



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

(11) PI 0617664-0 B1



(22) Data do Depósito: 20/10/2006

(45) Data de Concessão: 13/04/2021

(54) Título: USO DE UM ANTICORPO QUE RECONHECE A IL-6 PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA TRATAR O ENFARTE DO MIOCÁRDIO OU SUPRIMIR A REMODELAGEM VENTRICULAR ESQUERDA DEPOIS DO ENFARTE DO MIOCÁRDIO

(51) Int.Cl.: A61K 45/00; A61K 39/395; A61P 9/10.

(30) Prioridade Unionista: 21/10/2005 JP 2005-307349.

(73) Titular(es): CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA.

(72) Inventor(es): MIYUKI KOBARA.

(86) Pedido PCT: PCT JP2006320905 de 20/10/2006

(87) Publicação PCT: WO 2007/046489 de 26/04/2007

(85) Data do Início da Fase Nacional: 18/04/2008

(57) Resumo: AGENTE PARA TRATAR ENFARTE DO MIOCÁRDIO E PARA SUPRIMIR A REMODELAGEM VENTRICULAR ESQUERDA DEPOIS DO ENFARTE DO MIOCÁRDIO E USO DO INIBIDOR DE IL-6. A presente invenção refere-se a efeitos dos anticorpos do receptor anti-IL-6 na melhoria da condição de áreas enfartadas no enfarte do miocárdio, e na supressão da remodelagem ventricular esquerda depois do enfarte do miocárdio. Como resultado, a administração dos anticorpos do receptor anti-IL-6 significativamente suprimiu o aumento da atividade de MPO na área enfartada e suprimiu a expressão de MCP-1 do miocárdio tanto na área enfartada quanto na área não-enfartada. Além disso, os exames ecocardiográficos e histológicos revelaram que a hipertrofia cardíaca também é suprimida.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para **"USO DE UM ANTICORPO QUE RECONHECE A IL-6 PARA A PRODUÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA PARA TRATAR O ENFARTE DO MIOCÁRDIO OU SUPRIMIR A REMODELAGEM VENTRICULAR ESQUERDA DEPOIS DO ENFARTE DO MIOCÁRDIO"**.

Campo técnico

[001] A presente invenção refere-se aos agentes para tratar enfarte do miocárdio, os quais compreendem um inibidor da IL-6 como um ingrediente ativo e seus usos. Além disso, a presente invenção refere-se aos agentes para suprimir o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio, o qual compreende um inibidor da IL-6 como um ingrediente ativo e seus usos.

Técnica anterior

[002] Enfarte do miocárdio é uma das doenças cardíacas isquêmicas. Ele é um distúrbio que causa a necrose do miocárdio onde a constrição da artéria coronária cardíaca ocorre devido à arteriosclerose e similares, e a circulação sanguínea da artéria coronária se torna dramaticamente reduzida ou interrompida. A expansão e/ou deterioração da área enfartada causa complicações tais como falência cardíaca e/ou arritmia severa induzida por isquemia, e o aumento da ameaça à morte.

[003] Conforme o enfarte do miocárdio progride, as células do miocárdio nas áreas enfartadas morrem e/ou são descartadas, e são deslocadas por tecidos fibrosos tais como fibra de colágeno. Tal área enfartada não tem contratilidade, e falha ao resistir à pressão intracardíaca que surge com a contração cardíaca, e então as paredes fibrosas se estendem delgadamente. Como resultado, para compensar a hipofunção, a hipertrofia da cavidade endocardial na área não-enfartada e a dilatação do ventrículo esquerdo inteiro são induzidas. Esse fenômeno é chamado de remodelamento ventricular esquerdo e

é conhecido por reduzir adicionalmente a função cardíaca e aumentar a morbidez e a mortalidade conseqüentemente. Dessa forma, para melhorar o prognóstico do enfarte do miocárdio, é considerado importante suprimir a progressão do remodelamento ventricular esquerdo tão antes quanto possível, e o desenvolvimento de métodos de tratamento eficazes é desejado.

[004] IL-6 é uma citocina chamada de fator estimulador de células B 2 (BSF2) ou interferon β 2. IL-6 foi descoberta como um fator de diferenciação envolvido na ativação dos linfócitos das células B (Documento Não-Patente 1) e foi depois descrita como sendo uma citocina multifuncional que influencia a função de várias células (Documento Não-Patente 2). IL-6 tem sido reportada como indutora da maturação das células de linfócito T (Documento Não-Patente 3).

[005] IL-6 transmite a sua atividade biológica através de dois tipos de proteínas na célula. Uma das proteínas é o receptor da IL-6, o qual é uma proteína de ligação ao ligante à qual a IL-6 se liga e tem um peso molecular de cerca de 80 KDa (Documentos Não-Patente 4 e 5). Além de uma forma ligada à membrana que penetra e é expressa na membrana celular, o receptor da IL-6 está presente como um receptor de IL-6 solúvel, o qual principalmente consiste na região extracelular da forma ligada à membrana.

[006] A outra é a proteína de membrana gp130, a qual tem um peso molecular de cerca de 130 KDa e está envolvida na transdução de sinal de ligação não-ligante. A atividade biológica da IL-6 é transmitida para a célula através da formação do complexo IL6/receptor da IL-6 pela IL-6 e pelo receptor da IL-6 e da ligação do complexo com gp130 depois (Documento Não-Patente 6).

[007] Os inibidores da IL-6 são substâncias que inibem a transmissão da atividade biológica da IL-6. Até agora, anticorpos contra a IL-6 (anticorpos anti-IL-6), anticorpos contra os receptores da IL-6 (an-

ticorpos receptores anti-IL-6), anticorpos contra a gp130 (anticorpos anti-gp130), variantes da IL-6, peptídeos parciais da IL-6 ou receptores da IL-6 e tais são conhecidos.

[008] Existem vários relatórios considerando os anticorpos receptores anti-IL-6 (Documentos Não-Patente 7 e 8; e Documentos de Patente 1 a 3). Um anticorpo PM-1 humanizado, o qual tenha sido obtido pelo transplante em um anticorpo humano, a região determinante de complementaridade (CDR) do anticorpo PM-1 de camundongo (Documento Não-Patente 9), o qual é um dos anticorpos dos receptores anti-IL-6, é conhecido (Documento de Patente 4).

[009] Até agora, foi sugerido que a IL-6 afeta a função e estrutura do coração em vista dos fatos de que ela influencia negativamente a miocontratilidade (Documento Não-Patente 10), que a hipertrofia cardíaca se desenvolve em camundongos, nos quais gp130 é constantemente ativada devido à superexpressão da IL-6 e dos receptores de IL-6 (Documento Não-Patente 11), e assim por diante. Depois do enfarte do miocárdio, a IL-6 é expressa no ventrículo esquerdo, particularmente, na zona da borda do enfarte miocárdial reperfusado (Documento Não-Patente 12), e o nível de expressão está relacionado com o tamanho do ventricular esquerdo (LV) depois do enfarte do miocárdio (Documento Não-Patente 13). Além disso, foi reportado que as células do miocárdio geram a IL-6 sob estresse de baixo oxigênio (Documento Não-Patente 14), e que a expressão da citocina nas células não-musculares durante o remodelamento pós-enfarte desempenha um papel regulatório nas alterações da matriz extracelular (Documento Não-Patente 15). Além disso, considerando a relação entre o enfarte do miocárdio e a IL-6, o sistema JAK/STAT ativado através da IL-6 é reportado por agir de maneira protetora no enfarte do miocárdio (Documento Não-Patente 16).

[0010] Por outro lado, de acordo com um experimento usando ca-

mundongos knockout IL-6, é reportado que a deficiência de IL-6 não teve influência no tamanho da área enfartada, no remodelamento ventricular esquerdo, ou de tal maneira (Documento Não-Patente 17). Conforme descrito acima, o papel da IL-6 no enfarte do miocárdio e no remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio foi desconhecido.

[0011] As referências à técnica anterior relacionada com a presente invenção são mostradas abaixo.

[0012] Documento Não-Patente 1 Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73 a 76

[0013] Documento Não-Patente 2 Akira, S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1 a 78

[0014] Documento Não-Patente 3 Lotz, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253 a 1258

[0015] Documento Não-Patente 4 Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967 a 981

[0016] Documento Não-Patente 5 Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825 a 828

[0017] Documento Não-Patente 6 Taga, T. et al., Cell (1989) 58, 573 a 581

[0018] Documento Não-Patente 7 Novick, D. et al., Hybridoma (1991) 10, 137 a 146

[0019] Documento Não-Patente 8 Huang, Y. W. et al., Hybridoma (1993) 123, 621 a 630

[0020] Documento Não-Patente 9 Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900 a 2906

[0021] Documento Não-Patente 10 Finkel, M. S. et al., Science (1992) 257, 387 a 389

[0022] Documento Não-Patente 11 Hirota, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995) 92, 4862 a 4866

- [0023] Documento Não-Patente 12 Gwechenberger, M. et al., Circulation (1999) 99, 546 a 551
- [0024] Documento Não-Patente 13 Ono, K. et al., Circulation (1998) 98, 149 a 156
- [0025] Documento Não-Patente 14 Yamauchi-Takibara, K. et al., Circulation (1995) 91, 1520 a 1524
- [0026] Documento Não-Patente 15 Yue, P. et al., Am. J. Physiol. (1998) 275, H250 a H258
- [0027] Documento Não-Patente 16 Negoro, S. et al., Cardiovasc. Res. (2000) 47, 797 a 805
- [0028] Documento Não-Patente 17 Fuchs M. et al., FASEB J. (2003) 17, 2118 a 2120
- [0029] Documento de Patente 1 WO 95/09873
- [0030] Documento de Patente 2 Publicação de Pedido de Patente Francesa Nº FR 2694767
- [0031] Documento de Patente 3 Patente U.S. Nº 5216128
- [0032] Documento de Patente 4 WO 92/19759

Descrição da invenção

Problemas a serem solucionados pela invenção

[0033] Até agora, a IL-6 tem sido sugerida como estando envolvida no enfarte do miocárdio e no conseqüente remodelamento ventricular esquerdo. Entretanto, seu papel detalhado não foi ainda esclarecido. Além disso, não foi descrito que tipo de efeito a administração do inibidor da IL-6 deve mostrar no enfarte do miocárdio e no conseqüente remodelamento ventricular esquerdo.

[0034] A presente invenção tem sido feita sob tais circunstâncias, e um objetivo da presente invenção é proporcionar agentes para tratar o enfarte do miocárdio, os quais compreendem um inibidor da IL-6 como um ingrediente ativo. Além disso, a presente invenção proporciona agentes para suprimir o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio, o qual compreende um inibidor da IL-6 como um ingrediente ativo. Além disso, outros objetivos da presente invenção são para proporcionar métodos para tratar o enfarte do miocárdio e métodos para suprimir o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio, ambos os quais compreendem a etapa de administrar um inibidor da IL-6 a indivíduos os quais tenham desenvolvido o enfarte do miocárdio.

Meios de solucionar os problemas

[0035] Para solucionar os problemas acima, os presentes inventores investigaram os efeitos dos anticorpos do receptor anti-IL-6 na melhoria da condição de uma área enfartada no enfarte do miocárdio, e na supressão do remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio.

[0036] Primeiro, os presentes inventores produziram modelos de enfarte do miocárdio pela ligação da ramificação descendente anterior esquerda em camundongos machos Balb/C. A seguir, 500 µg de um anticorpo do receptor anti-IL-6 (MR16-1) foram intraperitonealmente

administrados no camundongo modelo de enfarte do miocárdio.

[0037] Como resultado, o aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO) na área enfartada do miocárdio foi significativamente suprimida. Além disso, a expressão da proteína 1 quimioatratadora de monócito miocárdial (MCP-1) foi suprimida tanto na área enfartada quanto na área não-enfartada dos camundongos administrados com anticorpo do receptor anti-IL-6. Além disso, tanto a ecocardiografia quanto os exames histológicos revelaram que a hipertrofia cardíaca foi suprimida em um camundongo administrado com anticorpo do receptor anti-IL-6.

[0038] Dessa forma, os presentes inventores descobriram, pela primeira vez, que é possível melhorar a condição de uma área enfartada no enfarte do miocárdio e suprimir o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio pela administração de um anticorpo receptor anti-IL-6, e finalmente completaram a presente invenção.

[0039] Especificamente, a presente invenção proporciona:

[1] um agente para tratar enfarte do miocárdio, o qual compreende um inibidor da IL-6 como um ingrediente ativo;

[2] o agente, de [1], em que o inibidor da IL-6 é um anticorpo que reconhece a IL-6;

[3] o agente de [1], em que o inibidor da IL-6 é um anticorpo que reconhece o receptor da IL-6;

[4] o agente de [2] ou [3], em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal;

[5] o agente de [2] ou [3], em que o anticorpo é um anticorpo contra a IL-6 humana ou um receptor da IL-6 humana;

[6] o agente de [2] ou [3], em que o anticorpo é um anticorpo recombinante;

[7] o agente de [6], em que o anticorpo é um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano;

[8] um agente para suprimir a remodelagem ventricular esquerda depois do enfarte do miocárdio, o qual compreende um inibidor da IL-6 como um ingrediente ativo;

[9] agente de [8], em que o inibidor da IL-6 é um anticorpo que reconhece a IL-6;

[10] o agente de [8], em que o inibidor da IL-6 é um anticorpo que reconhece o receptor da IL-6;

[11] o agente de [9] ou [10], em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal;

[12] o agente de [9] ou [10], em que o anticorpo é um anticorpo contra a IL-6 humana ou um receptor da IL-6 humana;

[13] o agente de [9] ou [10], em que o anticorpo é um anticorpo recombinante;

[14] o agente de [13], em que o anticorpo é um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano;

[15] o agente de qualquer uma de [8] a [14], o qual é usado para tratar o enfarte do miocárdio;

[16] um método para tratar enfarte do miocárdio em um indivíduo, o qual compreende a etapa de administrar um inibidor da IL-6 a um indivíduo o qual tenha desenvolvido enfarte do miocárdio;

[17] um método para suprimir o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio em um indivíduo, o qual compreende a etapa de administrar um inibidor da IL-6 a um indivíduo o qual tenha desenvolvido enfarte do miocárdio;

[18] o método de [16] ou [17], em que o inibidor da IL-6 é um anticorpo que reconhece a IL-6.;

[19] o método de [16] ou [17], em que o inibidor da IL-6 é um anticorpo que reconhece um receptor da IL-6;

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

[21] o método de [18] ou [19], em que o anticorpo é um anticorpo contra a IL-6 humana ou um anticorpo contra um receptor da IL-6 humana;

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

[23] o método de [22], em que o anticorpo é um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano;

[24] uso do inibidor da IL-6 para a produção de um agente para tratar o enfarte do miocárdio;

[25] uso do inibidor da IL-6 para a produção de um agente para suprimir o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio;

[26] o uso de [24] ou [25], em que o inibidor da IL-6 é um anticorpo que reconhece a IL-6;

[27] o uso de [24] ou [25], em que o inibidor da IL-6 é um anticorpo que reconhece um receptor da IL-6;

[28] o uso de [26] ou [27], em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal;

[29] o uso de [26] ou [27], em que o anticorpo é um anticorpo contra a IL-6 humana ou um anticorpo contra um receptor da IL-6 humana;

[30] o uso de [26] ou [27], em que o anticorpo é um anticorpo recombinante; e

[31] o uso de [30], em que o anticorpo é um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano.

Melhor forma de executar a invenção

[0040] Os presentes inventores descobriram que a melhoria da condição da área enfartada no enfarte do miocárdio e a supressão no remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio pode ser alcançada pela administração de u, anticorpo receptor anti-

IL-6. A presente invenção é baseada nessas descobertas.

[0041] A presente invenção se refere a agentes para tratar enfarte do miocárdio e agentes para suprimir o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio, ambos os quais compreendem um inibidor da IL-6 como um ingrediente ativo.

[0042] Aqui, um “inibidor da IL-6” é uma substância que bloqueia a transdução de sinal mediada pela IL-6 e inibe a atividade biológica da IL-6. Preferivelmente, o inibidor da IL-6 é uma substância que tem uma função inibitória contra a ligação da IL-6, do receptor da IL-6 ou de gp130.

[0043] Os inibidores da IL-6 da presente invenção incluem, porém não estão limitados, por exemplo, a anticorpos anti-IL-6, a anticorpos do receptor anti-IL-6, a anticorpos anti-gp130, a variantes da IL-6, a variantes do receptor da IL-6 solúveis e a peptídeos parciais da IL-6 ou dos receptores da IL-6 e a compostos de baixo peso molecular que apresentam atividades semelhantes. Preferivelmente, inibidores da IL-6 da presente invenção incluem anticorpos que reconhecem receptores da IL-6.

[0044] A fonte do anticorpo não está particularmente restrita na presente invenção; entretanto o anticorpo é preferivelmente derivado de mamíferos, e mais preferivelmente derivado de seres humanos.

[0045] O anticorpo anti-IL-6 usado na presente invenção pode ser obtido como um anticorpo policlonal ou monoclonal através de meios conhecidos. Particularmente, anticorpos monoclonais derivados de mamíferos são preferidos como o anticorpo anti-IL-6 usado na presente invenção. Os anticorpos monoclonais derivados de mamíferos incluem aqueles produzidos a partir de hibridomas e aqueles produzidos a partir de hospedeiros transformados com um vetor de expressão que compreenda um gene de anticorpo por métodos de engenharia genética. Pela ligação a IL-6, o anticorpo inibe a ligação da IL-6 a um recep-

tor de IL-6 e bloqueia a transmissão da atividade biológica da IL-6 na célula.

[0046] Tais anticorpos incluem MH166 (Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951 a 956), anticorpo SK2 (Sato, K. et al., transaction of the 21st Annual Meeting of the Japanese Society for Immunology (1991) 21, 166) e assim por diante.

[0047] Basicamente, hibridomas produtores de anticorpo anti-IL-6 podem ser preparados usando técnicas conhecidas como se segue. Especificamente, tais hibridomas podem ser preparados pelo uso da IL-6 como um antígeno sensibilizador para efetuar a imunização por um método de imunização convencional, fundindo as células imunes obtidas com células de origem conhecidas por um método de fusão de células convencional, e varrendo por células produtoras de anticorpos monoclonais por um método de varredura convencional.

[0048] Mais especificamente, anticorpos anti-IL6 podem ser produzidos como se segue. Por exemplo, a IL-6 humana usada como o antígeno sensibilizador para obter anticorpos pode ser obtida usando o gene da IL-6 e/ou seqüências de aminoácidos descritas na Eur. J. Biochem. (1987) 168, 543 a 550; J. Immunol. (1988) 140, 1534 a 1541; e/ou Agr. Biol. Chem. (1990) 54, 2685 a 2688.

[0049] Depois de transformar uma célula hospedeira apropriada com um sistema de vetor de expressão conhecido inserido com uma seqüência de gene da IL-6, a proteína IL-6 desejada é purificada por um método conhecido de dentro da célula hospedeira ou a partir do sobrenadante da cultura. Essa proteína IL-6 purificada pode ser usada como o antígeno sensibilizante. Alternativamente, uma proteína de fusão da proteína IL-6 e outra proteína podem ser usadas como o agente sensibilizante.

[0050] Anticorpos receptores anti-IL-6 usados para a presente invenção podem ser obtidos como anticorpos policlonais ou monoclonais

por métodos conhecidos. Particularmente, os anticorpos do receptor anti-IL-6 usados na presente invenção são preferivelmente anticorpos monoclonais derivados de mamíferos. Os anticorpos monoclonais derivados de mamíferos incluem aqueles produzidos a partir de hibridomas e aqueles produzidos a partir de hospedeiros transformados com um vetor de expressão que compreende um gene de anticorpo por métodos de engenharia genética. Pela ligação a um receptor da IL-6, o anticorpo inibe a IL-6 de se ligar ao receptor da IL-6 e bloqueia a transmissão da atividade biológica da IL-6 na célula.

[0051] Tais anticorpos incluem o anticorpo MR16-1 (Tamura, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924 a 11928); o anticorpo PM-1 (Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900 a 2906); o anticorpo AUK12-20, o anticorpo AUK64-7 e o anticorpo AUK146-15 (WO 92/19759); e assim por diante. Dentre esses, o anticorpo PM-1 pode ser exemplificado como um anticorpo monoclonal preferido contra o receptor da IL-6 humana, e o anticorpo da MR16-1 como um anticorpo monoclonal preferido contra o receptor da IL-6 de camundongo.

[0052] Basicamente, hibridomas produtores de um anticorpo monoclonal do receptor anti-IL-6 podem ser preparados usando técnicas conhecidas como se segue. Especificamente, tais hibridomas podem ser preparados pelo uso de um receptor de IL-6 como o antígeno sensibilizador para executar a imunização por um método de imunização convencional, fundindo as células imunes obtidas com uma célula de origem conhecida por um método de fusão de células convencional, e varrendo por células produtoras de anticorpo monoclonal por um método de varredura convencional.

[0053] Mais especificamente, anticorpos de receptores anti-IL-6 podem ser produzidos como se segue. Por exemplo, um receptor da IL-6 humana ou um receptor da IL-6 de camundongo como o antígeno sensibilizante para obter o anticorpo pode ser obtido usando os genes

do receptor de IL-6 e/ou as seqüências de aminoácidos descritas na Publicação de Pedido de Patente Européia N° EP 325474, e na Publicação Kokai do Pedido de Patente Japonesa N° (JP-A) Hei 3-155795, respectivamente.

[0054] Existem dois tipos de proteínas receptoras da IL-6, isto é, a proteína expressa na membrana celular e a proteína separada da membrana celular (receptor de IL-6 solúvel) (Yasukawa, K. et al., J. Biochem. (1990) 108, 673 a 676). O receptor da IL-6 solúvel consiste essencialmente da região extracelular do receptor da IL-6 ligado à membrana celular, e difere do receptor de IL-6 ligado à membrana pelo fato de que lhe falta a região transmembranar ou tanto a região transmembranar quanto a intracelular. Qualquer receptor de IL-6 pode ser empregado como a proteína receptora da IL-6 contanto que ele possa ser usado como um antígeno sensibilizante para produzir o anticorpo receptor anti-IL-6 utilizado na presente invenção.

[0055] Depois de transformar uma célula hospedeira apropriada com um sistema de vetor de expressão conhecido inserido com uma seqüência de genes receptores da IL-6, a proteína receptora IL-6 desejada é purificada por um método conhecido do interior da célula hospedeira ou do sobrenadante da cultura. Essa proteína do receptor da IL-6 purificada pode ser usada como um agente sensibilizante. Alternativamente, uma célula expressando o receptor da IL-6 ou uma proteína de fusão da proteína receptora da IL-6 e outra proteína pode ser utilizada como um antígeno sensibilizante.

[0056] Anticorpos anti-gp130 usados na presente invenção podem ser obtidos como anticorpos policlonais ou monoclonais por métodos conhecidos. Particularmente, os anticorpos anti-gp130 usados na presente invenção são preferivelmente anticorpos monoclonais derivados de mamíferos. Os anticorpos monoclonais derivados de mamíferos incluem aqueles produzidos a partir de hibridomas e aqueles produzi-

dos a partir de hospedeiros transformados com um vetor de expressão que compreende um gene de anticorpo por métodos de engenharia genética. Pela ligação ao gp130, o anticorpo inibe a gp130 da ligação ao complexo IL-6/receptor de IL-6 e bloqueia a transmissão da atividade biológica da IL-6 na célula.

[0057] Tais anticorpos incluem o anticorpo AM64 (JP-A Hei 3-219894); o anticorpo 4B11 e o anticorpo 2H4 (US 5571513); o anticorpo B-S12 e o anticorpo B-P8 (JP-A Hei 8-291199); e assim por diante.

[0058] Basicamente, hibridomas produtores do anticorpo monoclonal Anti-gp130 podem ser preparados usando técnicas conhecidas como se segue. Especificamente, tais hibridomas podem ser preparados pelo uso de gp130 como um antígeno sensibilizante para efetuar a imunização por um método de imunização convencional, fundindo as células imunes obtidas com uma célula de origem conhecida por um método de fusão celular convencional, e varrendo por células produzidas de anticorpos monoclonais por um método de varredura convencional.

[0059] Mais especificamente, o anticorpo monoclonal pode ser produzido como se segue. Por exemplo, gp130 usado como um antígeno sensibilizante para obter anticorpo pode ser obtido usando o gene gp130 e/ou a sequência de aminoácidos descrita na Publicação do Pedido de Patente Européia Nº EP 411946.

[0060] Depois de transformar uma célula hospedeira apropriada com um sistema de vetor de expressão conhecido inserido com uma sequência de gene gp130, a proteína gp130 desejada é purificada por um método conhecido de dentro da célula hospedeira ou do sobrenadante de cultivo. Essa proteína gp130 purificada pode ser usada como um antígeno sensibilizante. Alternativamente, uma célula expressando gp130 ou uma proteína de fusão da proteína gp130 e outra proteína podem ser usados como um antígeno sensibilizante.

[0061] Mamíferos a serem imunizados com um agente sensibilizante não são particularmente limitados, porém são preferivelmente selecionados em consideração da compatibilidade com a célula de origem usada para fusão celular. Geralmente, roedores tais como camundongos, ratos e hamsters são usados.

[0062] A imunização de animais com um agente sensibilizante é efetuada de acordo com métodos conhecidos. Por exemplo, como um método geral, ela é efetuada pela injeção do antígeno sensibilizante intraperitoneal ou subcutaneamente em mamíferos. Especificamente, o antígeno sensibilizante é preferivelmente diluído ou suspenso em uma quantidade apropriada de salina tamponada com fosfato (PBS), salina fisiológica ou parecido, misturado com uma quantidade apropriada de um adjuvante geral (por exemplo, adjuvante completo de Freund), emulsificado e, a seguir, administrado por várias vezes a cada 4 a 21 dias a um mamífero. Além disso, um veículo apropriado pode ser usado para a imunização com um agente sensibilizante.

[0063] Após tal imunização, um nível aumentado do anticorpo desejado no soro é confirmado e, a seguir, as células imunes são obtidas a partir do mamífero para a fusão celular. Células imunes preferidas para a fusão celular incluem, particularmente, células do baço.

[0064] Para as células do mieloma de mamífero serem usadas como uma célula de origem, isto é, uma célula parceira para ser fundida com as células imunes acima, várias cepas de células conhecidas, por exemplo, P3X63Ag8.653 (Kearney, J. F. et al., J. Immunol (1979) 123, 1548 a 155), P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1 a 7), NS-1 (Kohler, G e Milstein, C. Eur., J. Immunol. (1976) 6, 511 a 519, MPC-11 (Marguiles, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405 a 415), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269 a 270), F0 (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1 a 21), S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313 a

323), R210 (Galfre, G et al., Nature (1979) 277, 131 a 133) e tais são apropriadamente usados.

[0065] Basicamente, a fusão celular da célula imune e da célula de mieloma anteriormente mencionadas pode ser efetuada usando métodos conhecidos, por exemplo, o método de Milstein et al. (Kohler, G. e Milstein, C., Methods Enzymol. (1981), 3 a 46) e tais.

[0066] Mais especificamente, a fusão celular anteriormente mencionada é alcançada em meio de cultivo nutriente geral sob a presença de um agente intensificador de fusão celular. Por exemplo, polietilenglicol (PEG), vírus Sendai (HVJ) e tais são usados como um agente intensificador de fusão. Além disso, para aumentar a eficiência de fusão, agentes adjuvantes tais como dimetilsulfóxido podem ser adicionados para uso de acordo com as necessidades.

[0067] A proporção de células imunes e de células de mieloma usadas é preferivelmente, por exemplo, de 1 a 10 células imunes para cada célula de mieloma. O meio de cultura usado para a fusão anteriormente mencionada é, por exemplo, o meio de cultura RPMI1640 ou MEM, os quais são adequados para a proliferação das células de mieloma anteriormente mencionadas. Um meio de cultivo geral usado para cultivar esse tipo de célula também pode ser usado. Além disso, os suplementos do soro, tal como soro de bezerro fetal (FCS) podem ser usados em combinação.

[0068] Para a fusão celular, as células de fusão (hibridomas) de interesse são formadas pela mistura de quantidades predeterminadas da célula imune e da célula de mieloma anteriormente mencionadas bem no meio de cultura anteriormente mencionado, e a seguir pela adição e mistura de uma concentração de 30 a 60% (p/v) de solução PEG (por exemplo, uma solução PEG com um peso molecular médio de cerca de 1.000 até 6.000) pré-aquecida até cerca de 37°C. A seguir, os agentes de fusão celular e tais que não são adequados para o

crescimento do hibridoma podem ser removidos pela repetição das etapas de adição sucessiva de um meio de cultura apropriado e pela remoção do sobrenadante por centrifugação.

[0069] Os hibridomas acima são selecionados pelo cultivo de células em um meio de cultura de seleção geral, por exemplo, o meio de cultura HAT (um meio de cultura contendo hipoxantina, aminopterin e timidina). O cultivo no meio de cultura HAT é continuado por um período de tempo suficiente, geralmente por vários dias até várias semanas, para matar células diferentes dos hibridomas de interesse (células não-fundidas). A seguir, o método de diluição limitado padrão é efetuado para varrer e clonar hibridomas que produzem o anticorpo de interesse.

[0070] Além do método de imunizar um animal não-humano com um antígeno para obter os hibridomas anteriormente mencionados, um anticorpo humano desejado que tenha a atividade de ligação em um antígeno desejado ou em uma célula expressando antígeno pode ser obtido pela síntese de um linfócito humano com uma proteína de antígeno desejada ou de uma célula expressando antígeno *in vitro*, e fundindo o linfócito B sensibilizado com uma célula de mieloma humana (por exemplo, U266) (vide a Publicação Kokoku do Pedido de Patente Japonesa Nº (JP-B) Hei 1-59878 (pedido de patente japonesa aprovado e examinado publicado para oposição)). Além disso, um anticorpo humano desejado pode ser obtido pela administração do antígeno ou da célula que expressa o antígeno para um animal transgênico que tenha um repertório de genes de anticorpo humano e, a seguir, seguindo o método anteriormente mencionado (vide as Publicações de Pedido de Patente Internacional Nºs WO 93/1227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 e WO 96/33735).

[0071] Os hibridomas preparados dessa forma, os quais produzem anticorpos monoclonais, podem ser subcultivados em meio de cultura

convencional e estocados em nitrogênio líquido por um longo período.

[0072] Para obter anticorpos monoclonais a partir dos hibridomas anteriormente mencionados, os seguintes métodos podem ser empregados: (1) método onde os hibridomas são cultivados de acordo com métodos convencionais e os anticorpos são obtidos como um sobrenadante de cultura; (2) método onde os hibridomas se proliferam pela administração deles a um mamífero compatível e os anticorpos são obtidos como ascites; e assim por diante. O primeiro método é preferido para obter anticorpo com alta pureza, e o último é preferido para a produção em larga escala de anticorpos.

[0073] Por exemplo, a preparação de hibridomas produtores de anticorpo de receptor anti-IL-6 pode ser efetuada pelo método descrito em JP-A Hei 3-139293. A preparação pode ser efetuada pelo método de injeção de um hibridoma produtor de anticorpo PM-1 na cavidade abdominal de um camundongo BALB/c, obtendo a ascite, e a seguir purificando o anticorpo PM-1 da ascite, ou o método de cultivo do hibridoma em um meio apropriado (por exemplo, meio RPMI1640 contendo 10% de soro bovino fetal, e 5% de BM-Condimed H1 (Boehringer Mannheim); hibridoma de meio SFM (GIBCO-BRL); meio PFHM-II (GIBCO-BRL), etc.) e a seguir obtendo o anticorpo PM-1 do sobrenadante cultivado.

[0074] Um anticorpo recombinante pode ser usado como um anticorpo monoclonal da presente invenção, em que o anticorpo é produzido através de técnicas de recombinação genética pela clonagem de um gene de anticorpo de um hibridoma, inserindo o gene em um vetor apropriado e, a seguir, introduzindo o vetor em um hospedeiro (vide, por exemplo, Borrebaeck, C. A. K., e Larrick, J. W., THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, publicado no Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD., 1990).

[0075] Mais especificamente, mRNA codificando para a região va-

riável (V) de um anticorpo é isolado de uma célula que produza o anticorpo de interesse, tal como um hibridoma. O isolamento do mRNA pode ser efetuado pelo preparo de RNA total de acordo com métodos conhecidos, tais como o método de ultracentrifugação de guanidina (Chirgwin, J. M. et al., *Biochemistry* (1979) 18, 5294 a 5299) e o método AGPC (Chomezynski, P. et al., *Anal. Biochem.* (1987) 162, 156 a 159) e preparando mRNA usando o kit de purificação de mRNA (Pharmacia) e tais. Alternativamente, mRNA pode ser diretamente preparado usando o kit de purificação mRNA QuickPrep. (Pharmacia).

[0076] cDNA da região V do anticorpo é sintetizado a partir do mRNA obtido usando a transcriptase reversa. A síntese de cDNA pode ser alcançada pelo uso do Kit de Síntese de cDNA de primeiro filamento da Transcriptase Reversa AMV, e assim por diante. Além disso, para sintetizar e amplificar o cDNA, o método 5'-RACE (Frohman, M. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 8998 a 9002; Belyavsky, A. et al., *Nucleic Acids Res.* (1989) 17, 2919 a 2932) usando o kit 5'-Ampli FINDER RACE (Clontech) e PCR podem ser empregados. O fragmento de DNA de interesse é purificado a partir dos produtos de PCR obtidos e, a seguir, ligado com um DNA vetor. A seguir, um vetor recombinante é preparado usando o DNA acima e introduzindo em *Escherichia coli* ou tal, e suas colônias são selecionadas para preparar o vetor recombinante desejado. A seqüência de nucleotídeos do DNA de interesse é confirmada, por exemplo, pelo método de dideoxi.

[0077] Quando um DNA codificando a região V de um anticorpo de interesse é obtido, o DNA é ligado com um DNA que codifica uma região constante do anticorpo desejada (região C) e inserido em um vetor de expressão. Alternativamente, o DNA codificando a região V do anticorpo pode ser inserido em um vetor de expressão compreendendo o DNA de uma região C do anticorpo.

[0078] Para produzir um anticorpo para ser usado na presente in-

venção, conforme descrito abaixo, o gene do anticorpo é inserido em um vetor de expressão de fora que ele é expresso sob o controle da região reguladora de expressão, por exemplo, intensificador e promotor. A seguir, o anticorpo pode ser expresso pela transformação de uma célula hospedeira com o seu vetor de expressão.

[0079] Na presente invenção, para reduzir a heteroantigenicidade contra seres humanos e tais, anticorpos recombinantes genéticos artificialmente modificados, por exemplo, anticorpos quiméricos, anticorpos humanizados ou anticorpos humanos podem ser usados. Esses anticorpos modificados podem ser preparados usando métodos conhecidos.

[0080] Um anticorpo quimérico pode ser obtido pela ligação do DNA codificando a região V do anticorpo obtido conforme acima com um DNA codificando a região C do anticorpo humano inserindo o DNA em um vetor de expressão e introduzindo este em um hospedeiro para produção (vide a Publicação do Pedido de Patente Européia N° EP 125023; A Publicação do Pedido de Patente Internacional N° WO 92/19759). Esse método conhecido pode ser usado para obter anticorpos quiméricos úteis para a presente invenção.

[0081] Anticorpos humanizados são também referidos como anticorpos humanos remodelados, e são anticorpos em que as regiões determinantes de complementaridade (CDRs) de um anticorpo de um mamífero diferente do humano (por exemplo, um anticorpo de camundongo) são transferidas para os CDRs de um anticorpo humano. Métodos gerais para essa recombinação gênica são também conhecidos (vide a Publicação do Pedido de Patente Européia N° EP 125023, a Publicação do Pedido de Patente Internacional N° WO 92/19759).

[0082] Mais especificamente, uma sequência de DNA designada de modo que os CDRs de um anticorpo de camundongo são ligados com as regiões de estrutura (FRs) de um anticorpo humano é sinteti-

zada por PCR a partir de vários oligonucleotídeos que foram produzidos para conter porções sobreponíveis nos seus terminais. O DNA obtido é ligado com um DNA codificante da região C do anticorpo humano e, a seguir, inserido em um vetor de expressão. O vetor de expressão é introduzido em um hospedeiro para produzir o anticorpo humanizado (vide a Publicação do Pedido de Patente Européia N° EP 239400, a Publicação do Pedido de Patente Internacional N° WO 92/19759).

[0083] As FRs do anticorpo humano a serem ligadas através dos CDRs são selecionadas de modo que as CDRs de um sítio de ligação de antígeno adequado. O(s) aminoácido(s) nas FRs das regiões variáveis do anticorpo podem ser substituídos conforme necessário de modo que os CDRs do anticorpo humano remodelado formem um sítio de ligação de antígeno apropriado (Sato, K. et al., Cancer REs. (1993) 53, 851 a 856).

[0084] Regiões C de anticorpos humanos são usadas para os anticorpos quiméricos e humanizados, e incluem C γ . Por exemplo, C γ 1, C γ 2, C γ 3 e C γ 4 podem ser usados. Além disso, para melhorar a estabilidade do anticorpo ou de sua produção, as regiões C do anticorpo humano podem ser modificadas.

[0085] Anticorpos quiméricos consistem da região variável de um anticorpo derivado de mamíferos não-humanos e de uma região C derivada de anticorpo humano; e anticorpos humanizados consistem dos CDRs de um anticorpo derivado de mamíferos não-humanos e as regiões de estrutura e as regiões C derivadas de um anticorpo humano. Ambas têm antigenicidade reduzida no corpo humano e, dessa forma, são úteis como anticorpos para serem usados na presente invenção.

[0086] Exemplos específicos preferidos de anticorpos humanizados usados na presente invenção incluem um anticorpo PM-1 humanizado (vide a Publicação do Pedido de Patente Internacional N° WO

92/19759).

[0087] Além disso, além do método anteriormente mencionado para obter um anticorpo humano, técnicas para obter anticorpos humanos por peneiração usando uma biblioteca de anticorpo humano também são conhecidas. Por exemplo, é possível expressar as regiões variáveis de anticorpos humanos na superfície dos fagos como anticorpos de cadeia individual (scFv) pelo método de apresentação de fagos, e a seguir selecionar os fagos de ligação a antígeno. Pela análise dos genes dos fagos selecionados, as seqüências de DNA que codificam as regiões variáveis do anticorpo humano que se ligam ao antígeno podem ser determinadas. Uma vez que a seqüência do DNA de um scFV que se liga ao antígeno é descrita, um vetor de expressão apropriado compreendendo a seqüência pode ser construído para obter um anticorpo humano. Esses 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.

[0088] O gene do anticorpo construído acima pode ser expresso de acordo com os métodos convencionais. Quando uma célula de mamífero é usada, o gene do anticorpo pode ser expresso usando um DNA no qual o gene do anticorpo a ser expresso está funcionalmente ligado a um promotor comumente usado útil e um sinal poli A a montante do gene do anticorpo, ou um vetor compreendendo o DNA. Exemplos de um promotor/intensificador incluem o promotor/intensificador inicial imediato do citomegalovírus humano.

[0089] Além disso, outros promotores/intensificadores que podem ser utilizados para expressar o anticorpo a ser usado na presente invenção incluem promotores/intensificadores virais de retrovírus, polio-
ma vírus, adenovírus, vírus símio 40 (SV40) e tais; e promotores/intensificadores derivados de células de mamíferos, tal como o fa-

tor de alongamento humano 1α (HEF1 α).

[0090] Por exemplo, quando o promotor/intensificador SV40 é usado, a expressão pode ser facilmente efetuada seguindo o método por Mulligan et al. (Mulligan, R. C. et al., *Nature* (1979) 277, 108 a 114). Alternativamente, no caso do promotor/intensificador HEF1 α , o método por Mizushima et al. (Mizushima, S. e Nagata S., *Nucleic Acids res.* (1990) 18, 5322) pode ser usado.

[0091] Quando *E. coli* é usada, o gene do anticorpo pode ser expresso pela ligação de forma funcional de um promotor útil convencional, uma seqüência de sinal para a secreção do anticorpo e o gene do anticorpo para ser expresso. Exemplos de um promotor incluem o promotor lacZ, o promotor araB e tais. quando o promotor lacZ é usado, a expressão pode ser efetuada de acordo com o método de Ward et al. (Ward, E. S. et al., *Nature* (1989) 341, 544 a 546; Ward., E. S. et al., *FASEB J.* (1992) 6, 2422 a 2427); e o promotor araB pode ser usado de acordo com o método de Better et al. (Better, M. et al., *Science* (1988) 240, 1041 a 1043).

[0092] Quando o anticorpo é produzido no periplasma de *E. coli*, a seqüência de sinal pel B (Lei, S. P. et al., *J. Bacteriol.* (1987) 169, 4379 a 4383) pode ser usada como a seqüência sinal para a secreção de anticorpo. O anticorpo produzido no periplasma é isolado e, a seguir, usado depois do redobramento apropriado da estrutura do anticorpo (vide, por exemplo, WO 96/30394).

[0093] Como a origem de replicação, aqueles derivados de SV40, políoma vírus, adenovírus papiloma vírus bovino (BPV) e tais podem ser usados. Além disso, para aumentar a quantidade de cópias de gene em um sistema de células hospedeiras, o vetor de expressão pode compreender o gene da aminoglicosideofosfotransferase (APH), o gene da timidina quinase (TK), o gene da fosforibosiltransferase (Eco-gpt), o gene da diidrofolato redutase (dhfr) ou tal como um marcador

de seleção.

[0094] Qualquer sistema de produção pode ser usado para preparar os anticorpos a serem usados na presente invenção. Os sistemas de produção para a preparação dos anticorpos incluem aqueles que usam células eucarióticas ou células procarióticas.

[0095] Os sistemas de produção que usam células procarióticas incluem aqueles que utilizam células animais, células vegetais ou células fúngicas. Tais células animais incluem (1) células de mamíferos, por exemplo, CHO, COS, mieloma, rim de hamster jovem (BHK), He-La, VERO e tal; (2) células anfíbias, por exemplo, *Xenopus oocyte*; e (3) células de inseto, por exemplo, sf9, sf21, Tn5 e tais. Células vegetais conhecidas incluem células derivadas de *Nicotiana tabacum*, as quais podem ser cultivadas como calos. Células fúngicas conhecidas incluem leveduras tais como *Saccharomyces* (por exemplo, *S. cerevisiae*), fungos de mofo tais como *Aspergillus* (por exemplo, *A. niger*) e tais.

[0096] Sistemas de produção usando células procarióticas incluem aqueles usando células bacterianas, Células bacterianas conhecidas incluem *E. coli* e *Bacillus subtilis*.

[0097] Anticorpos podem ser obtidos pela introdução de um gene de anticorpo de interesse nessas células por transformação, e cultivando as células transformadas *in vivo*. O cultivo é efetuado de acordo com métodos conhecidos. Por exemplo, DMEM, MEM, RPMI1640, IMDM, podem ser usados como o meio de cultura, e suplementos de soro, tais como FCS, podem ser usados juntamente. Além disso uma célula introduzida com um gene de anticorpo pode ser introduzida na cavidade abdominal ou tal de um animal para produzir um anticorpo *in vivo*.

[0098] Por outro lado, sistemas de produção *in vivo* incluem aqueles que utilizam animais ou plantas. Sistemas de produção usando animais incluem aqueles que utilizam mamíferos ou insetos.

[0099] Mamíferos que podem ser usados incluem cabras, porcos, ovelhas, camundongos, bovinos e tais (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). Além disso, os insetos que podem ser usadas incluem bichos da seda. Ao usar plantas, por exemplo, tabaco pode ser usado.

[00100] Um gene de anticorpo é introduzido nesses animais ou plantas, e um anticorpo é produzido no corpo dos animais ou plantas e, a seguir, são recuperados. Por exemplo, o gene do anticorpo é preparado como um gene de fusão pela inserção do gene no meio de um gene codificando uma proteína, tal como uma β caseína de cabra, a qual é unicamente produzida no leite. Um fragmento de DNA compreendendo um gene de fusão inserido em um gene de anticorpo é injetado em um embrião de cabra, e o embrião é introduzido em uma cabra fêmea. O anticorpo desejado é obtido a partir do leite produzido a partir do animal transgênico nascido da cabra que recebeu o embrião, ou produzido a partir de progênias do animal. Para aumentar a quantidade de leite que contém o anticorpo desejado produzido a partir da cabra transgênica, hormônios podem ser apropriadamente usados na cabra transgênica (Ebert, K. M., et al., Bio/Technology (1994) 12, 699 a 702).

[00101] Além disso quando um bicho da seda é usado, ele é infectado com baculovírus inserido com o gene do anticorpo desejado, e o anticorpo desejado é obtido a partir do fluido corporal desse bicho da seda (Maeda, S. et al., Nature (1985) 315, 592 a 594). Além disso, quando tabaco é usado, o gene do anticorpo desejado é inserido em um vetor de expressão vegetal (por exemplo, pMON530) e o vetor é introduzido em uma bactéria tal como *Agrobacterium tumefaciens*. Essa bactéria é usada para infectar o tabaco (por exemplo, *Nicotiana tabacum*) para obter o anticorpo desejado das folhas desse tabaco (Julian, K. – C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131 a 138).

[00102] Ao produzir um anticorpo em sistemas de produção *in vitro* ou *in vivo* conforme descrito acima, DNAs codificando a cadeia pesada do anticorpo (cadeia H) e a cadeia leve (cadeia L) podem ser inseridos nos vetores de expressão separados e um hospedeiro é, a seguir, co-transformado com os vetores. Alternativamente, os DNAs podem ser inseridos em um único vetor de expressão para transformar um hospedeiro (vide a Publicação do Pedido de Patente Internacional Nº WO 94/11523).

[00103] Os anticorpos usados na presente invenção podem ser fragmentos de anticorpo ou seus produtos modificados contanto que eles possam ser adequadamente usados na presente invenção. Por exemplo, fragmentos de anticorpo incluem Fab, F(ab')₂, Fv e Fv de cadeia única (scFv) nos quais os Fvs das cadeias H e L serem ligadas através de um ligante apropriado.

[00104] Especificamente, os fragmentos de anticorpo são produzidos por tratar um anticorpo com uma enzima, por exemplo, papaína ou pepsina ou, alternativamente genes que codificam esses fragmentos são construídos, introduzidos em vetores de expressão, e expressos em uma célula hospedeira apropriada (vide, por exemplo, Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968 – 2976; Better, M. & Horwitz, A. H., Methods in Enzymology (1989) 178, 476 a 496; Plueckthum, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology (1989) 178, 497 a 515; Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652 a 663; Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663 a 666; Bird, R. E. et al., TIB-TECH (1991) 9, 132 a 137).

[00105] Um scFv pode ser obtido pela ligação da região V da cadeia H e pela região V da cadeia L de um anticorpo. No scFv, a região V da cadeia H e pela região V da cadeia L são ligadas através de um ligante, preferivelmente através de um ligante de peptídeo (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 5879 a 5883). As regi-

ões V das cadeias H e L em uma scFv podem ser derivadas de qualquer um dos anticorpos descritos acima. Ligantes peptídicos para ligação das regiões V incluem, por exemplo, um peptídeo de cadeia individual arbitrário consistindo de 12 a 19 resíduos de aminoácidos.

[00106] Um DNA codificando scFv pode ser obtido pelo uso de DNA codificando a cadeia H ou sua região V e o DNA codificando a cadeia L de sua região V dos anticorpos anteriormente mencionados como moldes, PCR amplificando a porção de DNA que codifica a sequência de aminoácidos desejada na sequência molde usando iniciadores que definem o terminal da porção, e a seguir amplificando adicionalmente a porção de DNA amplificada com um DNA codificando a porção do ligante de peptídeo e partes de iniciadores que ligam ambas as extremidades do ligante à cadeia H e à cadeia L.

[00107] Além disso, uma vez que um DNA codificando scFv tenha sido obtido, um vetor de expressão compreendendo o DNA e um hospedeiro transformado com o vetor pode ser obtido de acordo com métodos convencionais. Além disso, o scFv pode ser obtido de acordo com métodos convencionais usando o hospedeiro.

[00108] Semelhantemente conforme acima, esses fragmentos de anticorpo podem ser produzidos a partir do hospedeiro pela obtenção e expressão de seus genes. Aqui, “anticorpo” engloba esses fragmentos de anticorpo.

[00109] Como um anticorpo modificado, um anticorpo ligado a várias moléculas, tal como polietilenoglicol (PEG) pode ser usado. Aqui, “anticorpo” engloba esses anticorpos modificados. Esses anticorpos modificados podem ser obtidos pela modificação química dos anticorpos obtidos. Tais métodos são já estabelecidos na técnica.

[00110] Os anticorpos produzidos e expressados como acima podem ser isolados de dentro ou de fora da célula ou do hospedeiro, e purificados até a homogeneidade. O isolamento e/ou a purificação dos

anticorpos usados para a presente invenção pode ser efetuado por cromatografia de afinidade. Coluna a serem usadas para a cromatografia de afinidade incluem, por exemplo, a coluna de proteína A e a coluna de proteína G. Veículos usados para a coluna de proteína A incluem, por exemplo, HyperD, POROS, Sepharose F. F. e tais. Além dos acima, outros métodos usados para o isolamento e/ou purificação de proteínas comuns podem ser usados, e não são limitados de qualquer forma.

[00111] Por exemplo, os anticorpos usados para a presente invenção podem ser isolados e/ou purificados pela seleção apropriada e pela combinação das cromatografias além da cromatografia por afinidade, filtros, ultrafiltração, “salting-out”, diálise e tais. Cromatografias incluem, por exemplo, cromatografia de troca iônica, cromatografia hidrofóbica, filtração em gel e tais. Essas cromatografias podem ser aplicadas em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Alternativamente, HPLC de fase reversa pode ser usado.

[00112] A concentração dos anticorpos conforme obtidos acima pode ser determinada pela medição da absorvância, de ELISA ou tal. Especificamente, a absorvância é determinada pela diluição apropriada da solução de anticorpo com PBS(-), medindo a absorvância a 280 nm, e calculando a concentração ($1,35 \text{ OD} = 1 \text{ mg/mL}$). Alternativamente, ao usar ELISA, a medição pode ser efetuada como se segue. Especificamente, 100 μL de IgG anti-humana de cabra (TAG) diluída para 1 $\mu\text{g/mL}$, com tampão de bicarbonato 0,1 M (pH 9,6) são adicionados em uma placa de 96 cavidades (Nunc) e incubados de um dia para o outro a 4°C para imobilizar o anticorpo. Depois do bloqueio, 100 μL de um anticorpo apropriadamente diluído da presente invenção ou uma amostra apropriadamente diluída compreendendo o anticorpo, e a IgG humana (CAPPEL) são adicionadas como um padrão, e incubadas por uma hora em temperatura ambiente.

[00113] Depois da lavagem, 100 μ L de IgG anti-humana marcada com fosfatase alcalina diluída 5.000 x (BIO SOURCE) são adicionados e incubados por uma hora em temperatura ambiente. Depois de outra lavagem, a solução do substrato é adicionada e incubada, e a absorvância a 405 nm é medida usando MICROPLATE READER Modelo 3550 (Bio-Rad) para calcular a concentração do anticorpo de interesse.

[00114] As variantes IL-6 usadas na presente invenção são substâncias que têm a atividade de se ligar a um receptor de IL-6 e as quais não transmitem a atividade biológica da IL-6. Isto é, as variantes da IL-6 competem com a IL-6 para se ligar aos receptores IL-6, porém falham ao transmitir a atividade biológica da IL-6, bloqueando dessa forma a transdução de sinal mediada pela IL-6.

[00115] As variantes da IL-6 são produzidas pela introdução de mutações através da substituição dos resíduos de aminoácidos na sequência de aminoácidos da IL-6. A origem da IL-6 usada como a base das variantes da IL-6 não é limitada; entretanto, ela é preferivelmente a IL-6 humana ao considerar a sua antigenicidade a tais.

[00116] Mais especificamente, a substituição de aminoácidos é efetuada pela predição da estrutura secundária da sequência de aminoácidos da IL-6 usando programas de modelagem molecular conhecidos (por exemplo, WHATIF; Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52 a 56) e avaliando adicionalmente a influência do(s) resíduo(s) de aminoácido(s) substituído(s) na molécula inteira. Depois de determinar o resíduo de aminoácido apropriado para ser substituído, métodos de PCR comumente pré-formados são executados usando a sequência de nucleotídeos codificando do gene da IL-6 humana como um molde para introduzir mutações de forma que os aminoácidos são substituídos, e dessa forma um gene codificando uma variante da IL-6 é obtida. Caso necessário, esse gene é inserido em um vetor de expressão apropria-

do, e a variante da IL-6 pode ser obtida pela aplicação dos métodos anteriormente mencionados para a expressão, produção e purificação dos anticorpos recombinantes.

[00117] Exemplos específicos das variantes da IL-6 são descritos em Brakenhoff et al., J. Biol. Chem., (1994) 269, de 86 a 93, Savino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357 a 1367, WO 96/18648, e WO 96/17869.

[00118] Peptídeos parciais da IL-6 e peptídeos parciais dos receptores da IL-6 a serem usados na presente invenção são substâncias que têm a atividade de se ligar aos receptores da IL-6 e IL-6, respectivamente, e os quais não transmitem a atividade biológica da IL-6. a saber, pela ligação e captura de um receptor IL-6 ou IL-6, o peptídeo parcial da IL-6 ou o peptídeo parcial do receptor da IL-6 inibe especificamente a IL-6 da ligação ao receptor da IL-6. Como resultado, a atividade biológica da IL-6 não é transmitida, e dessa forma a transdução do sinal mediada pela IL-6 é bloqueada.

[00119] Os peptídeos parciais da IL-6 e do receptor da IL-6 são peptídeos que compreendem parte ou toda da seqüência de aminoácidos da região da seqüência de aminoácidos da IL-6 ou do receptor da IL-6 que está envolvida na ligação da IL-6 ou do receptor da IL-6. Tais peptídeos geralmente compreendem de 10 a 80, preferivelmente de 20 a 50, mais preferivelmente de 20 a 40 resíduos de aminoácidos.

[00120] Os peptídeos parciais da IL-6 ou os peptídeos parciais do receptor de IL-6 podem ser produzidos de acordo com métodos conhecidos gerais, por exemplo, técnicas de engenharia genética ou método de síntese de peptídeos, pela especificação da região da seqüência de aminoácidos da IL-6 ou do receptor da IL-6 que está envolvida na ligação da IL-6 ou do receptor da IL-6, e usando uma porção ou toda uma seqüência de aminoácidos da região especificada.

[00121] Ao preparar um peptídeo parcial da IL-6 ou um peptídeo parcial do receptor da IL-6 por um método de engenharia genética,

uma sequência de DNA codificando o peptídeo desejado é inserida em um vetor de expressão, e então o peptídeo pode ser obtido pela aplicação dos métodos anteriormente mencionados para expressar, produzir e purificar anticorpos recombinantes.

[00122] Para produzir um peptídeo parcial da IL-6 ou um peptídeo parcial do receptor da IL-6 por métodos de síntese de peptídeos, os métodos de síntese de peptídeos geralmente usados, por exemplo, métodos de síntese em fase sólida ou métodos de síntese em fase líquida podem ser usados.

[00123] Especificamente, a síntese pode ser efetuada seguindo 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 em fase sólida, por exemplo, o seguinte método pode ser empregado: o aminoácido correspondendo ao C terminal do peptídeo a ser sintetizado é ligado a um suporte que é insolúvel em solventes orgânicos, a seguir alongando o filamento peptídico pela repetição de modo alternado (1) da reação de condensação dos aminoácidos cujos grupos α -amino e grupos funcionais da cadeia ramificada são protegidos com grupos protetores apropriados um de cada vez na direção C- ou N-terminal; e (2) a reação de remoção dos grupos protetores dos grupos α -amino do aminoácido ou peptídeo ligado à resina. A síntese do peptídeo em fase sólida é amplamente classificada no método Boc e o método Fmoc baseando-se no tipo de grupo protetor usado.

[00124] Depois da proteína de interesse ser sintetizada conforme acima, a reação de desproteção e a reação para clivar o filamento peptídico do suporte são executados. Para a reação de clivagem do filamento peptídico, em geral, fluoreto de hidrogênio ou ácido trifluorometanossulfônico é usado para o método Boc, e TFA para o método Fmoc. De acordo com o método Boc, por exemplo, a resina peptídica

protegida mencionada acima é tratada em fluoreto de hidrogênio sob a presença de anisol. A seguir, o peptídeo é recuperado pela remoção do grupo protetor e pela clivagem do peptídeo do suporte. Por liofilização do peptídeo recuperado, um peptídeo bruto pode ser obtido. Por outro lado, no método de Fmoc, por exemplo, a reação de desproteção e a reação para clivar o filamento peptídico do suporte podem ser efetuadas em TFA por um método similar ao descrito acima.

[00125] O peptídeo bruto obtido pode ser separado e/ou purificado por aplicação de HPLC. A eluição pode ser efetuada sob condições ótimas usando um sistema de solvente água-acetonitrila, o qual é geralmente usado para a purificação de proteína. As frações correspondendo aos picos do perfil cromatográfico obtido são coletadas e liofilizadas. Dessa forma, as frações peptídicas purificadas são identificadas por análise de peso molecular através da análise do espectro de massas, da análise da composição de aminoácidos, da análise da sequência de aminoácidos ou tal.

[00126] Exemplos específicos de peptídeos parciais de IL-6 e de peptídeos parciais do receptor da IL-6 são descritos na JP-A Hei 2-188600, na JP-A Hei 7-324097, na JP-A Hei 8-311098, e na Publicação de Patente U.S. Nº US 5210075.

[00127] Os anticorpos usados na presente invenção também podem ser anticorpos conjugados os quais são ligados a várias moléculas, tais como polietilenoglicol (PEG), substâncias radioativas e toxinas. Tais anticorpos conjugados podem ser obtidos pela modificação química dos anticorpos modificados. Métodos para modificar anticorpos são já estabelecidos na técnica. Os “anticorpos” da presente invenção englobam esses anticorpos conjugados.

[00128] Os agentes para tratar enfarte do miocárdio e agentes para suprimir o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio na presente invenção podem ser usados para tratamentos

de enfarte do miocárdio.

[00129] Aqui, “tratado enfarte do miocárdio” significa suprimir ou prevenir os sintomas do enfarte do miocárdio, e a falência cardíaca e a arritmia severa induzida por isquemia, as quais ocorrem como complicações do enfarte do miocárdio.

[00130] Sintomas de complicação do enfarte do miocárdio incluem arritmia (extra-sistólica, fibrilação ventricular e bloqueio atrioventricular), falência cardíaca, ruptura muscular papilar, ruptura cardíaca, aneurisma ventricular (o qual é formado no ápice cardíaco como resultado do enfarte na ramificação descendente anterior da artéria coronária esquerda) e a síndrome do enfarte pós-miocardial. Os “agentes para tratar enfarte do miocárdio” da presente invenção podem suprimir e prevenir os sintomas descritos acima.

[00131] Entretanto, aqui, o termo “supressão do remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio” significa suprimir ou prevenir a hipertrofia miocardial (dilatação do ventrículo esquerdo inteiro) que ocorre para compensar o dano funcional da área enfartada.

[00132] A hipertrofia do miocárdio ocorre quando células do músculo cardíaco em áreas enfartadas são deslocadas com um tecido fibroso, tal como fibras de colágeno, como resultado da necrose e/ou esfoliação das células e o tecido fibroso é finamente estendido. Dessa forma, a supressão e prevenção do “deslocamento da área enfartada com fibras de colágeno” e “a extensão do tecido fibroso”, isto é, a melhoria da condição da área enfartada, também são incluídos no sentido de “suprimir o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio” descrito acima.

[00133] Se os sintomas do enfarte do miocárdio e do remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio são suprimidos ou não pode ser determinado usando a atividade da mieloperoxidase

(MPO) em áreas enfartadas e não-enfartadas do músculo cardíaco como um indicador. MPO é uma enzima presente nos grânulos intracelulares de neutrófilos e sua atividade é conhecida como sendo significativamente elevada devido às doenças da artéria coronária. Isto é, quando a atividade do MPO é suprimida pela administração de um agente da presente invenção, os sintomas do enfarte do miocárdio e do remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio podem ser considerados como estando suprimidos. A atividade da MPO pode ser determinada por métodos conhecidos, os quais incluem, por exemplo, os métodos de medição descritos nos Exemplos.

[00134] Alternativamente, se os sintomas do enfarte do miocárdio e o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio são suprimidos ou não também pode ser determinado usando a expressão da MCP-1 (proteína quimioatratadora de monócito) em áreas enfartadas e não-enfartadas do músculo cardíaco como um indicador. MCP-1 é uma quimiocina que pode causar a falência cardíaca pelo recrutamento de macrófagos para o músculo cardíaco e aumentando a expressão de citocinas inflamatórias. MCP-1 é conhecido por ativar a inflamação e induzir a fibrose do músculo cardíaco e dos tecidos perivasculares. O espalhamento ou o agravamento (necrose e tal) da área enfartada aumentam a expressão da MCP-1. Especificamente, quando a expressão da MCP-1 é suprimida, os sintomas do enfarte do miocárdio e o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio podem ser considerados como estando suprimidos. A expressão da MCP-1 pode ser medida por métodos conhecidos para medir a expressão da proteína, os quais incluem, por exemplo, Western blotting e ELISA.

[00135] As frases “suprimindo a atividade da MPO” e “suprimindo a expressão da MCP-1” também significam “melhorando a condição da área enfartada” mencionada acima.

[00136] Além disso, a supressão dos sintomas do enfarte do miocárdio e o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio podem também ser determinados pela medição da dimensão diastólica final ventricular esquerda e a fração de ejeção por ecocardiografia, ou a avaliação quantitativa do grau de fibrose do miocárdio e de hipertrofia dos cardiomiócitos por exame histológico dos tecidos cardíacos. Tais medições podem ser alcançadas usando métodos conhecidos. Tais métodos incluem, por exemplo, os métodos descritos nos Exemplos.

[00137] Na presente invenção, a atividade dos inibidores da IL-6 na inibição da transdução do sinal da IL-6 pode ser avaliada por métodos convencionais. Especificamente, a IL-6 é adicionada em culturas de linhagens celulares de mieloma humano dependentes de IL-6 (S6B45 e KPMM2), na linhagem celular de linfoma T de Lennert humana ou na linhagem celular dependente de IL-6 MH60.BSF2; e a captação de timidina-³H pelas células dependentes de IL-6 é medida na presença de um inibidor da IL-6. Alternativamente, células U266 expressando receptor da IL-6 são cultivadas, e o inibidor da IL-6 e a IL-6 marcada com ¹²⁵I são adicionados a cultura ao mesmo tempo; e, a seguir, a IL-6 marcada com ¹²⁵I ligada às células expressando o receptor da IL-6 é quantificada. Além do grupo inibidor da IL-6, um grupo de controle negativo que não contém o inibidor da IL-6 é incluído no sistema de ensaio descrito acima. A atividade do inibidor da IL-6 em relação ao inibidor da IL-6 pode ser avaliada pela comparação dos resultados de ambos os grupos.

[00138] Conforme mostrado abaixo nos Exemplos, a administração de um anticorpo receptor anti-IL-6 foi descoberta como supressora dos sintomas do enfarte do miocárdio e do remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio. Essa descoberta sugere que os inibidores da IL-6, tais como os anticorpos receptores anti-IL-6, são

úteis como agentes para tratar enfarte do miocárdio e agentes para suprimir o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio.

[00139] Indivíduos a serem administrados com os agentes da presente invenção para tratar enfarte do miocárdio e agentes da presente invenção para suprimir o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio são mamíferos. Os mamíferos são preferivelmente seres humanos.

[00140] Os agentes da presente invenção para tratar enfarte do miocárdio e agentes da presente invenção para suprimir o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio podem ser administrados como medicamentos, e podem ser administrados sistemicamente ou localmente através da administração oral ou parenteral. Por exemplo, a injeção intravenosa como a infusão por gotejamento, a injeção intramuscular, a injeção intraperitoneal, a injeção subcutânea, supositório, enema, comprimidos entéricos orais ou semelhantes podem ser selecionados. Um método de administração apropriado pode ser selecionado dependendo da idade do paciente e dos sintomas. A dose eficaz por administração é selecionada da faixa de 0,01 até 100 mg/Kg de peso corporal. Alternativamente, a dose pode ser selecionada da faixa de 1 até 1000 mg/paciente, preferivelmente da faixa de 5 a 50 mg/paciente. Uma dose e um método de administração preferidos são como se segue: por exemplo, quando um anticorpo receptor anti-IL-6 é usado, a dose eficaz é uma quantidade tal que o anticorpo livre está presente no sangue. Especificamente, uma dose de 0,5 a 40 mg/Kg de peso corporal/mês (quatro semanas), preferivelmente de 1 a 20 mg/Kg de peso corporal/mês é administrada através de injeção intravenosa tal como por infusão por gotejamento, por injeção subcutânea ou tal, de uma 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 cronograma de administração pode ser ajustado, por exemplo, pela extensão do intervalo de administração de duas vezes por semana ou de uma vez por semana até uma vez a cada duas semanas, uma vez a cada três semanas ou uma vez a cada quatro semanas, durante o monitoramento da condição depois do transplante e das alterações nos valores de teste sanguíneo.

[00141] Na presente invenção, os agentes para tratar enfarte do miocárdio e agentes para suprimir o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio podem conter veículos farmacologicamente aceitáveis, tais como conservantes e estabilizantes. Os “veículos farmacologicamente aceitáveis” se referem aos materiais que podem ser co-administrados com um agente descrito acima; e podem ou não produzir por si só o efeito acima descrito de supressão dos sintomas do enfarte do miocárdio e do remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio. Alternativamente, os veículos podem ser materiais que não têm o efeito de suprimir os sintomas do enfarte do miocárdio e do remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio, porém produzem um efeito estabilizante aditivo ou sinérgico quando usados em combinação com um inibidor da IL-6.

[00142] Tais materiais farmacologicamente aceitáveis incluem, por exemplo, água estéril, salina fisiológica, estabilizantes, excipientes, tampões, conservantes, detergentes, agentes quelantes (EDTA e tais) e ligantes.

[00143] Na presente invenção, detergentes incluem detergentes não-iônicos, e exemplos típicos de tais incluem ésteres de ácido graxo de sorbitano tais como monocaprilato de sorbitano, monolaurato de sorbitano e monopalmitato de sorbitano; ésteres de ácido graxo de glicerina, tais como monocaprilato de glicerina, monomiristato de glicerina e monoestearato de glicerina; ésteres de ácido graxo de poliglicerina

na tais como monoestearato de decaglicerila, diestearato de decaglicerila e monolinoleato de decaglicerila; ésteres de ácido graxo de polioxietilenossorbitano tais como monolaurato de polioxietilenossorbitano, monoleato de polioxietilenossorbitano, monoestearato de polioxietilenossorbitano, monopalmitato de polioxietilenossorbitano, trioleato de polioxietilenossorbitano e triestearato de polioxietilenossorbitano; ésteres de ácido graxo de polioxietilenossorbit, tais como tetraestearato de polioxietilenossorbit e tetraoleato de polioxietilenossorbit; ésteres de ácido graxo de polioxietilenoglicerina, tais como monoestearato de polioxietilenoglicerila, ésteres de ácido graxo de polietilenoglicol, tais como diestearato de polietilenoglicol; alquil éteres de polioxietileno tais como de lauril éter polioxietileno; alquil ésteres de polioxietilenopolioxipropileno, tais como polioxietilenopolioxipropilenoglicol, éter de polioxietilenopolioxipropilenopropil e éter polioxietilenopolioxipropilenocetílico; alquilfeniléteres de polioxietileno tais como nonilfeniléter de polioxietileno; óleos de castóreo endurecidos de polioxietileno, tais como óleo de castóreo de polioxietileno e óleo de castóreo endurecido de polioxietileno (óleo de castóreo hidrogenado de polioxietileno); derivados de cera de abelha de polioxietileno tais como cera de abelha de polioxietilenossorbit; derivados de polioxietilenolanolina, tal como polioxietilenolanolina; e amidas de ácidos graxos de polioxietileno, e tais como um HLB de 6 a 18, tal como a amida do ácido polioxietilenoesteárico.

[00144] Detergentes também incluem detergentes aniônicos, e exemplos típicos de tais incluem, por exemplo, alquilsulfatos com um grupo alquila com 10 a 18 átomos de carbono, tais como cetilsulfato de sódio, laurilsulfato de sódio e oleilsulfato de sódio; alquil éter sulfatos de polioxietileno, nos quais o grupo alquil tem de 10 a 18 átomos de carbono e o número molar médio de óxido de etileno adicionado é de 2 a 4, tal como polioxietileno laurilsulfato de sódio; sais do éster de alquilsulfossuccinato com um grupo alquila com 8 a 18 átomos de carbono,

tais como éster de laurilsulfossuccinato de sódio; detergentes naturais, por exemplo, lecitina; glicerofosfolipídeos; esfingofosfolipídeos, tal como esfingomielina; e ésteres de ácido graxo de sacarose, nos quais os ácidos graxos têm de 12 a 18 átomos de carbono.

[00145] Um, dois ou mais dos detergentes descritos acima podem ser combinados e adicionados aos agentes da presente invenção. Detergentes que são preferivelmente usados nas preparações da presente invenção incluem ésteres do ácido graxo de polioxietilenossorbitano, tais como polissorbato 20, 40, 60 e 80. Polissorbato 20 e 80 são particularmente preferidos. Polioxietilenopolioxipropilenoglicóis, tais como poloxâmero (Pluronic F-68® e tais) também são preferidos.

[00146] A quantidade de detergente adicionada varia dependendo do tipo de detergente usado. Quando polissorbato 20 ou 80 é usado, a quantidade está, em geral, na faixa de 0,001 até 100 mg/mL, preferivelmente na faixa de 0,03 até 50 mg/mL, mais preferivelmente na faixa de 0,005 até 2 mg/mL.

[00147] Na presente invenção, tampões incluem fosfato, tampão citrato, ácido acético, ácido málico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido láctico, fosfato de potássio, ácido glucônico, ácido cáprico, ácido desoxicólico, ácido salicílico, trietanolamina, ácido fumárico e outros ácidos orgânicos; e tampão de ácido carbônico, tampão Tris, tampão de histidina e tampão de imidazol.

[00148] Preparações líquidas podem ser formuladas pela dissolução dos agentes em tampões aquosos conhecidos no campo das preparações líquidas. A concentração de tampão está, 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.

[00149] Os agentes da presente invenção também podem compreender outros polipeptídeos de baixo peso molecular; proteínas, tais como albumina do soro, gelatina e imunoglobulina; aminoácidos; açú-

cares e carboidratos, tais como polissacarídeos e monossacarídeos, alcoóis de açúcar, e tais.

[00150] Aqui, aminoácidos incluem aminoácidos básicos, por exemplo, arginina, lisina, histidina e ornitina, e sais inorgânicos desses aminoácidos (preferivelmente sais de cloridrato, e sais de fosfato, a saber, aminoácidos de fosfato). Quando aminoácidos livres são usados, o pH é ajustado até um valor preferido pela adição de substâncias tamponantes fisiologicamente aceitáveis apropriadas, por exemplo, ácidos inorgânicos, particularmente ácido clorídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido acético e ácido fórmico, e seus sais. Nesse caso, o uso de fosfato é particularmente benéfico porque ele proporciona produtos liofilizados muito estáveis. Fosfato é particularmente vantajoso quando preparações não contêm substancialmente ácidos orgânicos, tais como ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico e ácido fumárico, ou não contêm os ânions correspondentes (íon malato, íon tartarato, íon citrato, íon succinato, íon fumarato e tais). Aminoácidos preferidos são a arginina, a lisina, a histidina e a ornitina. Além disso, é possível usar aminoácidos ácidos, por exemplo, ácido glutâmico e ácido aspártico, e seus sais (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 seu derivado, N-acetiltryptofano.

[00151] Aqui, açúcares e carboidratos, tais como polissacarídeos e monossacarídeos incluem, por exemplo, dextrana, glicose, frutose, lactose, xilose, manose, maltose, sacarose, trealose e rafinose.

[00152] Aqui, alcoóis de açúcar incluem, por exemplo, manitol, sorbitol e inositol.

[00153] 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 adjuvantes (tais como D-sorbitol, S-manose, D-manitol e cloreto de sódio). As soluções aquosas podem ser usadas juntamente com agentes solubilizantes apropriados tais como alcoóis (etanol e similares), polialcoóis (propilenoglicol, PEG e semelhantes) ou detergentes não-iônicos (polissorbato 80 e HCO-50).

[00154] Os agentes podem ainda compreender, caso desejado, diluentes, solubilizantes, ajustadores de pH, agentes aliviantes, agentes redutores contendo enxofre, antioxidantes e semelhantes.

[00155] Aqui, os agentes redutores contendo enxofre incluem, por exemplo, compostos compreendendo grupos sulfidril, tais como N-acetilcisteína, N-acetilmonocisteína, ácido tióctico, tiodiglicol, tioetanolamina, tioglicerol, tiosorbitol, ácido tioglicólico e seus sais, tiosulfato de sódio, glutathione e ácidos tioalcanóicos com de 1 a 7 átomos de carbono.

[00156] Além disso, os antioxidantes na presente invenção incluem, por exemplo, ácido eritórlico, dibutilidroxitolueno, butilidroxianisol, α -tocoferol, acetato de tocoferol, Ácido L-ascórbico e seus sais, palmitato do ácido L-ascórbico, estearato do ácido L-ascórbico, hidrogenossulfito de sódio, sulfito de sódio, galato de triamila, galato de propila e agentes quelantes tais como etilenodiaminotetracetato dissódico (EDTA), pirofosfato de sódio e metafosfato de sódio.

[00157] Caso requerido, os agentes podem ser encapsulados em microcápsulas (microcápsulas de hidroximetilcelulose, gelatina, ácido (poli)metilmetacrílico ou tal) ou preparados como sistemas de distribuição de fármacos coloidais (lipossoma, microesferas de albumina, microemulsão, nanopartículas, nanocápsulas e similares) (vide "Remington's Pharmaceutical Science 16ª edição", Oslo Ed., 1980 e semelhantes). Além disso, métodos para preparar agentes como agentes de li-

beração sustentada também são conhecidos, e são aplicáveis para a presente invenção (Lauger et al., J. Biomed. Mater. Res. 1981, 15:167 a 277; Langer, Chem. Tech. 1982, 12: 98 a 105; Patente U.S. Nº 3.773.919; Pedido de Patente Européia Nº (EP) 58.481; Sidman et al., Biopolymers 1983, 22: 547 a 556; e EP 133.988).

[00158] Veículos farmacologicamente aceitáveis usados são apropriadamente selecionados daqueles descritos acima ou combinados dependendo do tipo da forma de dosagem, porém não são limitados a elas.

[00159] A presente invenção se refere aos métodos para tratar enfarte do miocárdio em indivíduos e métodos para suprimir o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio, ambos os quais compreendem a etapa de administrar um inibidor da IL-6 a indivíduos os quais tenham desenvolvido enfarte do miocárdio.

[00160] Aqui, o “indivíduo” se refere a organismos e a partes corporais dos organismos a serem administradas com um agente da presente invenção para tratar enfarte do miocárdio ou um agente da presente invenção para suprimir o remodelamento ventricular esquerdo depois do enfarte do miocárdio. Os organismos incluem animais (por exemplo, seres humanos, espécies de animais domésticos e animais selvagens, porém não são particularmente limitados).

[00161] As “partes corporais dos organismos” não são particularmente limitadas, porém preferivelmente incluem coração, músculo cardíaco e áreas enfartadas e não-enfartadas em enfartes miocárdiais.

[00162] Aqui, “administração” inclui administrações oral e parenteral. Administração oral inclui, por exemplo, a administração de agentes orais. Tais agentes orais incluem, por exemplo, grânulos, pós, comprimidos, cápsulas, soluções, emulsões e suspensões.

[00163] Administração parenteral inclui, por exemplo, a administração de injeções. Tais injeções incluem, por exemplo, injeção subcutâ-

nea, injeção intramuscular e injeção intraperitoneal. Entretanto, os efeitos dos métodos da presente invenção podem ser alcançados pela introdução de genes compreendendo oligonucleotídeos a serem administrados em corpos vivos usando técnicas de terapia genética. Alternativamente, os agentes da presente invenção podem ser administrados localmente em áreas tencionadas de tratamento. Por exemplo, os agentes podem ser administrados por injeção local durante cirurgia, o uso de catéteres ou de distribuição de gele alvejada de DNA codificando um peptídeo da presente invenção. Os agentes da presente invenção podem ser administrados juntamente com o tratamento para ocorrência de enfartes de miocárdio, por exemplo, cirurgia por catéter (angioplastia coronariana transluminal percutânea (PTCA) e intervenção coronária percutânea (PCI)), recanalização coronariana transluminal percutânea (PTCR), enxerto de atalho da artéria coronária (CABG) e semelhantes.

[00164] Quando os métodos da presente invenção são efetuados, os agentes da presente invenção podem ser administrados como parte de uma composição farmacêutica juntamente com pelo menos um quimioterapêutico conhecido. Alternativamente, os agentes da presente invenção podem ser administrados juntamente com pelo menos um imunossupressor conhecido. Em uma modalidade, os agentes da presente invenção e os quimioterapêuticos conhecidos podem ser praticamente administrados ao mesmo tempo.

[00165] Todas as referências da técnica anterior citadas aqui são incorporadas aqui por referência.

Exemplos

[00166] Aqui abaixo, a presente invenção será especificamente descrita com referência aos Exemplos, mas não é para ser construída como estando limitada a eles.

Exemplo 1 - Preparação de um modelo de camundongo de enfarte do miocárdio

[00167] Camundongos Balb/c machos (25 a 30 g) foram traquealmente entubados. Os camundongos estavam em um respirador artificial e foram anestesiados por inalação de 0,5 a 1,0% de isoflurano. O peito esquerdo foi aberto. Depois da ligação da artéria coronária descendente anterior esquerda, o peito foi fechado. Os camundongos foram agrupados em grupo administrado com MR16-1 (grupo MR16-1) e grupo não-tratado (grupo controle). O grupo administrado com MR16-1 foi submetido à administração intraperitoneal de MR16-1 em uma dose de 500 µg/corpo.

Exemplo 2 - Medição da atividade da MPO

[00168] Os corações foram extraídos dos camundongos dois dias depois dos enfartes do miocárdio serem criados (ou ligação coronariana). Os corações foram divididos na área enfartada e na área não-enfartada, e picados. A seguir, o músculo cardíaco picado foi combinado com 10 volumes de tampão KPO₄ 50 mM (pH 6,0), contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio. O músculo picado foi homogeneizado (POLYTRON, KINEMATICAAG, Luzern, Suíça) e a seguir submetido ao ultra-som.

[00169] O extrato resultante foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. Depois de 50 µL do sobrenadante resultante, foi misturado com 1,45 mL de solução de substrato (KPO₄ 50 mM (pH 6,0), 0,167 mg/mL de dicloridrato de o-dianisidina, e H₂O₂ 0,005%), as alterações na cor da solução do substrato foram monitoradas por absorvância a 460 nm (coeficiente de extinção = 2,655).

[00170] Como resultado, a atividade da MPO do músculo cardíaco não apresentou diferença entre o músculo cardíaco não-enfartado e o músculo cardíaco do grupo operado de modo simulado, porém aumentou significativamente em cerca de quatro vezes na área enfartada (risco não-controle de $0,037 \pm 0,006$; risco de controle de $0,122 \pm 0,035$; $p < 0,01$). Entretanto esse aumento da atividade da MPO na área enfartada foi significativamente suprimido no grupo administrado com MR16 (risco de MR16-1 de $0,034 \pm 0,008$; $p < 0,05$ contra risco de controle).

Exemplo 3 - Ensaio de expressão da MCP-1

[00171] Os corações foram extraídos dos camundongos dois dias depois da criação do enfarte do miocárdio. Os corações foram divididos em área enfartada e em área não-enfartada, e foram picados. O músculo cardíaco picado foi combinado com tampão de lise (2 x PBS, NP-40 1%, desoxicolato de sódio 0,5%, dodecilsulfato de sódio 0,1%, PMSF 1 mM, de coquetel inibidor da protease 1% (Nacalai Tesque), e a seguir homogeneizado. O extrato foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi usado como um lisato celular total para quantificar a concentração de proteína pelo método Lowry. Volumes iguais da solução de proteína foram separados em um gel de poliacrilamida de 12%, e as proteínas foram transferidas em uma membrana PVDF Immun-Blot®. A membrana foi, a seguir, incubada com anticorpo anti-MCP-1 (1:30, IBL Co.) como o anticorpo primário a 4°C de um dia para o outro, e a seguir incubada com IgG anticoelho de cabra (1:400; Sinalização celular) como o anticorpo secundário em temperatura ambiente por duas horas. A expressão da MCP-1 foi detectada por quimiluminescência usando ECL (Amersham Bioscience, Buckinghamshire, R.U.). A análise de imagem da fotografia foi executada usando um programa de computador (Scion Image Frame Grabber Status).

[00172] O resultado mostrou que a expressão da MCP-1 do músculo cardíaco foi aumentada tanto nas áreas enfartadas quanto não-enfartadas no grupo de controle, porém muito mais na área enfartada. Por outro lado, o aumento da expressão da MCP-1 foi suprimido em ambas as áreas no grupo administrado com MR16-1.

Exemplo 4 - Ecocardiografia

[00173] Quatro semanas depois do enfarte do miocárdio ser criado, os corações foram examinados por ecocardiografia sob anestesia para determinar o diâmetro da extremidade diastólica ventricular esquerda e o encurtamento fracional (FS).

[00174] O resultado da ecocardiografia quatro semanas depois da criação do enfarte do miocárdio mostrou que o diâmetro da extremidade diastólica ventricular esquerda no grupo de controle foi significativamente aumentada em comparação com o grupo simulado. Esse aumento (no diâmetro ventricular esquerdo) foi significativamente suprimido pela administração de MR16-1. Além disso, enquanto o FS foi reduzido depois do enfarte do miocárdio (foi criado), ele foi significativamente melhorado pela administração de MR16-1 (grupo de controle $18,5 \pm 2,9\%$ vs. o grupo MR16-1 $28,5 \pm 1,8\%$; $p < 0,05$).

Exemplo 5 - Avaliação histológica

[00175] Os corações foram extraídos dos camundongos quatro semanas depois da criação do enfarte do miocárdio, fixados com tampão de paraformaldeído-fosfato 4% e, a seguir, embebidos em parafina. Os corações foram divididos e, a seguir, manchados com tricroma de Masson para avaliar quantitativamente o grau de fibrose cardíaca e hipertrofia dos miócitos cardíacos na seção do eixo curto do músculo cardíaco na área não-enfartada.

[00176] Como resultado, a hipertrofia dos miócitos cardíacos e da fibrose estromal foi descoberta na área não-enfartada no grupo de controle. Ao contrário, esses sintomas foram suprimidos no grupo ad-

ministrado com MR16-1.

Aplicabilidade industrial

[00177] A expansão do enfarte do miocárdio e/ou o agravo podem induzir a complicações de falência cardíaca e/ou arritmia severa induzida por isquemia, os quais aumentam a ameaça à vida. Os agentes da presente invenção para tratar enfarte do miocárdio, agentes para suprimir a remodelagem ventricular esquerda depois do enfarte do miocárdio e métodos para tratar ou prevenir o enfarte do miocárdio podem suprimir os sintomas de complicação em enfarte do miocárdio e alcançar um tratamento eficaz.

[00178] A taxa de ocorrência na remodelagem ventricular esquerda depois do enfarte do miocárdio também é sugerida como estando relacionada ao tamanho da área enfartada, e é considerada como sendo importante para melhorar a condição e prevenir que a área enfartada aumente em um estágio inicial do início do enfarte do miocárdio. Além dos sintomas complicadores do enfarte do miocárdio, o remodelamento ventricular esquerdo pode ser suprimido pela administração de um agente da presente invenção que compreende um inibidor da IL-6 como um ingrediente ativo ao paciente de um estágio inicial do enfarte do miocárdio.

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um anticorpo que reconhece a IL-6, caracterizado pelo fato de que é para a produção de uma composição farmacêutica para:

- a) tratar o enfarte do miocárdio; ou
- b) suprimir a remodelagem ventricular esquerda depois do enfarte do miocárdio.

2. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo monoclonal.

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

4. Uso, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo recombinante.

5. Uso, de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo quimérico, um anticorpo humanizado ou um anticorpo humano.