de retrovírus, vírus de poliomia, adenovírus, vírus símio 40 (SV40), e similares; e também inclui promotores/realçadores derivados de célula de mamífero tal como fator 1 α de alongamento humano (HEF1 α).

[00088] Por exemplo, quando o promotor/realçador de SV40 é usado, a expressão pode ser realizada facilmente seguindo o método de Mulligan e outros (Mulligan, R., C. e outros., *Nature* (1979) 277, 108-114). Alternativamente, no caso do promotor/realçador de HEF1 α , o método de Mizushima e outros (Mizushima, S., e Nagata S., *Nucleic Acid Res.* (1990) 18, 5322) pode ser usado.

[00089] Quando o *E. coli* é usado, um gene de anticorpo pode ser expresso funcionalmente ligando-se um promotor convencional, uma sequência de sinal para secreção de anticorpo, e o gene de anticorpo a ser expresso. Os exemplos do promotor incluem um promotor lacZ, o promotor araB e similares. Quando um promotor lacZ é usado, os genes podem ser expressos de acordo com o método de Ward e outros (Ward, E., S. e outros., *Nature* (1989) 341, 544-546; Ward, E., S. e outros., *FASEB J.* (1992) 6, 2422-2427); e o promotor araB pode ser usado de acordo com o método de Better e outros (Better, M. e

outros., Science (1988) 240, 1041-1043).

[00090] Quando o anticorpo é produzido no periplasma de *E. coli*, a sequência de sinal pel B (Lei, S., P. e outros., J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383) pode ser usada como uma sequência de sinal para secreção de anticorpo. Os anticorpos produzidos no periplasma são isolados, e em seguida usados após adequadamente reduplicar a estrutura de anticorpo (veja, por exemplo, WO 96/30394).

[00091] Como a origem de replicação, aqueles derivados de SV40, vírus de polioma, adenovírus, vírus de papilloma bovino (BPV) e similares podem ser usados. Além disso, para aumentar o número de cópia de gene em um sistema de célula hospedeira, o vetor de expressão pode compreender o gene de fosfotransferase de aminoglicosídeo (APH), gene de timidina cinase (TK), gene de xantina-guanina fosforribosiltransferase de *E. coli* (Ecogpt), gene de di-hidrofolato redutase (dhfr), ou tal como um marcador de seleção.

[00092] Qualquer sistema de produção pode ser usado para preparar os anticorpos para uso na presente invenção. Os sistemas de produção para preparação de anticorpo incluem sistemas de produção in vitro e in vivo. Os sistemas de produção in vitro incluem aqueles usando células eucarióticas ou células procarióticas.

[00093] Os sistemas de produção que usam células eucarióticas incluem aqueles usando células animais, células de planta, ou células de fungos. Tais células animais incluem (1) células de mamífero, por exemplo, CHO, COS, mieloma, rim de hamster bebê (BHK), HeLa, Vero, e similares; (2) células de anfíbio, por exemplo, oócitos de *Xenopus*; e (3) células de inseto, por exemplo, sf9, sf21, Tn5, e similares. As células de planta conhecidas incluem células derivadas de *Nicotiana tabacum*, que pode ser cultivada como um calo. As células de fungo conhecidas incluem levedura tal como *Saccharomyces* (por exemplo, *S. cerevisiae*), fungos de bolor como

Aspergillus (por exemplo, *A. niger*), e similares.

[00094] Os sistemas de produção que usam células procarióticas incluem aqueles usando células bacterianas. As células bacterianas conhecidas incluem o *E. coli* e *Bacillus subtilis*.

[00095] Os anticorpos podem ser obtidos usando transformação para introduzir um gene de anticorpo de interesse nestas células, e então cultivando as células transformadas *in vitro*. As culturas são conduzidas de acordo com métodos conhecidos. Por exemplo, DMEM, MEM, RPMI1640, IMDM podem ser usados como o meio de cultura, e suplementos de soro tal como FCS podem ser usados em combinação. Além disso, as células introduzidas com genes de anticorpo podem ser transferidas na poço abdominal ou tal de um animal para produzir os anticorpos *in vivo*.

[00096] Por outro lado, os sistemas de produção *in vivo* incluem aqueles usando animais ou plantas. Os sistemas de produção que usam animais incluem aqueles que usam mamíferos ou insetos.

[00097] Os mamíferos que podem ser usados incluem cabras, porcos, ovelha, camundongos, bovino e similares (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). Além disso, os insetos que podem ser usados incluem bicho-da-seda. Ao usar plantas, tabaco pode ser usado, por exemplo.

[00098] Um gene de anticorpo é introduzido nestes animais ou plantas, o anticorpo é produzido no corpo dos animais ou plantas, e este anticorpo é então recuperado. Por exemplo, um gene de anticorpo pode estar preparado como um gene de fusão inserindo-o no meio de um gene que codifica uma proteína tal como caseína- β de cabra, que é produzida exclusivamente no leite. Os fragmentos de DNA compreendendo o gene de fusão, que incluem o gene de anticorpo, são injetados em embriões de cabra, e os embriões são introduzidos em cabras fêmeas. O anticorpo desejado é obtido de leite

produzido pelos animais transgênicos nascidos das cabras que receberam os embriões, ou produzidos de progênie destes animais. Às cabras transgênicas podem ser dadas hormônios para aumentar o volume de leite que contém o anticorpo desejado que elas produzem (Ebert, K., M. e outros., Bio/Technology (1994) 12, 699-702).

[00099] Quando bicho-da-seda é usado, os bichos-da-seda são infectados com um baculovírus inserido com um gene de anticorpo desejado, e o anticorpo desejado é obtido dos fluidos de corpo destes bichos-da-seda (Maeda, S., e outros., Nature (1985) 315, 592-594). Além disso, quando tabaco é usado, o gene de anticorpo desejado é inserido em um vetor de expressão de planta (por exemplo, pMON530) e o vetor é introduzido em bactérias tal como *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bactéria é usada para infectar tabaco (por exemplo, *Nicotiana tabacum*) tal que os anticorpos desejados possam ser obtidos das folhas deste tabaco (Juliano, K. -O C. Ma e outros, Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138).

[000100] Ao produzir anticorpos usando sistemas de produção *in vitro* ou *in vivo*, como descritos acima, os DNAs que codificam uma cadeia leve (cadeia L) e cadeia pesada (cadeia H) de anticorpo podem ser inseridos em vetores de expressão separados e um hospedeiro é então cotransformado com os vetores. Alternativamente, os DNAs podem ser inseridos em um único vetor de expressão para transformar um hospedeiro (veja Publicação de Pedido de Patente Internacional No. WO 94/11523).

[000101] Os anticorpos usados na presente invenção podem ser fragmentos de anticorpo ou produtos modificados dos mesmos, contanto que eles possam ser adequadamente usados na presente invenção. Por exemplo, os fragmentos de anticorpo incluem Fab, F(ab ')₂, Fv, e Fv de cadeia única (scFv), em que os Fvs das cadeias H e L são unidos por um ligador apropriado.

[000102] Especificamente, os fragmentos de anticorpo são produzidos tratando-se os anticorpos com enzimas, por exemplo, papaína ou pepsina, ou alternativamente, genes que codificam estes fragmentos são construídos, introduzidos em vetores de expressão, e estes são expressos em células hospedeiras apropriadas (veja, por exemplo, Co, M., S. e outros., 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., e outros., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-666; Bird, R., E. e outros., TIBTECH (1991) 9, 132-137).

[000103] Um scFv pode ser obtido unindo-se a região V de cadeia H e região V de cadeia L de um anticorpo. No scFv, a região V de cadeia H e a região V de cadeia L são unida por um ligador, preferivelmente por um ligador de peptídeo (Huston, J., S. e outros., Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. (1988) 85, 5879-5883). As regiões V das cadeias H e L em um scFv podem ser derivadas de quaisquer dos anticorpos descritos acima. Os ligadores de peptídeo para união das regiões V incluem, por exemplo, peptídeos de cadeia única arbitrários que consistem em 12 a 19 resíduos de aminoácido.

[000104] Um DNA de codificação de scFv pode ser obtido usando um DNA que codifica uma cadeia H ou uma região V e um DNA codificando uma cadeia L ou uma região V dos anticorpos acima mencionado como modelos, usando PCR para ampliar uma porção de DNA que codifica a sequência de aminoácido desejada na sequência modelo e usa iniciadores que definem a terminação da porção, e além disso então ampliando a porção de DNA ampliada com um DNA que codifica uma porção de ligador de peptídeo e pares de iniciadores que unem ambas terminações do ligador a cadeia H e cadeia L.

[000105] Uma vez que um DNA de codificação de scFv foi obtido, um

vetor de expressão que compreende o DNA e um hospedeira transformado com o vetor pode ser obtido de acordo com métodos convencionais. Além disso, scFv pode ser obtido de acordo com métodos convencionais que usam o hospedeiro.

[000106] Como acima, estes fragmentos de anticorpo podem ser produzidos do hospedeiro obtendo-se e expressando-se seus genes. Aqui, um "anticorpo" abrange tais fragmentos de anticorpo.

[000107] Os anticorpos ligados a várias moléculas, tal como polietileno glicol (PEG), também podem ser usados como anticorpos modificados. Aqui, um "anticorpo" abrange tais anticorpos modificados. Estes anticorpos modificados podem ser obtidos quimicamente modificando-se os anticorpos obtidos. Tais métodos já são estabelecidos na técnica.

[000108] Os anticorpos produzidos e expressos como acima podem ser isolados do interior ou exterior das células ou dos hospedeiros, e em seguida purificados para homogeneidade. Os anticorpos para uso na presente invenção podem ser isolados e/ou purificados usando cromatografia de afinidade. As colunas a serem usadas para a cromatografia de afinidade incluem, por exemplo, colunas de proteína A e colunas de proteína G. Os veículos usados para as colunas de proteína A incluem, por exemplo, HyperD, POROS, Sepharose FF e similares. Além dos anteriores, outros métodos usados para a purificação e/ou isolamento de proteínas comuns podem ser usados, e não estão limitados de qualquer forma.

[000109] Por exemplo, os anticorpos usados para a presente invenção podem ser isolados e/ou purificados adequadamente selecionando e combinando cromatografias além da cromatografia de afinidade, filtros, ultrafiltração, precipitação por saturação, diálise, e similares. As cromatografias incluem, por exemplo, cromatografia de permuta de íon, cromatografia hidrofóbica, filtração de gel, e similares.

Estas cromatografias podem ser aplicadas a cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC). Alternativamente, HPLC de fase reversa pode ser usada.

[000110] A concentração dos anticorpos obtidos como acima pode ser determinada por medição de absorbância, ELISA, ou similares. Especificamente, absorbância é determinada adequadamente diluindo a solução de anticorpo com PBS (-), medindo a absorbância em 280 nm, e calculando a concentração ($1,35 \text{ OD} = 1 \text{ mg/ml}$). Alternativamente, quando usando ELISA, a medição pode ser realizada como segue: especificamente, 100 µl de IgG anti-humano de cabra (TAG) diluídos para 1 µg/ml com 0,1 M de tampão de bicarbonato (pH 9,6) são adicionados a uma placa de 96 poços (Nunc) e incubados durante a noite a 4°C para imobilizar o anticorpo. Após bloqueio, 100 µl de um anticorpo adequadamente diluído da presente invenção ou uma amostra adequadamente diluída que compreenda o anticorpo, e IgG humano (CAPPEL) são adicionados como um padrão, e incubados durante uma hora em temperatura ambiente.

[000111] Após lavagem, 100 µl de IgG anti-humano rotulado por alcalino fosfatase diluído 5.000x (BIO SOURCE) são adicionados e incubados durante uma hora em temperatura ambiente. Após outra lavagem, a solução de substrato é adicionada e incubada, e a absorbância em 405 nm é medida usando um Leitor de Microplaca Modelo 3550 (Bio-Rad) para calcular a concentração do anticorpo de interesse.

[000112] Os variantes de IL-6 usados na presente invenção são substâncias com a atividade de ligação a um receptor de IL-6 e que não transmitem atividade biológica de IL-6. Isto é, os variantes de IL-6 competem com IL-6 para se ligar aos receptores de IL-6, porém deixam de transmitir atividade biológica de IL-6, e consequentemente bloqueiam a transdução de sinal mediada por IL-6.

[000113] Os variantes de IL-6 são produzidos introduzindo-se mutações(s) substituindo-se resíduos de aminoácido na sequência de aminoácido de IL-6. A origem de IL-6 usada como a base dos variantes de IL-6 não estão limitadas, porém são preferivelmente IL-6 humana em atenção a antigenicidade e tais.

[000114] Mais especificamente, as substituições de aminoácido são realizadas predizendo a estrutura secundária da sequência de aminoácido de IL-6 usando programas conhecidos de modelagem molecular (por exemplo, WHATIF; Vriend e outros, J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56), e também avaliando a influência do resíduo(s) de aminoácido substituído na molécula inteira. Após determinar o resíduo de aminoácido apropriado a ser substituído, métodos de PCR geralmente realizados são realizados usando uma sequência de nucleotídeo que codifica um gene de IL-6 humana como um modelo, e mutações são introduzidas para causar substituições de aminoácidos, e desse modo os genes que codificam variantes de IL-6 são obtidos. Se necessário, este gene é inserido em um vetor de expressão apropriado, e o variante de IL-6 pode ser obtido aplicando-se os métodos acima mencionados para expressão, produção, e purificação de anticorpos recombinantes.

[000115] Os exemplos específicos dos variantes de IL-6 são descritos em Brakenhoff e outros, J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93, Savino e outros, EMBO J. (1994) 13, 1357-1367, WO 96/18648, e WO 96/17869.

[000116] Os peptídeos parciais de IL-6 e do receptor de IL-6 a ser usado na presente invenção são substâncias com a atividade de ligação ao receptor de IL-6 e a IL-6, respectivamente, e que não transmitem a atividade biológica de IL-6. Isto é, ligando e capturando um receptor de IL-6 ou IL-6, os peptídeos parciais de IL-6 ou peptídeos parciais de receptor de IL-6 especificamente podem inibir IL-6 de de

ligar ao receptor de IL-6. Como resultado, a atividade biológica de IL-6 não é transmitida, e a transdução de sinal mediada por IL-6 é bloqueada.

[000117] Os peptídeos parciais de IL-6 ou receptor de IL-6 são peptídeos que compreendem parte ou toda sequência de aminoácido da região da sequência de aminoácido de IL-6 ou receptor de IL-6 que está envolvida na ligação entre a IL-6 e o receptor de IL-6. Tais peptídeos normalmente compreendem dez a 80, preferivelmente 20 a 50, mais preferivelmente 20 a 40 resíduos de aminoácido.

[000118] Os peptídeos parciais de IL-6 ou peptídeos parciais de receptor de IL-6 podem ser produzidos de acordo com métodos geralmente conhecidos, por exemplo, técnicas de engenharia genéticas ou métodos de síntese de peptídeo, especificando-se a região da sequência de aminoácido de IL-6 ou receptor de IL-6 que está envolvida na ligação entre a IL-6 e o receptor de IL-6, e usando uma porção ou totalidade da sequência de aminoácido da região especificada.

[000119] Ao preparar um peptídeo parcial de IL-6 ou peptídeo parcial de receptor de IL-6 usando os métodos de engenharia genética, uma sequência de DNA que codifica o peptídeo desejado é inserida em um vetor de expressão, e então o peptídeo pode ser obtido aplicando-se os métodos acima mencionados para expressar, produzir, e purificar anticorpos recombinantes.

[000120] Ao produzir um peptídeo parcial de IL-6 ou peptídeo parcial de receptor de IL-6 usando métodos de síntese de peptídeo, os métodos de síntese de peptídeo geralmente usados, por exemplo, métodos de síntese de fase sólida ou métodos de síntese de fase líquidos, podem ser usados.

[000121] Especificamente, os peptídeos podem ser sintetizados de acordo com o método descrito em Continuation of Development of

Pharmaceuticals, Vol. 14, Peptide Synthesis (em japonês) (ed. Haruaki Yajima, 1991, Hirokawa Shoten)". Como um método de síntese de fase sólida, por exemplo, o seguinte método pode ser empregado: o aminoácido que corresponde a terminação C do peptídeo a ser sintetizado é ligado a um suporte que é insolúvel em solventes orgânicos, em seguida a cepa de peptídeo é alongada repetindo-se alternadamente (1) a reação de condensar os aminoácidos, cujos grupos α -aminos e grupos funcionais de cadeia ramificada são protegidos com grupos de proteção apropriados, um de cada vez em uma direção de terminal C a N; e (2) a reação de remover os grupos de proteção dos grupos α -aminos dos peptídeos ou aminoácidos ligados a resina. A síntese de peptídeo de fase sólida é classificada amplamente no método Boc e no método Fmoc, dependendo do tipo de grupos de proteção usados.

[000122] Após sintetizar uma proteína de interesse como acima, as reações de desproteção são realizadas, em seguida a cepa de peptídeo é clivada de seu suporte. Para a reação de clivagem de cepa de peptídeo, o fluoreto de hidrogênio ou ácido sulfônico de trifluorometano é geralmente usado para o método de Boc, e TFA é geralmente usado para o método de Fmoc. No método de Boc, por exemplo, a resina de peptídeo protegida supracitada é tratada com fluoreto de hidrogênio na presença de anisol. Em seguida, o peptídeo é recuperado removendo-se os grupos de proteção e clivando-se o peptídeo de seu suporte. Ao liofilizar o peptídeo recuperado, um peptídeo bruto pode ser obtido. No método de Fmoc, por outro lado, a reação de desproteção e a reação para clivar a cepa de peptídeo do suporte podem ser realizadas em TFA usando um método semelhante àqueles descritos acima, por exemplo.

[000123] Os peptídeos brutos obtidos podem ser separados e/ou purificados aplicando-se HPLC. A eluição pode ser realizada sob

condições ideais usando um sistema de solvente de água-acetonitrila que é geralmente usado para purificação de proteína. As frações que correspondem aos picos do perfil cromatográfico obtido são coletadas e liofilizadas. Desse modo, as frações de peptídeo purificadas são identificadas por análise de peso molecular por análise de espectro de massa, análise de composição de aminoácido, análise de sequência de aminoácido, ou similares.

[000124] Os exemplos específicos de peptídeos parciais de IL-6 e peptídeos parciais de receptor de IL-6 são descritos em JP-A (Kokai) H02-188600, JP-A (Kokai) H07-324097, JP-A (Kokai) H08-311098, e Publicação Patente dos Estados Unidos No. EUA 5210075.

[000125] Os anticorpos usados na presente invenção também podem ser anticorpos conjugados que são ligados a várias moléculas, como polietileno glicol (PEG), substâncias radioativas, e toxinas. Tais anticorpos conjugados podem ser obtidos quimicamente modificando os anticorpos obtidos. Os métodos para modificar os anticorpos já são estabelecidos na técnica. Os "anticorpos" da presente invenção abrangem estes anticorpos conjugados.

[000126] Os agentes da presente invenção para suprimir reação de rejeição crônica, que compreende inibidores de IL-6 como ingredientes ativos, podem ser usados para tratar reação de rejeição crônica. A presente invenção também fornece os agentes para suprimir reação de rejeição crônica em transplante de coração, que compreende um inibidor de IL-6 como ingrediente ativo.

[000127] Uma reação de rejeição que é suprimida pelos agentes de supressão da presente invenção é preferivelmente a reação de rejeição crônica, que é um problema na medicina de transplante atual. A reação de rejeição crônica é uma complicação caracterizada pelo espessamento da íntima de vasos sanguíneos e fibroses de interstício, que se tornam problemáticos após um ano pós-transplante e afeta a

prognose a longo prazo de recipientes. A reação de rejeição crônica progride gradualmente até mesmo depois da reação de rejeição aguda ter sido superada clinicamente.

[000128] Os presentes inventores descobriram previamente o efeito terapêutico de inibidores de IL-6 em um modelo de camundongo para rejeição aguda pós-transplante de coração (WO2007/058194). O mecanismo para condições patológicas da reação de rejeição aguda principalmente mediada por células T citotóxicas é assumido ser diferente daquele da reação de rejeição crônica. Evidências específicas que sugerem que a reação de rejeição crônica seja diferente da reação de rejeição aguda é como segue:

(1) a reação de rejeição crônica é uma condição patológica específica com crescimento de célula, tal como fibroses de interstício e lesão de estenose devido ao espessamento da íntima em tecidos luminais de órgãos transplantados;

(2) o começo da reação de rejeição crônica não pode ser suprimido por terapia imunossupressiva convencional que é eficaz na supressão da reação de rejeição aguda;

(3) a reação de rejeição crônica é uma resposta imunológica que de modo latente progride até mesmo depois que a rejeição aguda é superada clinicamente; e

(4) a reação de rejeição crônica tem fatores de risco característicos do seu começo.

(1) As lesões estenóticas vasculares acompanhadas pelo crescimento de células do músculo liso vasculares causadas por lesão endotelial vascular são conhecidas por serem uma característica de aspecto histopatológico da reação de rejeição crônica. Tais lesões estenóticas vasculares também são chamadas lesões vasculares pós-transplante ou arteriosclerose pós-transplante. Estes resultados em distúrbios circulatórios devido ao fluxo de sangue prejudicado em

órgãos transplantados, e aos órgãos transplantados, deixam de funcionar. Desse modo, as lesões estenóticas vasculares se tornaram problemáticas como uma complicação séria na fase crônica. As causas de danos vasculares em órgãos transplantados incluem distúrbios de reperfusão de isquemia, tensão oxidativa, e a reação de rejeição aguda em cirurgia de transplante. Desse modo, alguns resultados bem sucedidos realmente foram alcançados suprimindo a reação de rejeição crônica por causa do avanço de técnicas para suprimir a reação de rejeição aguda e mantendo os órgãos na fase aguda. Porém, nenhum método preventivo definitivo esteve disponível. Além disso, (2) não há nenhuma terapia imunossupressiva estabelecida eficazes para a reação de rejeição crônica. (3) a reação de rejeição de progressão latente inclui prolongação de imunidade humoral mediada por isoanticorpos e prolongação de uma variedade de imunidade celular mediada por infiltração de macrófagos e várias citocinas. (4) Sabe-se que uma variedade de fatores de risco está envolvida na reação de rejeição crônica, incluindo os efeitos colaterais de imunossupressores, fatores genéticos, infecção pós-transplante (citomegalovírus e similares), e deposição de anticorpos em tecidos como também fatores de risco comuns para arteriosclerose (diabete, hiperlipidemia, hipertensão) em recipientes. Desse modo, a disfunção de órgãos transplantados é suposta ocorrer devido à participação complicada de vários fatores.

[000129] Na presente invenção, "supressão de reação de rejeição crônica após transplante" refere-se à supressão dos vários sintomas descritos acima associados com a reação de rejeição crônica, tal como fibroses de interstício e estenose devido ao espessamento da íntima de tecidos luminiais em órgãos transplantados.

[000130] Os tipos de transplantes de órgão para os quais os agentes de supressão da presente invenção podem ser usados não são

particularmente limitados, e órgãos preferidos para os transplantes de órgão na presente invenção incluem órgãos parenquimatosos, tais como corações, fígados, rins, pâncreas, pulmões, e intestinos delgados. A presente invenção também pode ser aplicada a transplante de tecidos tal como válvulas cardíacas, vasos, pele, ossos, e córneas.

[000131] Na presente invenção, a atividade de inibidores de IL-6 inibindo a transdução de sinais de IL-6 pode ser avaliada através de métodos convencionais. Especificamente, IL-6 é adicionado às culturas de linhagens de célula de mieloma humano dependente de IL-6 (S6B45 e KPMM2), linhagem de célula de linfoma T de Lennert humano KT3, ou linhagem de célula dependente de IL-6 MH60.BSF2; e a captação de 3H-timidina pelas células dependentes de IL-6 é medida na presença de um inibidor de IL-6. Alternativamente, as células de U266 de expressão de receptor de IL-6 são cultivadas, e IL-6 rotulada por 125I e um inibidor de IL-6 são adicionados ao mesmo tempo à cultura; e em seguida a IL-6 rotulada por 125I ligada às células de expressão de receptor de IL-6 é quantificada. Além do grupo inibidor de IL-6, um grupo de controle negativo que não contém um inibidor de IL-6 é incluído no sistema de ensaio descrito acima. A atividade do inibidor de IL-6 para inibir IL-6 pode ser avaliada comparando-se os resultados de ambos os grupos.

[000132] Além disso, se uma reação de rejeição pós-transplante é suprimida, ela pode ser avaliada como segue: em transplante de órgão, a "supressão de lesão pós-transplante" também pode ser suposta ser alcançado quando a sobrevivência de enxerto for melhorada como resultado. A sobrevivência de enxerto pode ser avaliada com base se cada órgão funciona normalmente após transplante.

[000133] Como descrito nos Exemplos abaixo, a reação de rejeição

crônica em transplante de coração foi demonstrada ser suprimida administrando um anticorpo de receptor anti-IL-6. Isto sugere que os inibidores de IL-6 tais como anticorpos de receptor de anti-IL-6 são úteis como agentes para suprimir a reação de rejeição crônica.

[000134] Os pacientes a serem administrados com os agentes de supressão da presente invenção são mamíferos. Os mamíferos são preferivelmente os humanos.

[000135] Os agentes suprimidos da presente invenção podem ser administrados como farmacêuticos, e podem ser administrados sistematicamente ou localmente por administração oral ou parenteral. Por exemplo, as injeções intravenosas tal como infusões por gotejamento, injeções intramusculares, injeções intraperitoneais, injeções subcutâneas, supositórios, enemas, comprimidos entéricos orais, ou similares podem ser selecionados. Os métodos de administração apropriados podem ser selecionados dependendo da idade e sintomas de um paciente. A dose eficaz por administração é selecionada da faixa de 0,01 a 100 mg/kg de peso corpóreo. Alternativamente, a dose pode ser selecionada da faixa de 1 a 1000 mg/paciente, preferivelmente da faixa de 5 a 50 mg/paciente. Uma dose preferida e método de administração são como segue: por exemplo, quando um anticorpo de receptor anti-IL-6 é usado, a dose eficaz é uma quantidade tal que o anticorpo livre esteja presente no sangue. Especificamente, uma dose de 0,5 a 40 mg/kg de peso corpóreo/mês (quatro semanas), preferivelmente 1 a 20 mg/kg de peso corpóreo/mês é administrada por uma injeção intravenosa tal como uma infusão por gotejamento, injeção subcutânea ou similares, uma vez a várias vezes por mês, por exemplo, duas vezes por semana, uma vez por semana, uma vez a cada duas semanas, ou uma vez a cada quatro semanas. O horário de administração pode ser ajustado, por exemplo, prolongando-se o intervalo de administração de duas

vezes por semana ou uma vez por semana a uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas, ou uma vez a cada quatro semanas, enquanto monitorando a condição após transplante e mudanças nos valores do exame de sangue.

[000136] Na presente invenção, os agentes de supressão podem conter veículos farmacologicamente aceitáveis, tal como preservativos e estabilizadores. Os "veículos farmacologicamente aceitáveis" referem-se aos materiais que podem ser coadministrados com um agente descrito acima; e eles próprios podem ou não produzir o efeito descrito acima de suprimir reação de rejeição crônica. Alternativamente, os veículos podem ser materiais que não têm o efeito de suprimir reação de rejeição crônica, porém que produzem um efeito estabilizante adicional ou sinérgico quando usado em combinação com um inibidor de IL-6.

[000137] Tais materiais farmacologicamente aceitáveis, incluem, por exemplo, água estéril, salina fisiológica, estabilizadores, excipientes, tampões, preservativos, tensoativos, agentes de quelação (EDTA e similares), e aglutinantes.

[000138] Na presente invenção, os tensoativos incluem tensoativos não-iônicos, e exemplos típicos de tais incluem ésteres de ácido graxo de sorbitan tal como monocaprilato de sorbitan, monolaurato de sorbitan, e monopalmitato de sorbitan; ésteres de ácido graxo de glicerina tal como monocaprilato de glicerina, monomiristato de glicerina e monoestearato de glicerina; ésteres de ácido graxo de poliglicerina tal como monoestearato de decaglicerila, distearato de decaglicerila, e monolinoleato de decaglicerila; ésteres de ácido graxo de sorbitan de polioxietileno tal como monolaurato de sorbitan de polioxietileno, mono-oleato de sorbitan de polioxietileno, monoestearato de sorbitan de polioxietileno, monopalmitato de sorbitan de polioxietileno, trioleato de sorbitan de polioxietileno, e

triestearato de sorbitan de polioxietileno; ésteres de ácido graxo de sorbitol de polioxietileno tais como tetraestearato de sorbitol de polioxietileno e tetraoleato de sorbitol de polioxietileno; ésteres de ácido graxo de glicerina de polioxietileno tal como monoestearato de glicerila de polioxietileno; ésteres de ácido graxo de polietileno glicol tais como diestearato de polietileno glicol; éteres de alquila de polioxietileno tal como éter de laurila de polioxietileno; éteres de alquila de polioxipropileno de polioxietileno tal como polioxietileno polioxipropileno glicol, éter de propila de polioxipropileno de polioxietileno, e éter de cetila de polioxipropileno de polioxietileno; éteres de fenila de alquila de polioxietileno tal como éter de nonilfenila de polioxietileno; óleos de rícino hidrogenados de polioxietileno tal como óleo de rícino de polioxietileno e óleo de rícino hidrogenado de polioxietileno (óleo de rícino hidrogenado de polioxietileno); derivados de cera de abelha de polioxietileno tal como cera de abelha de sorbitol de polioxietileno; derivados de lanolina de polioxietileno tal como lanolina de polioxietileno; e amidas de ácido graxo de polioxietileno e similares com um HLB de seis a 18, tal como amida de ácido esteárico de polioxietileno.

[000139] Os tensoativos também incluem tensoativos aniônicos, e exemplos típicos de tais incluem, por exemplo, alquilsulfatos tendo um grupo alquila com dez a 18 átomos de carbono, tal como cetilsulfato de sódio, laurilsulfato do sódio, e oleilsulfato de sódio; sulfatos de éter de alquila de polioxietileno nos quais o grupo alquila tem dez a 18 átomos de carbono e o número molar médio de óxido de etileno adicionado é 2 a 4, tal como sulfato de laurila de polioxietileno de sódio; sais de éster de sulfossucinato de alquila tendo um grupo alquila com oito a 18 átomos de carbono, tal como éster de sulfossucinato de laurila de sódio; tensoativos naturais, por exemplo, lecitina; glicerofosfolipídeos; esfingo-fosfolipídeos tais como esfingomielina; e ésteres de ácido

graxo de sacarose nos quais os ácidos graxos têm 12 a 18 átomos de carbono.

[000140] Um, dois ou mais dos tensoativos descritos acima podem ser combinados e adicionados aos agentes da presente invenção. Os tensoativos que são preferivelmente usados nas preparações da presente invenção incluem ésteres de ácido graxo de sorbitan de polioxietileno, tais como polissorbato 20, 40, 60, e 80. Os polissorbato 20 e 80 são particularmente preferidos. Os polioxietileno polioxipropileno glicóis, tais como poloxâmero (Pluronic F-68® e outros), também são preferidos.

[000141] A quantidade de tensoativo adicionado varia, dependendo do tipo de tensoativo usado. Quando polissorbato 20 ou 80 é usado, a quantidade é em geral na faixa de 0,001 a 100 mg/ml, preferivelmente na faixa de 0,003 a 50 mg/ml, mais preferivelmente na faixa de 0,005 a 2 mg/ml.

[000142] Na presente invenção, os tampões incluem tampão de fosfato, citrato, ácido acético, ácido málico, ácido tartárico, ácido sucínico, ácido láctico, fosfato de potássio, ácido glicônico, ácido cáprico, ácido deoxicólico, ácido salicílico, trietanolamina, ácido fumárico, e outros ácidos orgânicos; e tampão de ácido carbônico, tampão Tris, tampão de histidina, e tampão de imidazol.

[000143] As preparações líquidas podem ser formuladas dissolvendo-se os agentes em tampões aquosos conhecidos no campo de preparação líquida. A concentração de tampão é em geral na faixa de 1 a 500 mM, preferivelmente na faixa de 5 a 100 mM, mais preferivelmente na faixa de 10 a 20 mM.

[000144] Os agentes da presente invenção também podem compreender outros polipeptídeos de peso molecular baixo; proteínas tal como albumina de soro, gelatina, e imunoglobulina; aminoácidos; açúcares e carboidrato tal como polissacarídeos e monossacarídeos,

alcoóis de açúcar, e similares.

[000145] Aqui, os aminoácidos incluem aminoácidos básicos, por exemplo, arginina, lisina, histidina, e ornitina, e sais inorgânicos destes aminoácidos (preferivelmente sais de cloridrato, e sais de fosfato, isto é aminoácidos de fosfato). Quando aminoácidos livres são usados, o pH é ajustado para um valor preferido adicionando-se substâncias de tamponamento fisiologicamente aceitáveis apropriadas, por exemplo, ácidos inorgânicos, e em particular ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido acético, e ácido fórmico, e sais destes. Neste caso, o uso de fosfato é particularmente benéfico porque estabelece produtos liofilizados totalmente estáveis. Fosfato é particularmente vantajoso quando preparações substancialmente não contêm ácidos orgânicos, tal como ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido sucínico, e ácido fumárico, ou não contêm ânions correspondentes (íon de malato, íon de tartarato, íon de citrato, íon de succinato, íon de fumarato, e similares). Os aminoácidos preferidos são arginina, lisina, histidina, e ornitina. Os aminoácidos ácidos também podem ser usados, por exemplo, ácido glutâmico e ácido aspártico, e sais destes (preferivelmente sais de sódio); aminoácidos neutros, por exemplo, isoleucina, leucina glicina, serina, treonina, valina, metionina, cisteína, e alanina; e aminoácidos aromáticos, por exemplo, fenilalanina, tirosina, triptofano, e seus derivados, triptofano de N-acetila.

[000146] Aqui, os açúcares e carboidratos tal como polissacarídeos e monossacarídeos incluem, por exemplo, dextrana, glicose, frutose, lactose, xilose, manose, maltose, sacarose, trealose, e rafinose.

[000147] Aqui, os alcoóis de açúcar incluem, por exemplo, manitol, sorbitol, e inositol.

[000148] Quando os agentes da presente invenção são preparados como soluções aquosas para injeção, os agentes podem ser misturados com, por exemplo, salina fisiológica, e/ou solução isotônica

contendo glicose ou outros agentes auxiliares (tal como D-sorbitol, D-manose, D-manitol, e cloreto de sódio). As soluções aquosas podem ser usadas em combinação com agentes solubilizantes apropriados tal como alcoóis (etanol e outros), poliálcoois (propileno glicol, PEG, e outros), ou tensoativos não-iônicos (polissorbato 80 e HCO-50).

[000149] Os agentes podem também compreender, se requerido, diluentes, solubilizantes, ajustadores de pH, agentes calmantes, agentes de redução contendo enxofre, antioxidantes, e outros.

[000150] Aqui, os agentes de redução contendo enxofre incluem, por exemplo, compostos compreendendo grupos sulfidril, tais como N-acetilcisteína, N-acetilomocisteína, ácido tiótico, tioglicol, tioetanolamina, tioglicerol, tiossorbitol, ácido tioglicólico e sais destes, tiossulfato de sódio, glutatona, e ácidos tioalcanóicos tendo um a sete átomos de carbono.

[000151] Além disso, os antioxidantes na presente invenção incluem, por exemplo, ácido eritórlico, tolueno de dibutildróxi, anisol de butildróxi, α -tocoferol, acetato de tocoferol, ácido L-ascórbico e sais dos mesmos, palmitato de ácido L-ascórbico, estearato de ácido L-ascórbico, sulfito de hidrogênio de sódio, sulfito de sódio, galato de triamila, galato de propila, e agentes de quelação tal como tetraacetato de etilenodiamina de dissódio (EDTA), pirofosfato de sódio, e metafosfato de sódio.

[000152] Se requerido, os agentes podem ser encapsulados em microcápsulas (microcápsulas de hidroximetilcelulose, gelatina, ácido poli[metilmetacrílico] ou similares) ou preparados como sistemas de liberação de fármaco coloidais (lipossoma, microesferas de albumina, microemulsão, nano-partículas, nano-cápsulas, e similares) (veja "Remington's Pharmaceutical Science 16ª edição", Oslo Ed., 1980, e outros). Além disso, os métodos para preparar os agentes como agentes de liberação prolongada também são conhecidos, e são

aplicáveis à presente invenção (Langer e outros, J. Biomed. Mater. Res. (1981) 15, 167-277; Langer, Chem. Tech. (1982) 12, 98-105; Patente dos Estados Unidos No. 3.773.919; Pedido de Patente Europeu No. (EP) 58.481; Sidman e outros, Biopolymers (1983) 22, 547-556; e EP 133,988).

[000153] Os veículos farmacologicamente aceitáveis usados são selecionados adequadamente daqueles descritos acima ou combinados dependendo do tipo de forma de dosagem, porém não estão limitados a estes.

[000154] A presente invenção refere-se aos métodos para suprimir a reação de rejeição crônica, que compreende a etapa de administrar inibidores de IL-6 aos pacientes.

[000155] A presente invenção também refere-se aos métodos para suprimir a reação de rejeição crônica em transplante de coração, que compreende a etapa de administrar inibidores de IL-6 aos pacientes.

[000156] Aqui, o "paciente" refere-se aos organismos ou partes do corpo do organismo a serem administrados com um inibidor de IL-6 da presente invenção. Os organismos incluem animais (por exemplo, espécies de animal humanas, domésticas, e animais selvagens), porém não estão particularmente limitados. As "partes de corpo de organismo" não estão limitadas particularmente.

[000157] Aqui, "administração" inclui administração oral e parenteral. Administração oral inclui, por exemplo, administração de agentes orais. Tais agentes orais incluem, por exemplo, grânulos, pós, comprimidos, cápsulas, soluções, emulsões, e suspensões.

[000158] Administração parenteral inclui, por exemplo, administração de injeções. Tais injeções incluem, por exemplo, injeções intravenosas, injeções subcutâneas, injeções intramusculares, e injeção intraperitoneal. Enquanto isso, os efeitos dos métodos da presente invenção podem ser obtidos introduzindo-se os genes que

compreendem oligonucleotídeos a serem administrados a corpos vivos usando técnicas de terapia de gene. Alternativamente, os agentes da presente invenção podem ser administrados localmente a áreas pretendidas de tratamento. Por exemplo, os agentes podem ser administrados através de injeção local durante cirurgia, uso de cateteres, ou liberação de gene alvejado de DNAs que codificam os peptídeos da presente invenção.

[000159] Os agentes de supressão da presente invenção podem ser administrados a pacientes antes de transplante de órgão, na hora de transplante de órgão, ou após transplante de órgão. Além disso, os agentes de supressão podem ser administrados uma vez ou repetidamente.

[000160] Alternativamente, quando administrado a uma parte excisada ou liberada de um organismo, os agentes de supressão da presente invenção podem ser "contatados" com a parte do organismo.

[000161] Na presente invenção, o "contato" é realizado de acordo com a condição do organismo. Os exemplos incluem pulverizar os agentes de supressão da presente invenção sobre as partes do organismo, e adicionando os agentes de supressão da presente invenção para partes de organismo esmagadas, porém não estão limitados aos mesmos. Quando a parte do organismo é célula cultivada, o "contato" supracitado pode ser obtido adicionando-se os agentes de supressão da presente invenção ao meio de cultura destas células, ou introduzindo-se os DNAs compreendendo oligonucleotídeos da presente invenção em células que constituem a parte do organismo.

[000162] Ao conduzir os métodos da presente invenção, os agentes da presente invenção podem ser administrados como partes de composições farmacêuticas em combinação com pelo menos um quimioterápico conhecido. Alternativamente, os agentes da presente

invenção podem ser administrados simultaneamente com pelo menos um imunossupressor conhecido. Em uma modalidade, os quimioterápicos conhecidos e os agentes de supressão da presente invenção podem ser administrados virtualmente simultaneamente.

[000163] Os agentes para suprimir a reação de rejeição crônica da presente invenção são preferivelmente administrados sistemicamente, porém pode ser administrado aos sítios de transplante de órgão após o órgão ter sido transplantado, ou podem ser administrados aos alvos ao mesmo tempo em que o órgão. Alternativamente, os agentes podem ser adicionados ao órgão ex vivo, antes do transplante.

[000164] Qualquer patente, os pedidos de patentes publicadas, e publicações citadas aqui estão incorporados por referência.

Breve Descrição dos Desenhos

[000165] Figura 1 mostra gráficos e fotografias que descrevem o resultado de uma comparação e avaliação com base nos escores de rejeição em seções histopatológicas dos corações transplantados 60 dias após transplante e a relação de área com fibroses.

[000166] Figura 2 mostra um gráfico e fotografias mostrando o resultado de análise para percentual de estenose vascular em lesões vasculares dos corações transplantados.

Exemplos

[000167] Aqui posteriormente, a presente invenção será especificamente descrita com referência aos Exemplos, porém não deve ser interpretado como estando limitado a isto.

[000168] Como doadores, os camundongos B6.C-H2^{bm12} foram comprados por Charles River Laboratories Japan Inc. de Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME) nos Estados Unidos. Como recipientes, os camundongos C57BL/6 foram comprados de Japan SLC, Inc. Há desequilíbrios de antígeno de MHC somente menores (desequilíbrio classe de II) entre as duas cepas de camundongo de forma que a

reação de rejeição aguda para corações transplantados não ocorra, ao mesmo tempo em que as características histopatológicas observadas durante dois meses após transplante são de acordo com aquelas da reação de rejeição crônica humana. Desse modo, elas são estabelecidas como um modelo animal para a reação de rejeição crônica. Os camundongos foram criados no instituto para experiências de animal de Shinshu University (nome formal: Division of Laboratory Animal Research, Department of Life Science, Research Center for Human and Environmental Sciences, Shinshu University) de acordo com os protocolos de experiência de animal da instituição. O transplante de coração de camundongo foi realizado usando um modelo de camundongo parcialmente modificado originando-se do modelo de camundongo previamente reportado para transplante de coração ectópico (Corry, R., J. e outros., Transplantation (1973) 16, 343-350). Camundongos de seis a oito semanas de idade sofreram transplante de coração por microcirurgia usando o procedimento descrito abaixo.

[000169] Tanto o camundongo doador quanto o recipiente foram anestesiados injetando-se sódio pentobarbital (Nenbutal (marca registrada)) em uma dose de 70 mg/kg. O coração a ser transplantado foi isolado após ligar os recipientes exceto a aorta ascendente e artéria pulmonar a ser usada para anastomose. O enxerto de coração isolado foi preservado em salina fisiológica fria contendo 7,5% de heparina em gelo. O recipiente foi laparotomizado na linha mediana e os intestinos foram sacudidos para expor a aorta abdominal e veia cava inferior. Após fluxo de sangue ter sido parado usando microgrampos para microrecipientes, uma incisão de cerca de 1-mm foi criada em cada superfície para sítios anastomóticos. A aorta e a artéria pulmonar do coração transplantado foram anastomosados para a aorta abdominal e veia cava inferior do recipiente, respectivamente, por sutura contínua

usando sutura de náilon 10-0. Os microgrampos foram gradualmente liberados para recuperar o fluxo de sangue. O coração transplantado foi confirmado recuperar os batimentos. Após confirmar interrupção de hemorragia, a parede abdominal e a pele foram suturadas para fechar o abdômen. Cada cirurgia levou cerca de 45 minutos. A taxa de sucesso foi 95% ou mais.

[000170] No grupo de tratamento, MR16-1 foi administrado às poços peritoneais em uma única dose de 0,5 mg/cabeça duas vezes por semana. O grupo de tratamento de controle foi administrado com rato IgG (controle Ig) da mesma maneira. Sessenta dias após o transplante, os corações transplantados foram excisados dos recipientes e a reação de rejeição crônica foi avaliada usando os seguintes três tipos de indicadores histopatológicos.

[000171] (1) O grau de reação de rejeição nas amostras manchadas com hematoxilin-eosina é comparado e avaliado usando escores de rejeição determinados com critérios para cinco graus de grau 0 a 4 com base nos indicadores de presença de infiltração de célula, e necrose miocárdico e perda (Billingham, M., E. e outros., J. Heart Transplant (1990) 9, 587-593; Rodriguez, E., R., J. Heart Lung Transplant (2003) 22, 3-15).

[000172] As seções histopatológicas foram preparadas dos corações transplantados 60 dias após transplante, e elas foram manchadas com hematoxilin-eosina (figura 1). A infiltração difusa de células inflamatórias e necrose miocárdica foi obtida no grupo de tratamento de controle (figura 1a). No grupo tratado por MR16-1, a infiltração de células inflamatórias foi moderada e a estrutura de tecidos miocárdicos permaneceu comparativamente intacta (figura 1b). Além disso, o escore de rejeição do grupo de administração de MR16-1 foi significativamente mais baixo do que aquele do grupo de tratamento de controle (figura 1c: grupo de tratamento de controle, $3,1 \pm 0,3$; grupo

de administração de MR16-1, $1,4 \pm 0,3$; $p=0,0013$).

(2) Fibrose de interstício miocárdico característico de rejeição crônica foi detectada pela mancha de tricoma de Masson. A relação (%) de área com fibrose em cada campo visual foi computada usando um *software* de análise de imagem (imagem de NIH, versão 1.62).

[000173] O resultado mostrou que a área com fibroses foi significativamente reduzida no grupo tratado com MR16-1 (figura 1e) quando comparado ao grupo de tratamento de controle (figura 1d) (figura 1f: grupo de tratamento de controle, $46,5\% \pm 4,1\%$; grupo de administração de MR16-1, $19,0\% \pm 2,1\%$; $p=0,0001$).

(3) Para analisar lesões vasculares pós-transplante caracterizadas por angioestenose devido ao espessamento da íntima, o percentual de estenose vascular foi determinado aproximadamente calculando-se o lumen vascular original da membrana elástica interna e usando o mesmo software de análise de imagem de acordo com o método de Suzuki, J., e outros. (Nat. Med. (1997) 3, 900-903) usando a seguinte equação:

Percentual de estenose (%) = $((\text{área de membrana elástica interna}) - (\text{lúmen})) / (\text{área de membrana elástica interna}) \times 100$.

[000174] O resultado obtido por análise das lesões vasculares nos corações transplantados mostrou que o espessamento da íntima foi suprimido e desse modo a estenose de lúmen vascular foi significativamente suprimida no grupo tratado com MR16-1 (figura 2b) quando comparado com o grupo de tratamento de controle (figura 2a) (figura 2c: grupo de tratamento de controle, $59,6\% \pm 6,0\%$; grupo de administração de MR16-1, $23,7\% \pm 4,2\%$; $p=0,0019$).

[000175] Como descrito acima, no modelo de transplante de coração de camundongo, a administração de MR16-1 aos recipientes suprimiu a reação de rejeição crônica aos corações transplantados e

significativamente suprimiu fibrose e espessamento íntimo de vasos sanguíneos nos corações transplantados que é considerado por serem aspectos histopatológicos característicos. A reação de rejeição crônica é uma complicação que afeta prognose a longo prazo nos recipientes, e desse modo é esperado que a nova terapia imunossupressiva seja desenvolvida pela aplicação clínica dos agentes da presente invenção.

Aplicabilidade industrial

[000176] A presente invenção fornece os agentes para suprimir a reação de rejeição crônica que compreende um inibidor de IL-6 como um ingrediente ativo, e métodos para suprimir a reação de rejeição crônica que compreende a etapa de administrar um inibidor de IL-6 aos pacientes.

[000177] A reação de rejeição crônica progride gradualmente mesmo depois que a reação de rejeição de fase aguda tenha sido superada através de vários imunossupressores. A condição patológica é complicada e muito diferente de muitos modos da reação de rejeição aguda. O efeito de prevenir e tratar a reação de rejeição crônica não foi obtido por qualquer agente farmacêutico existente. A presente invenção fornece novas utilidades terapêuticas de inibidores de IL-6 que têm o efeito de suprimir a rejeição crônica. Além disso, uma vez que os inibidores seletivamente suprimem a atividade de IL-6, uma citocina inflamatória, é esperado que eles sirvam como imunossupressores superiores tendo menos efeitos colaterais quando comparado com agentes farmacêuticos existentes.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um inibidor de IL-6, caracterizado pelo fato de que é para a preparação de um agente para suprimir reação de rejeição crônica.

2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o inibidor de IL-6 é um anticorpo que reconhece uma IL-6.

3. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o inibidor de IL-6 é um anticorpo que reconhece um receptor de IL-6.

4. Uso de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

5. Uso de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo que reconhece uma IL-6 humana ou receptor de IL-6 humana.

6. Uso de acordo com a reivindicação 2 ou 3, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo recombinante.

7. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 6, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo quimérico, humanizado, ou humano.

8. Uso de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizado pelo fato de que é supressão de reação de rejeição crônica em transplante de coração.

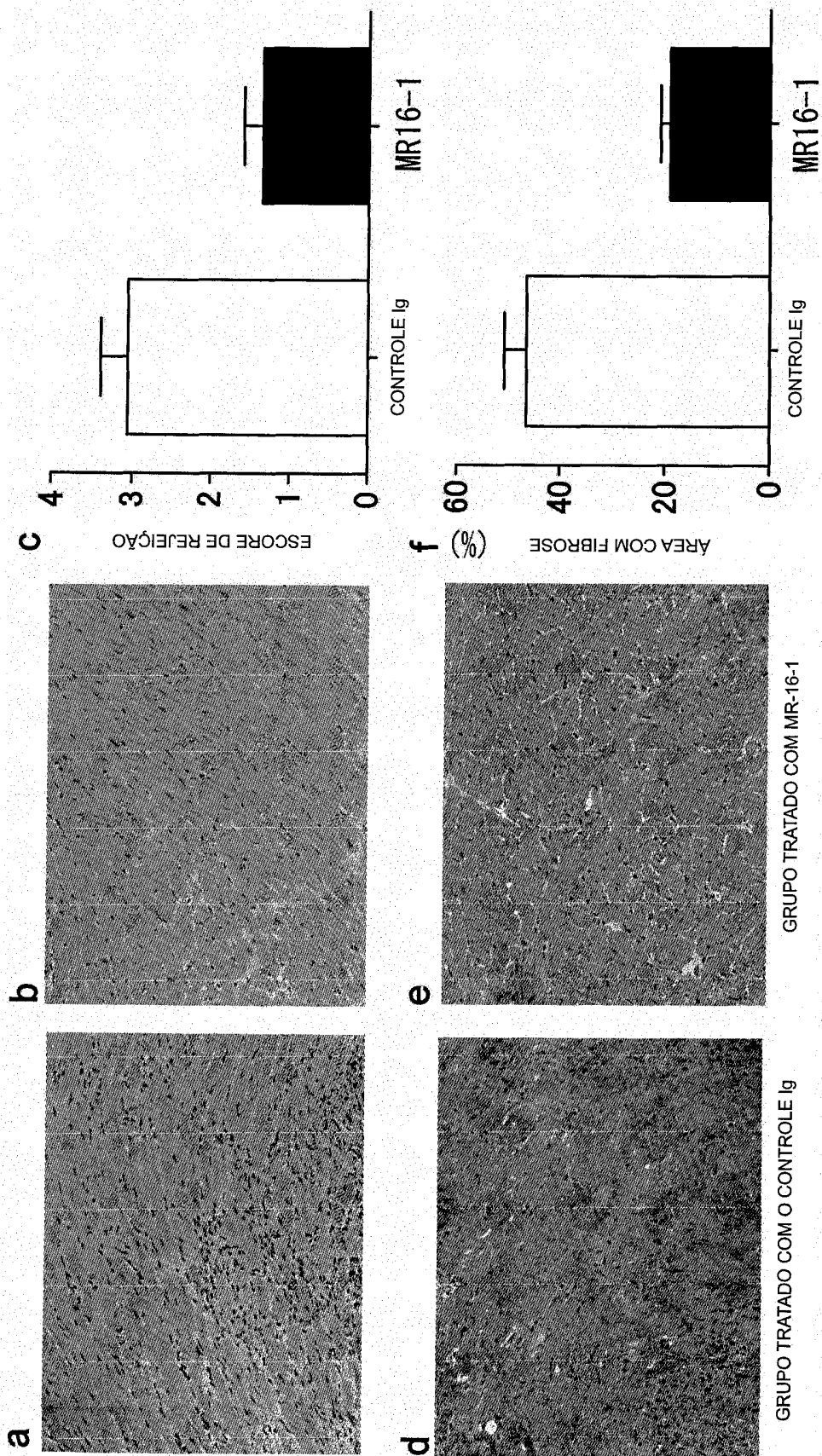
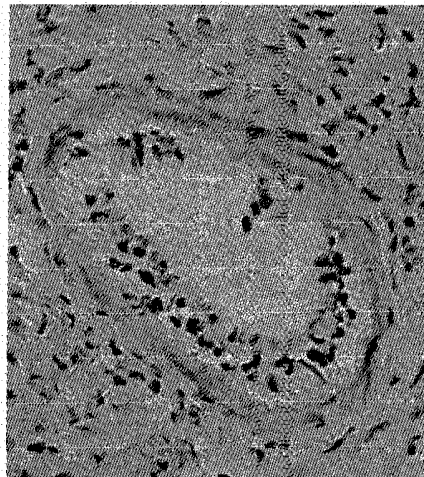


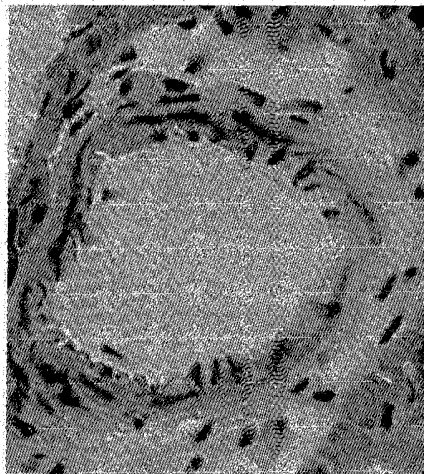
FIG.1

a



GRUPO TRATADO COM O CONTROLE Ig

b



GRUPO TRATADO COM MR-16-1

c

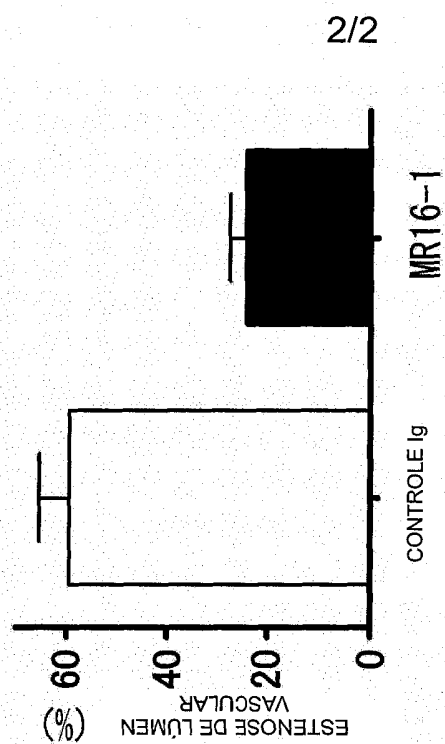


FIG.2