



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

05-96786

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO AGENTE TERAPÉUTICO PARA DAÑO DE ESPINA
DORSAL QUE COMPRENDE ANTAGONISTA DE INTERLEUCINA-6

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 49/00; A61K 39/395
A61P 19/00; A61P 25/00; A61P 43/00

71. SOLICITANTE CHUGAI SEIYAKU KAGAKU KOGYO K. K. Y KEIO
UNIVERSITY

DOMICILIO TOKIO, JAPÓN, RESPECTIVAMENTE.

74. APODERADO CARLOS FERRERO
CE. 438.019 LAUSANNA.

22. BOGOTÁ, D. C., 23/00/2005.

SS


Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

 Indicación: 2005-69-86 00000000 Folios: 145 acción
 Fecha (ARO): 2005-09-23 17:30:45
 Remite: 211 PCT-PATENT 479 (ASE NCI) 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2400 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

**FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT**
ENTRADA EN FASE NACIONAL 24-09-05
SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

 Nombre: CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI
 KAISHA y KEIO UNIVERSITY
 instituciones constituidas y existentes bajo
 las leyes de Japón

 Dirección: 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku,
 Tokio 115-8543, Japón
 y
 15-45, Mita 2-chome, Minato-ku,
 Tokio 108-8345, Japón,
 respectivamente

Domicilio: Tokio, Japón, Respectivamente

IDENTIFICACIÓN

 C.C. ☐ NIT ☐
 C.E. ☐ Otro ☐
 Cual _____
 Número _____

3

**REPRESENTANTE
APODERADO**

 Nombre: EMILIO FERRERO
 Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
 Teléfono: 347 38 11
 Fax: 211 86 50
 E-mail: clientes@camyp.com
 Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

 C.C. ☒ NIT ☐
 C.E. ☐ Otro ☐
 Cual _____
 Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

 1. Hideyuki OKANO
 Keio University School of Medicine,
 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku,
 Tokio 160-8582
 Japón

 3. Masaya NAKAMURA
 Keio University School of Medicine,
 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku,
 Tokio 160-8582
 Japón

 2. Seiji OKADA
 Keio University School of Medicine,
 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku,
 Tokio 160-8582
 Japón

 4. Kazuyuki YOSHIZAKI
 8-22, Motoyamanakamachi 2-chome,
 Higashinada-ku, Kobe-shi
 Hyogo 658-0016
 Japón

5

PCT (86)

 Solicitud Internacional No. PCT/JP2004/002111

 Fecha: 24 de Febrero 2004

 Publicación Internacional No. WO 2004/073741 A1

 Fecha: 2 de Septiembre 2004

6

Título (54)
**AGENTE TERAPÉUTICO PARA DAÑO DE ESPINA DORSAL QUE COMPRENDE
ANTAGONISTA DE INTERLEUCINAS-6**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 45/00, 39/395, A61P 19/00, 25/00, 43/00

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

 SI ☒ NO ☐
JP
24 de Febrero 2003
2003-046214

9

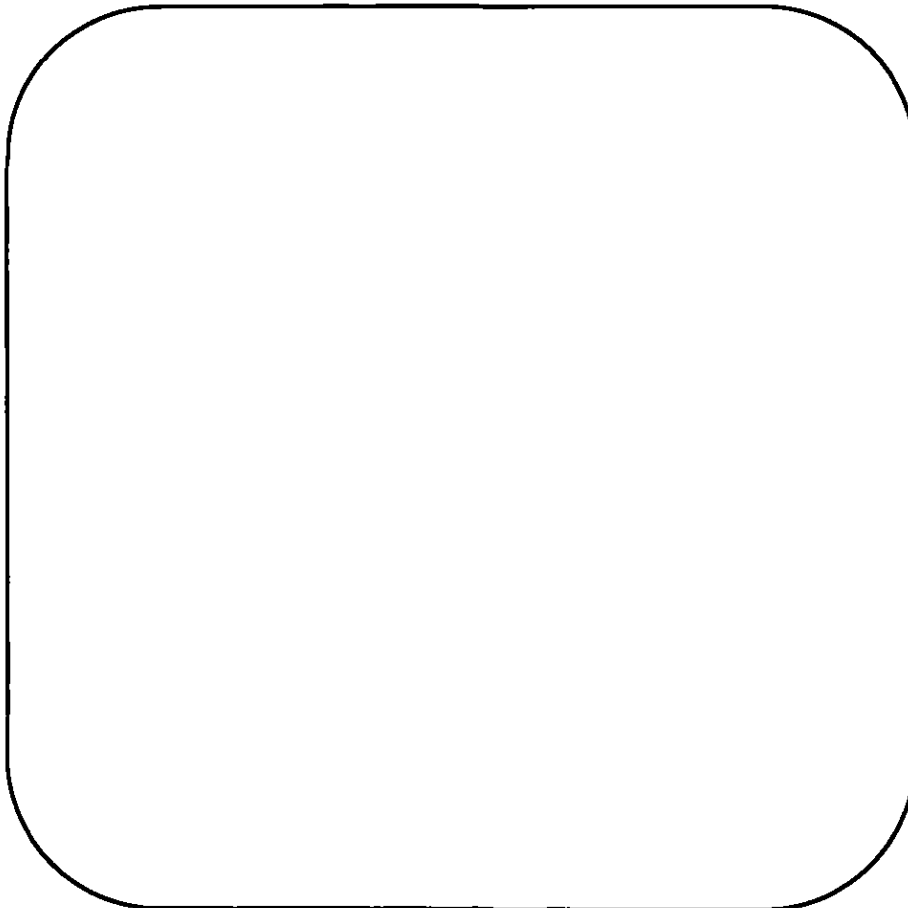
Comprobante de pago No.: 05-69.908
Fecha: 12 de Septiembre 2005

10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 443.000.00.
 - ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
 - ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
 - ☒ Poder de la compañía Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha
 - ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
 - ☐ Declaraciones.
 - ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
 - ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
 - ☒ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA **SIN ANEXOS**
 - ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
 - ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
 - ☐ De ser el caso, documento que acredita la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
 - ☒ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico. Números de acceso de Microorganismos: NCIMB 40362, NCIMB 40366, FERM BP-299 8, FERM BP- 5875, FERM BP-2232
 - ☐ Arte final 12x12
 - ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
 - ☒ Otros: VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS
- EXTRACTO DE PUBLICACIÓN**

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

N MBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA :

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

FCC

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ **Publicación Internacional WO 2004/073741 A1**

Descripción:

Páginas 42 en el idioma original

Páginas 51 en español

Reivindicaciones: Número (s) 36

Figuras: Número (s) 5

2. ☒ **Forma PCT/RO/101. PCT Request**
3. ☐ **Forma PCT/RO/106. Invitation to Correct Defects.**
4. ☒ **Forma PCT/ISA/210. Informe de Búsqueda Internacional.**
5. ☐ **Forma PCT/ISA/220. Notificación De La Transmisión Del Informe De Búsqueda Internacional Y De La Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional, O De La Declaración.**
6. ☐ **Forma PCT/ISA/237. Opinión Escrita De La Administración Encargada De La Búsqueda Internacional.**
7. ☐ **Forma PCT/IB/304. Notification Concerning Submission Or Transmittal Of Priority Document.**
8. ☐ **Forma PCT/IB/306. Notification Of The Recoding Of A Change.**
Descripción De Modificación:

9. ☒ **Forma PCT/IB/308. Notice Informing The Applicant Of The Communication Of The International Application To The Designated Offices.**
10. ☒ **Forma PCT/IB/311. Notification Concerning Transmittal of Copy of International Application as Published or Republished.**
11. ☐ **Forma PCT/IB/332. Information Concerning Elected Offices Notified Of Their Election.**
12. ☐ **Forma PCT/IPEA/401. PCT Demand**
13. ☐ **Forma PCT/IPEA/402. Notification Of Receipt Of Demand By Competent International Preliminary Examining Authority.**
14. ☐ **Forma PCT/IPEA/408. Written Opinion.**
15. ☐ **Forma PCT/IPEA/416. Notification Of Transmittal Of The International Preliminary Examination Report.**
16. ☒ **Forma PCT/IPEA/409. Informe Del Examen Preliminar Internacional. SIN ANEX S**
17. ☐ **Traducción Al Español Del Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
18. ☐ **Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional.**

SW 4

CAVELIER

179

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 46 N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias.

Representation and Power-of-Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

14419
0780

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

domiciliado (s) en/of 5-1, Ukima 5-chome,

Kita-ku, Tokyo 115-8543 Japan, hereby ratify the patent

application No. 04.090.189 filed by EMILIO FERRERO on September 10, 2004 and

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO FERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4° N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

In due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO FERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4° N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, with the certificate of impediment. If any of the appointees were to be absent or impeded, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken upon in their stead by the principal, the first or second alternate in their turn, or both of them, as the fact or its exercise will suffice. JUAN MANUEL GONZALEZ GARCIA, Notario.

Además, confiero (confiramos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que nos (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; al registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit



...deval. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan
sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del
proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de
agentes oficiales.

the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by
representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this 16th day of September, 2004

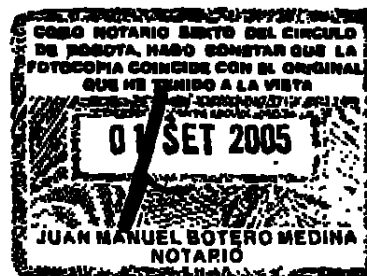
en/in Tokyo, Japan

por/by Osamu NAGAYAMA

President, CEO


Firma Signature

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA



10/10/10

1. *Pharmaceutical industry* – The pharmaceutical industry is a major player in the healthcare sector, responsible for the development, production, and distribution of drugs. It is a highly regulated industry with significant research and development costs.

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
DE SBOETA, HAGO CONSTAR POR LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE ME TENGO A LA VISTA

01-SET 2005

JUAN MANUEL NOTERO MEDINA
NOTARIO

Registration No 561 of 2001

Notarial Certificate

This is to certify that Manami SEKIGUCHI, the attorney of Osamu NAGAYAMA, President, CEO of CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, a Japanese body corporate of 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo, Japan has stated in my very presence that said Osamu NAGAYAMA acknowledges himself to have signed the attached Power of Attorney in compliance with the authority bestowed on him as President, CEO of CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA.

The foregoing was duly proven by the certified copy of the company register issued by Tokyo Legal Affairs Bureau, Japanese Government, dated July 21, 2004.

Dated this 7th day of October, 2004

Norio Akiyama
Notary Public Norio Akiyama



No. 1-10, Nihombashi, Kabuto-cho,
Chuo-ku, Tokyo, Japan



RECEIVED
SEP 1 2005

COMO NOTARIO SEÑTO DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA CONCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
01 SET 2005
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

RECEIVED
SEP 1 2005



平成16年登録第

561 号

認

証

7

囑託人 中外製薬 株式会社 代表取締役 永山 治 は、別添文書における署名が自己のものに相違ない旨、代理人 関口 麻奈美 を通じ、本公証人に対し自認した。

よって、これを認証する。

平成16年 10 月 7 日、本公証人役場において

東京都中央区日本橋兜町1番10号

東京法務局所属

公証人
Notary

Norio Akiyama



証 明

上記署名は、東京法務局所属公証人の署名に相違ないものであり、かつ、その押印は、真実のものであることを証明する。

平成16年 10 月 7 日

東京法務局長

石井政治



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN

This public document

2. has been signed by Norio Akiyama

3. acting in the capacity of Notary of the Tokyo Legal Affairs Bureau

4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at Tokyo

6. OCT. 7. 2004

7. by the Ministry of Foreign Affairs

8. 04- N^o 003170

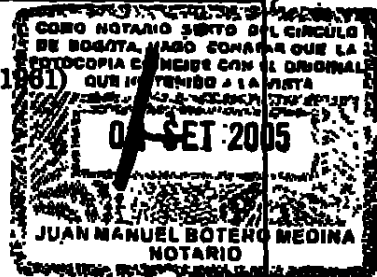
9. Seal/stamp:

10. Signature



Shinichi HAGIWARA

For the Minister for Foreign Affairs

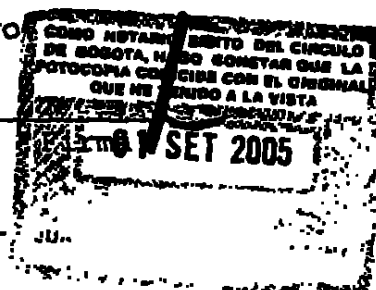


TRADUCCIÓN OFICIAL No. 10.13/04d realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia y registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento escrito en inglés y español por medio del cual CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, domiciliado en el 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokio 115-8543 Japón, por el presente ratifica la solicitud de patente No. 04.090.189 presentada por el Doctor Emilio FERRERO el 10 de Septiembre de 2004 y adicionalmente otorga derechos de representación y poder a los Doctores EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ, tpa. 23555; y GERMÁN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4 No. 72-35, Bogotá D.C., Colombia.

Dado y firmado el 16 de Septiembre de 2004 en Tokio, Japón, por Osamu NAGAYAMA, Presidente y Director Ejecutivo

Firma Ilegible
 Firma
 CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA



Registro No. 561 de 2001

Certificado Notarial

El presente es para certificar que Manami SEKIGUCHI, apoderado de Osamu NAGAYAMA, Presidente y Director Ejecutivo de CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, sociedad anónima japonesa domiciliada en 5-1 Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokio, Japón, ha declarado en presencia mía que el mencionado Osamu NAGAYAMA reconoce que él mismo firmó el adjunto Poder de conformidad con la autoridad a él investida como Presidente, Director Ejecutivo de CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA. Lo anterior fue debidamente probado con la copia certificada del registro de la compañía expedido por la Oficina de Asuntos Legales de Tokio del Gobierno Japonés, con fecha del 21 de Julio de 2004.

Expedido hoy 7 de Octubre de 2004

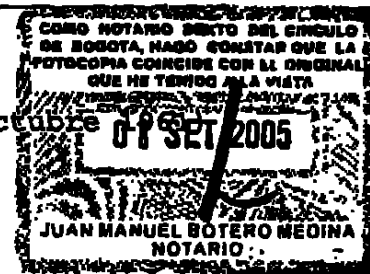
Firma ilegible
Notario Público Norio Akiyama

No. 1-10, Nihombashi, Kabuto-cho
Chuo-ku, Tokio, Japón

Sello: Oficina de Asuntos Legal de Tokio
OFICINA DE NOTARIO
No. 1-10, Nihombashi, Kabuto-cho
Chuo-ku, Tokio, Japón

Sellos rojos al lado de la firma y en la parte superior del documento.

APOSTILLA
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)



1. País: JAPÓN

Este documento público

2. ha sido firmado por Norio Akiyama

3. actuando en calidad de Notario de la Oficina de Asuntos Legales de Tokio

4. lleva el sello/estampilla de

Certificado

5. en Tokio 6. OCT. 7.2004

7. por el Ministerio de Relaciones Exteriores

8. 04 - No. 003170 ✓

9. Sello/estampilla

10. Firma:



Firma Ilegible

Shinichi HAGIWARA

Por el Ministro de Relaciones Exteriores

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

DVZ/ID-6065/WPCL002G/COLO 14419-841-001-7

DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
SEC. DE EXTER. DE MEXICO 4 DE MARZO DE 2004

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA
 BOGOTA HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRM(A)S
[Firma]
 COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
 EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
 SANTA FE DE BOGOTA.
 15 OCTUBRE 2005



NO SE ASUME
 RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 OCT 15 P 12:46

[Firma]
 NOT. DE LEGALIZACIONES
 SANTA FE DE BOGOTA D.C.



MINISTERIO DE RELACIONES
 EXTERIORES

055123
[Firma]
 CUYA FIRMA APARECE EN EL
 DOCUMENTO DESEMPEÑA
 LAS FUNCIONES INDICADAS

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 9 月 2 日 (02.09.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/073741 A1

- (51) 国際特許分類: A61K 45/00, 39/393, Kamynski) [JP/JP]; 〒6580016 兵庫県神戸市東灘区本
A61P 19/00, 25/00, 43/00 山中町 2 丁目 8 番 2 2 号 Hyogo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/002111 (74) 代理人: 青木 篤、外(AOEKI, Atsushi et al.); 〒1058423
東京都港区虎ノ門三丁目 5 番 1 号 虎ノ門 3 7 森ビ
(22) 国際出願日: 2004 年 2 月 24 日 (24.02.2004) ル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).
- (25) 国際出願の言語: 日本語 (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
(26) 国際公開の言語: 日本語 BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GR, HU,
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
(30) 優先権データ: LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,
特願2003-046214 2003 年 2 月 24 日 (24.02.2003) JP NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中
外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI
KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間 5 丁目
5 番 1 号 Tokyo (JP). 学校法人慶應義塾 (KEIO UNI-
VERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田 2 丁目
1 5 番 4 5 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: および (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が
可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL,
SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG,
KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH,
CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU,
MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 岡野 栄之
(OKANO, Hideyuki) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿
区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学 医学部内 Tokyo
(JP). 岡田 誠司 (OKADA, Seiji) [JP/JP]; 〒1608582 東
京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学 医学部内
Tokyo (JP). 中村 雅也 (NAKAMURA, Masaya) [JP/JP];
〒1608582 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾
大学 医学部内 Tokyo (JP). 吉崎 和幸 (YOSHIZAKI,

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDY FOR SPINAL INJURY CONTAINING INTERLEUKIN-6 ANTAGONIST

(54) 発明の名称: インターロイキン-6 アンタゴニストを含有する脊髄損傷治療剤

(57) Abstract: A remedy for spinal injury, a nerve stem cell differentiation-controlling agent and an inhibitor of differentiation into
glial cells each comprising an interleukin-6 antagonist as the active ingredient.

(57) 要約: インターロイキン-6 アンタゴニストを有効成分とする、脊髄損傷治療剤、神経幹細胞の分化調節剤及び
グリア細胞への分化抑制剤。

WO 2004/073741 A1

DESCRIPTION

THERAPEUTIC AGENT FOR SPINAL CORD INJURY COMPRISING
INTERLEUKIN-6 ANTAGONIST

5

Technical Field

The present invention relates to a therapeutic agent for spinal cord injury comprising interleukin-6 (IL-6) antagonist as an active ingredient.

10

Background Art

In today's society, a person may suffer spinal cord injury due to a motor vehicle accident, a fall, a tumble, a sports injury and the like. In Japan, the annual number of the injured people is about 5,000 with a cumulative number of patients possibly amounting to 100,000. Symptoms of spinal cord injury are very severe including permanent quadriplegia, motor paralysis and sensory paralysis, bladder and rectum disorders, respiratory disorders etc., and the daily management thereof includes rehabilitation, respiratory management, bed sore prevention, the management of defecation and urination, and the like.

As therapeutic regimens for spinal cord injury, no effective methods of treatment are currently available and there are only symptomatic treatments including local stabilization such as surgery. In order to prevent the aggravation of pathological conditions, steroids have been administered in large quantities, but no results have been obtained that indicate recovery from paralysis. Many spinal cord injuries start with an injury (primary injury) by an external mechanical action and progress further to tissue destruction (secondary injury) through reaction pathways in the living body. The only drug for use in inhibiting the progression of such secondary injuries is methyl prednisolone, which has been administered in quantities as large as nearly 10000 mg. It has been reported, however, that this method is

35

associated with side effects such as the aggravation of diabetes mellitus and pneumonia.

5 In the beginning of the 19th century, Ramon y Cajal, a neuroanatomist, stated in his book "The central nervous system (the brain and the spinal cord) of mammals is incapable of regeneration once it has been injured," and since then this has been believed. In 1980's, however, the implantation of peripheral nerves for spinal cord injury (A. Aguayo et al., J. Exp. Biol. 95:231-240, 1981) and the implantation of fetus spinal cord (Bregman B.S., 10 Dev. Brain Res., 34:265-279, 1987) have been reported, indicating that even after spinal cord injury the regeneration of injured axons can be observed if an appropriate environment has been introduced at the injured site. Also, a multiplicity of reports on axonal 15 regeneration have been made such as the promotion of regeneration of injured axons by neurotrophic factors (Cai, D. et al., Neuron, 22:89-101, 1999), the identification of inhibitory factors of axonal growth (Chen, D. et al., Nature 403:434-439, 2000) and the like, 20 suggesting that the regeneration of injured spinal cord injury may become a reality. However, the clinical application of the implantation of the fetus spinal cord is very difficult due to the shortage of donors and to ethical problems. 25

Furthermore, neural stem cells are (pluripotent) undifferentiated cells of the nervous system that can propagate and repeated passages (self-replicating ability) and simultaneously generate three types of cells 30 (neurons, astrocytes, oligodendrocytes) that constitute the central nervous system and, as they also occur in the adult spinal cord, they are assumed to be capable of repairing injured tissues. In fact, however, they do not differentiate into neurons after injury, and all 35 differentiate into glia cells thereby forming scars.

There are sporadic reports on cytokines involved in differentiation induction in neural stem cells. Weiss et

al. reported that the differentiation of neural stem cells derived from the striate body of a mouse fetus into neurons is promoted by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) (Ahmed, S. et al., J. Neurosci. 150:5765-5778, 1995). Ghosh et al. also reported that the differentiation of neural stem cells derived from the cerebral skin of a rat fetus into neurons is promoted by neurotrophin-3 (NT-3) (Ghosh, A. et al., Neuron 15:89-103, 1995). McKay et al. reported that the differentiation of neural stem cells derived from the hippocampus of a rat fetus is "instructively" induced into neurons by platelet-derived neurotrophic factor (PDNF), into astrocytes by ciliary neurotrophic factor (CNTF), and into oligodendrocytes by thyroid hormone (T3) (Jone, K. et al., Gene & Dev. 10:3129-3140).

Furthermore, Taga et al. recently reported that the differentiation of neural stem cells derived from the neural epithelial cells of a mouse fetus into astrocytes is promoted by leukemia inhibitory factor (LIF) and bone morphogenic protein-2 (BMP-2) (Nakashima et al., Science 284:479-482, 1999). Common to these reports are the so-called IL-6 superfamily such as CNTF and LIF. Thus, a signal via gp130, which is a subunit of the cytokine receptor, is believed to induce the differentiation of neural stem cells into astrocytes.

However, there is no literature that demonstrates that spinal cord injury can be repaired by the differentiation induction of neural stem cells by cytokines.

IL-6 is a cytokine which is also called B cell stimulating factor 2 (BSF2) or interferon β 2. IL-6 was discovered as a differentiation factor involved in the activation of B-lymphatic cells (Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76). Thereafter, it was found to be a multifunctional cytokine that influences various functions of the cell (Akira, S. et al., Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78). IL-6 has been reported to

induce the maturation of T-lymphatic cells (Lotz, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258).

IL-6 transmits its biological activity through two types of proteins on the cell. One of them is IL-6
5 receptor, a ligand-binding protein with a molecular weight of about 80 kD, to which IL-6 binds (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981; Yamasaki, K. et al., Science (1987) 241, 825-828). IL-6 receptor occurs not
10 only in the membrane-bound form that penetrates through and is expressed on the cell membrane but also as a soluble IL-6 receptor consisting mainly of the extracellular region.

The other is a membrane-bound protein gp130 having a molecular weight of about 130 kD that is involved in non-
15 ligand-binding signal transduction. IL-6 and IL-6 receptor form the IL-6/IL-6 receptor complex which, after binding to gp130, transmits the biological activity of IL-6 to the cell (Taga, T. et al., Cell (1989) 58, 573-581).

20 An IL-6 antagonist is a substance that inhibits the transduction of biological activity of IL-6. There have been known so far antibody directed against IL-6 (anti-IL-6 antibody), antibody directed against IL-6 receptor (anti-IL-6 receptor antibody), antibody directed against
25 gp130 (anti-gp130 antibody), altered IL-6, partial peptides of IL-6 or IL-6 receptor and the like.

Anti-IL-6 receptor antibody has been described in several reports (Novick D. et al., Hybridoma (1991) 10, 137-146, Huang, Y. W. et al., Hybridoma (1993) 12, 621-
30 630, International Patent Publication WO 95-09873, French Patent Application FR 2694767, United States Patent US 521628). Humanized PM-1 antibody was obtained by transplanting the complementarity determining region (CDR) of one of them, a mouse antibody PM-1 (Hirata, Y.
35 et al., J. Immunology (1989) 143, 2900-2906), to a human antibody (the International Patent Publication WO 92-19759).

Patent document 1: WO95-09873

Patent document 2: FR 2694767

Patent document 3: USP 0521628

5 Non-patent document 1: A. Aguayo et al., J. Exp.
Bilo. 95:231-240, 1981

Non-patent document 2: Bregman B.S., Dev. Brain Res.
34:265-279, 1987

Non-patent document 3: Cai, D. et al., Neuron 22:89-
101, 1999

10 Non-patent document 4: Chen, D. et al., Nature
403:434-439, 2000

Non-patent document 5: Ahmed, S. et al., J.
Neurosci. 150:5765-5778, 1995

15 Non-patent document 6: Ghosh, A. et al., Neuron
15:89-103, 1995

Non-patent document 7: Jone, K. et al., Gene & Dev.
10:3129-3140, 1996

Non-patent document 8: Nakashima, K. et al., Science
284:479-482, 1999

20 Non-patent document 9: Hirano, T. et al., Nature
(1986) 324, 73-76

Non-patent document 10: Akira, S. et al., Adv. in
Immunology (1993) 54, 1-78

25 Non-patent document 11: Lotz, M. et al., J. Exp.
Med. (1988) 167, 1253-1258

Non-patent document 12: Taga, T. et al., Cell (1989)
58, 573-581

Non-patent document 13: Yamasaki, K. et al., Science
(1987) 241, 825-828

30 Non-patent document 14: Novick, D. et al., Hybridoma
(1991) 10, 137-146

Non-patent document 15: Huang, Y.W. et al.,
Hybridoma (1993) 12, 621-630

35 Non-patent document 16: Hirata, Y. et al., J.
Immunol. (1989) 143, 2900-2906

Disclosure of the Invention

Thus, there is a need for a therapeutic means that

not only prevents the aggravation of conditions of a spinal cord injury but also aids recovery therefrom, and the present invention provides a pharmaceutical composition useful as one of the means.

5 After intensive and extensive studies to resolve the above problem, the present inventors have found that agonist against IL-6, for example, antibody against IL-6 receptor has an effect of aiding recovery from spinal cord injury. Thus, the present invention provides a
10 therapeutic agent for spinal cord injury comprising interleukin-6 (IL-6) antagonist as an active ingredient.

 The present invention also provides a modulator of differentiation of neural stem cells comprising interleukin-6 (IL-6) antagonist as an active ingredient.

15 The present invention also provides an inhibitor of differentiation into glia cells comprising interleukin-6 (IL-6) antagonist as an active ingredient.

 The above IL-6 antagonist is preferably an antibody against IL-6 receptor, and most preferably a monoclonal
20 antibody. As such a monoclonal antibody, there can be mentioned, for example, a monoclonal antibody against human IL-6 receptor and a monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor. As a specific example of the above monoclonal antibody against human IL-6 receptor, there
25 can be mentioned for example PM-1 antibody, and as a specific example of the above monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor, there can be mentioned for example MR16-1 antibody. Furthermore, as an antibody against IL-6 receptor, there can be mentioned a recombinant
30 antibody, for example, a chimeric antibody, a humanized antibody, and the like, that has been obtained by artificially engineering a gene cloned from a monoclonal antibody-producing hybridoma.

Brief Explanation of the Drawings

35 Fig. 1 is a graph showing that the recovery of motion after spinal cord injury is greater in the spinal cord injured mice that received an anti-IL-6 receptor

antibody (MR16) as compared to the spinal cord injured mice (control) that did not receive the above antibody in the evaluation of motor function of the lower limbs.

5 Fig. 2 is a graph showing that the recovery of motion coordination after spinal cord injury is greater in the spinal cord injured mice that received an anti-IL-6 receptor antibody (MR16) as compared to the spinal cord injured mice (control) that did not receive the above antibody in the rotarod treadmill test.

10 Fig. 3 is a graph showing that glia formation at the spinal cord injured site has been inhibited in the spinal cord injured mice that received an anti-IL-6 receptor antibody (MR16) as compared to the spinal cord injured mice (control) that did not receive the above antibody.

15 Fig. 4 is a graph showing that IL-6 receptor has been expressed at the spinal cord injured site in the spinal cord injured mice as compared to the mice (sham) that have no spinal cord injury.

20 Fig. 5 is the Western blot of a phosphorylated STAT3 showing that the administration of an anti-IL-6 receptor antibody (MR16) actually inhibited the IL-6 signal cascade at the spinal cord injured site.

Best Mode for Carrying out the Invention

25 IL-6 antagonists for use in the present invention may be of any origin, any kind, and any form, as long as they exhibit a therapeutic effect on spinal cord injury.

IL-6 antagonists block signal transduction by IL-6 and inhibit the biological activity of IL-6. IL-6 antagonists are preferably substances that have an activity of inhibiting the binding to any of IL-6, IL-6 receptor, and gp130. As the IL-6 antagonists, there can be mentioned for example anti-IL-6 antibody, anti-IL-6 receptor antibody, anti-gp130 antibody, altered IL-6, altered soluble IL-6 receptor, a partial peptide of IL-6 or IL-6 receptor, and a low molecular weight substance having the same activity as these.

35 Anti-IL-6 antibodies for use in the present

invention can be obtained as polyclonal or monoclonal antibodies using a known method. As the anti-IL-6 antibodies for use in the present invention, monoclonal antibodies of, in particular, a mammalian origin, are preferred. Monoclonal antibodies of a mammalian origin include those produced by a hybridoma and recombinant antibody produced by a host which has been transformed with an expression vector containing genetically engineered antibody genes. These antibodies, via binding to IL-6, block the binding of IL-6 to IL-6 receptor, and thereby block the signal transduction of biological activity of IL-6 into the cell.

Examples of such antibodies include MH166 (Matsuda T. et al., Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956) and SK2 antibody (Sato, K. et al., The 21st Nihon Menekigakkai Soukai (General Meeting of the Japan Immunology Society), Academic Record (1991) 21, 166) and the like.

An anti-IL-6 antibody-producing hybridoma can be basically constructed using a known procedure as described below. Thus, IL-6 may be used as a sensitizing antigen and is immunized in the conventional method of immunization. The immune cells thus obtained are fused with known parent cells in the conventional cell fusion process, and then monoclonal antibody-producing cells are screened by the conventional screening method to prepare the desired hybridoma.

Specifically, anti-IL-6 antibody may be obtained in the following manner. For example, a human IL-6 for use as the sensitizing antigen to obtain antibody can be obtained using the IL-6 gene/amino acid sequence disclosed in Eur. J. Biochem (1987) 168, 543-550, J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541, or Agr. Biol. (1990) 54, 2685-2688.

After a suitable host cell is transformed by inserting the IL-6 gene sequence into a known expression vector system, the IL-6 protein of interest is purified from the host cell or the culture supernatant thereof,

and the purified IL-6 protein can be used as the sensitizing antigen. Alternatively, a fusion protein, of the IL-6 protein and another protein, may be used as the sensitizing antigen.

5 Anti-IL-6 receptor antibodies for use in the present invention can be obtained as polyclonal or monoclonal antibodies using a known method. As the anti-IL-6 receptor antibodies for use in the present invention, monoclonal antibodies of, in particular a mammalian
10 origin, are preferred. Monoclonal antibodies of a mammalian origin include those produced by a hybridoma and those produced by a host which has been transformed with an expression vector containing genetically engineered antibody genes. The antibodies, via binding
15 to IL-6 receptor, inhibit the binding of IL-6 to IL-6 receptor, and thereby block the transduction of the biological activity of IL-6 into the cell.

 Examples of such antibodies include MR16-1 antibody (Tamura, T., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993)
20 90, 11924-11928), PM-1 antibody (Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906), or AUK12-20 antibody, AUK64-7 antibody or AUK146-15 antibody (International Patent Publication WO 92-19759) and the like. Among them, PM-1 antibody is most preferred.

25 Incidentally, the hybridoma cell line which produces PM-1 antibody has been internationally deposited under the provisions of the Budapest Treaty as PM-1 on July 12, 1989 with the Patent Microorganism Depository of National Institute of Industrial Science and Technology, of Chuo
30 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japan, as FERM BP-2998. The hybridoma cell line which produces MR16-1 antibody has been internationally deposited under the provisions of the Budapest Treaty as Rat-mouse hybridoma MR16-1 on March 13, 1997 with the
35 Patent Microorganism Depository of National Institute of Industrial Science and Technology, of Chuo 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japan, as

FERM BP-5875.

Hybridomas producing anti-IL-6 receptor monoclonal antibody can be basically prepared using a known procedure as described below. Thus, IL-6 receptor is
5 used as a sensitizing antigen and is immunized according to the conventional method of immunization. The immune cells thus obtained are fused with known parent cells in the conventional cell fusion process, and then monoclonal antibody-producing cells may be screened by the
10 conventional screening method to prepare the desired hybridoma .

Specifically, anti-IL-6 receptor antibody may be prepared in the following manner. For example, the human IL-6 receptor used as the sensitizing antigen for
15 obtaining antibody can be obtained using the IL-6 receptor gene sequence/amino acid sequence disclosed in European Patent Application EP 325474, and the mouse IL-6 receptor can be obtained using the IL-6 receptor gene sequence, amino acid sequence disclosed in Japanese
20 Unexamined Patent Publication (Kokai) 3-155795.

There are two types of IL-6 receptor proteins: IL-6 receptor expressed on the cell membrane, and IL-6 receptor detached from the cell membrane (soluble IL-6 receptor) (Yasukawa K. et al., J. Biochem. (1990) 108,
25 673-676). Soluble IL-6 receptor antibody is composed substantially of the extracellular region of the IL-6 receptor bound to the cell membrane, and thereby is different from the membrane-bound IL-6 receptor in that the former lacks the transmembrane region or both of the
30 transmembrane region and the intracellular region. As the IL-6 receptor protein, any IL-6 receptor can be used, as long as it can be used a sensitizing antigen for production of the anti-IL-6 receptor antibody for use in the present invention.

35 After the gene sequence of IL-6 receptor is inserted into a known expression vector system to transform an appropriate host cell, the desired IL-6 receptor protein

may be purified from the host cell or a culture supernatant thereof using a known method, and the purified IL-6 receptor protein may be used as the sensitizing antigen. Alternatively, cells that are
5 expressing IL-6 receptor or a fusion protein of the IL-6 receptor protein and another protein may be used as the sensitizing antigen.

Escherichia coli (E. coli) that has a plasmid pIBIBSF2R containing cDNA encoding human IL-6 receptor
10 has been internationally deposited under the provisions of the Budapest Treaty as HB101-pIBIBSF2R on January 9, 1989 with the Patent Microorganism Depository of National Institute of Industrial Science and Technology, of Chuo
6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref.,
15 Japan, as FERM BP-2232.

Anti-gp130 antibodies for use in the present invention can be obtained as polyclonal or monoclonal antibodies using a known method. As the anti-gp130
antibodies for use in the present invention, monoclonal
20 antibodies of, in particular a mammalian origin, are preferred. Monoclonal antibodies of a mammalian origin include those produced by a hybridoma and those produced by a host which has been transformed with an expression vector containing genetically engineered antibody genes.
25 The antibodies, via binding to gp130, inhibit the binding of IL-6/IL-6 receptor complex to gp130, and thereby block the transduction of the biological activity of IL-6 into the cell.

Examples of such antibodies include AM64 antibody
30 (Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) 3-219894), 4B11 antibody and 2H4 antibody (US 5571513), B-S12 antibody and B-P8 antibody (Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) 8-291199) and the like.

An anti-gp130 monoclonal antibody-producing
35 hybridoma can be basically created using a known procedure as described below. Thus, gp130 may be used as a sensitizing antigen and is used for immunizing a

conventional method of immunization. The immune cells thus obtained are fused with known parent cells in a conventional cell fusion process, and then the monoclonal antibody-producing hybridomas are screened by a conventional screening method to prepare the desired hybridoma.

Specifically, monoclonal antibody may be obtained in the following manner. For example, gp130 used as the sensitizing antigen for antibody generation can be obtained using the gp130 gene sequence/amino acid sequence disclosed in European Patent Application EP 411946.

After a suitable host cell is transformed by inserting the gp130 gene sequence into a known expression vector system, the gp130 protein of interest is purified from the host cell or from the culture supernatant thereof in a conventional method. The purified gp130 receptor protein can be used as the sensitizing antigen. Alternatively, cells expressing gp130 or a fusion protein, of the gp130 protein and another protein, may be used as the sensitizing antigen.

Though the mammals to be immunized with the sensitizing antigen are not specifically limited, they are preferably selected in consideration of their compatibility with the parent cell for use in cell fusion. They generally include rodents such as mice, rats, hamsters and the like.

Immunization of animals with a sensitizing antigen is carried out using a known method. A general method, for example, involves the intraperitoneal or subcutaneous injection of a sensitizing antigen to the mammal. Specifically, a sensitizing antigen which has been diluted and suspended in an appropriate amount of phosphate buffered saline (PBS) or physiological saline etc. is mixed, as desired, with an appropriate amount of a common adjuvant, for example Freund's complete adjuvant. After being emulsified, it is preferably

administered to a mammal for several times every 4 to 21 days. Alternatively a suitable carrier may be used at the time of immunization of the sensitizing antigen.

After immunization and the confirmation of the increase in the desired antibody levels in the serum, the immune cells are taken out from the mammal and are subjected to cell fusion. Preferred immune cells to be subjected to cell fusion include, in particular, the spleen cells.

The mammalian myeloma cells, as the other parent cells which are fused with the above-mentioned immune cells, preferably include various known cell lines such as P3X63Ag8.653 (Kearney, J. F. et al., J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270), FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35; 1-21), S194 (Trowbridge, I.S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323), R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277; 131-133) and the like.

Cell fusion between the above immune cells and the myeloma cells may be essentially conducted in accordance with a known method such as is described in Milstein et al. (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) and the like.

More specifically, the above cell fusion is carried out in the conventional nutrient broth in the presence of, for example, a cell fusion accelerator. As the cell fusion accelerator, for example, polyethylene glycol (PEG), Sendai virus (HVJ) and the like may be used, and, in addition, an adjuvant such as dimethyl sulfoxide etc. may be added as desired to enhance the efficiency of fusion.

The preferred ratio of the immune cells and the myeloma cells to be used is, for example, 1 to 10 times

more immune cells than the myeloma cells. Examples of culture media to be used for the above cell fusion include RPMI1640 medium and MEM culture medium suitable for the growth of the above myeloma cell lines, and the conventional culture medium used for this type of cell culture, and besides a serum supplement such as fetal calf serum (FCS) may be added.

In cell fusion, predetermined amounts of the above immune cells and the myeloma cells are mixed well in the above culture liquid, to which a PEG solution previously heated to about 37°C, for example a PEG solution with a mean molecular weight of about 1000 to 6000, is added at a concentration of 30 to 60% (w/v) and mixed to form the desired fusion cells (hybridoma). Then by repeating the sequential addition of a suitable culture liquid and centrifugation to remove the supernatant, cell fusion agents etc. which are undesirable for the growth of the hybridoma can be removed.

Said hybridoma may be selected by culturing in the conventional selection medium, for example, the HAT culture medium (a culture liquid containing hypoxanthine, aminopterin, and thymidine). Culturing in said HAT culture liquid is continued generally for a period of time sufficient to effect killing of the cells (non-fusion cells) other than the desired hybridoma, and generally for several days to several weeks. Then the conventional limiting dilution method is conducted to effect the screening and cloning of the hybridomas that produce the desired antibody.

In addition to obtaining the above hybridoma by immunizing an animal other than the human with an antigen, it is also possible to sensitize human lymphocytes in vitro with a desired antigen protein or desired antigen-expressing cells, and the resulting sensitized B lymphocytes are fused with human myeloma cells, for example U266, to obtain the desired human antibody having the activity of binding to the desired

antigen or the desired antigen-expressing cells (see Japanese Post-examined Patent Publication (Kokoku) No. 1-59878). Furthermore, a transgenic animal having a repertoire of all human antibody genes can be immunized with the antigen or the antigen-expressing cells to obtain the desired human antibody in the method described above (see International Patent Publication WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 and WO 96/33735).

The monoclonal antibody-producing hybridoma thus constructed can be subcultured in the conventional culture liquid, or can be stored for a prolonged period of time in liquid nitrogen.

In order to obtain monoclonal antibodies from said hybridoma, a method can be used in which said hybridoma is cultured in the conventional method and the antibodies are obtained as the supernatant, or a method in which the hybridoma is administered to and grown in a mammal compatible with said hybridoma and the antibodies are obtained as the ascites. The former method is suitable for obtaining high-purity antibodies, whereas the latter is suitable for a large scale production of antibodies.

For example, a hybridoma producing anti-IL-6 receptor antibody can be constructed using the method disclosed in Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) 3-139293. It can be constructed by a method in which the PM-1 antibody-producing hybridoma that was internationally deposited under the provisions of the Budapest Treaty as FERM BP-2998 on July 12, 1989 with the Patent Microorganism Depository of National Institute of Industrial Science and Technology, of Chuo 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japan, is intraperitoneally injected to BALB/c mice to obtain the ascites from which the PM-1 antibody is purified, or a method in which said hybridoma is cultured in a suitable culture medium such as the RPMI1640 medium containing 10% bovine fetal serum and 5% MB-Condimed H1 (manufactured by

Boehringer Mannheim), the hybridoma SFM medium (manufactured by GIBCO-BRL), the PFHM-II medium (manufactured by GIBCO-BRL) and the like, and the PM-1 antibody can be purified from the supernatant.

5 A recombinant antibody which was produced by the recombinant gene technology in which an antibody gene was cloned from the hybridoma and integrated into a suitable vector which was then introduced into a host can be used in the present invention as monoclonal antibody (see, for
10 example, Borrebaeck C.A.K., and Larrick J.W. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD. 1990).

 Specifically, mRNA encoding the variable (V) region of the desired antibody is isolated from antibody-
15 producing cells such as a hybridoma. The isolation of mRNA is conducted by preparing total RNA using, for example, a known method such as the guanidine ultracentrifuge method (Chirgwin, J.M. et al.,
Biochemistry (1979) 18, 5294-5299), the AGPC method
20 (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159), and then mRNA is prepared from the total RNA using the mRNA Purification kit (manufactured by Pharmacia) and the like. Alternatively, mRNA can be directly prepared using the QuickPrep mRNA Purification Kit (manufactured
25 by Pharmacia).

 cDNA of the V region of antibody may be synthesized from the mRNA thus obtained using a reverse transcriptase. cDNA may be synthesized using the AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit and
30 the like. Alternatively, for the synthesis and amplification of cDNA, the 5'-Ampli FINDER RACE Kit (manufactured by Clontech) and the 5'-RACE method (Frohman, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res.
35 (1989) 17, 2919-2932) that employs polymerase chain reaction (PCR) may be used. The desired DNA fragment is purified from the PCR product obtained and may be ligated

to vector DNA. Moreover, a recombinant vector is constructed therefrom and then is introduced into *E. coli* etc., from which colonies are selected to prepare the desired recombinant vector. The base sequence of the
5 desired DNA may be confirmed by a known method such as the dideoxy method.

Once the DNA encoding the V region of the desired antibody has been obtained, it may be ligated to DNA encoding the constant region (C region) of the desired
10 antibody, which is then integrated into an expression vector. Alternatively, the DNA encoding the V region of the antibody may be integrated into an expression vector containing DNA encoding the C region of the antibody.

In order to produce the antibody for use in the present invention, the antibody gene is integrated as
15 described below into an expression vector so as to be expressed under the control of the expression regulatory region, for example an enhancer and/or a promoter. Subsequently, the expression vector may be transformed
20 into a host cell and the antibody can then be expressed therein.

In accordance with the present invention, artificially altered recombinant antibody such as chimeric antibody, humanized antibody, and human antibody
25 can be used for the purpose of lowering heterologous antigenicity against humans. These altered antibodies can be produced using known methods.

Chimeric antibody can be obtained by ligating the thus obtained DNA encoding the V region of antibody to
30 DNA encoding the C region of human antibody, which is then integrated into an expression vector and introduced into a host for production of the antibody therein (see European Patent Application EP 125023, and International Patent Publication WO 92-19759). Using this known
35 method, chimeric antibody useful for the present invention can be obtained.

For example, a plasmid that contains DNA encoding

the L chain V region or the H chain V region of chimeric PM-1 antibody was designated as pPM-k3 or pPM-h1, respectively, and E. coli's having these plasmids have been internationally deposited under the provisions of the Budapest Treaty as NCIMB 40366 and NCIMB 40362, respectively, on February 12, 1991 with the National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited.

Humanized antibody which is also called reshaped human antibody has been made by transplanting the complementarity determining region (CDR) of antibody of a mammal other than the human, for example mouse antibody, into the complementarity determining region of human antibody. The general recombinant DNA technology for preparation of such antibodies is also known (see European Patent Application EP 125023 and International Patent Publication WO 92-19759).

Specifically, a DNA sequence which was designed to ligate the CDR of mouse antibody with the framework region (FR) of human antibody is synthesized from several divided oligonucleotides having sections overlapping with one another at the ends thereof by the PCR method. The DNA thus obtained is ligated to the DNA encoding the C region of human antibody and then is integrated into an expression vector, which is introduced into a host for antibody production (see European Patent Application EP 239400 and International Patent Publication WO 92-19759).

For the FR of human antibody ligated through CDR, those in which the complementarity determining region that forms a favorable antigen binding site are selected. When desired, amino acids in the framework region of the antibody variable region may be substituted so that the complementarity determining region of reshaped human antibody may form an appropriate antigen binding site (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

For example, for chimeric antibody or humanized antibody, the C region of human antibody is used. As the C region of human antibody, there can be mentioned Cy, and

Cy1, Cy2, Cy3, and Cy4, as examples, can be used. The C region of human antibody may be modified to improve the stability of antibody or the production thereof.

5 Chimeric antibody consists of the variable region of antibody derived from a mammal other than the human and the C region derived from human antibody, whereas humanized antibody consists of the complementarity determining region of antibody derived from a mammal other than the human and the framework region and the C
10 region derived from human antibody. Accordingly, antigenicity thereof in the human body has been reduced so that they are useful as antibody for use in the present invention.

As a preferred embodiment of the humanized antibody
15 for use in the present invention, there can be mentioned humanized PM-1 antibody (see International Patent Publication WO 92-19759).

Furthermore, as a method of obtaining human antibody, a technology that employs panning with a human
20 antibody library is known, in addition to those described above. For example, the variable region of human antibody is expressed on the surface of a phage by the phage display method as a single chain antibody (scFv) to select a phage that binds to the antigen. By analyzing
25 the gene of the phage selected, the DNA sequence encoding the variable region of the human antibody that binds to the antigen can be determined. Once the DNA sequence of scFv that binds to the antigen is clarified, it is possible to construct an appropriate expression vector
30 that contains said sequence and then to obtain human antibody. These methods are already known and can be found in WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, and WO 95/15388.

Antibody genes constructed as described above may be
35 expressed and obtained in a known method. In the case of mammalian cells, expression may be accomplished using a vector containing a commonly used useful promoter, the

antibody gene to be expressed, DNA in which the poly A signal has been operably linked at 3' downstream thereof or a vector containing said DNA. Examples of the promoter/enhancer include human cytomegalovirus immediate
5 early promoter/enhancer.

Additionally, as the promoter/enhancer which can be used for expression of antibody for use in the present invention, there can be used viral promoters/enhancers such as retrovirus, polyoma virus, adenovirus, and simian
10 virus 40 (SV40), and promoters/enhancers derived from mammalian cells such as human elongation factor 1 α (HEF1 α).

For example, expression may be readily accomplished by the method of Mulligan et al. (Mulligan, R. C. et al.,
15 Nature (1979) 277, 108-114) when SV40 promoter/enhancer is used, or by the method of Mizushima et al. (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) when HEF1 α promoter/enhancer is used.

In the case of E. coli, expression may be conducted
20 by operably linking a commonly used useful promoter, a signal sequence for antibody secretion, and the antibody gene to be expressed, followed by expression thereof. As the promoter, for example, there can be mentioned lacZ promoter and araB promoter. The method of Ward et al.
25 (Ward, E.S. et al., Nature (1989) 341, 544-546; Ward, E.S. et al., FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) may be used when lacZ promoter is used, and the method of Better et al. (Better, M. et al., Science (1988) 240, 1041-1043) may be used when araB promoter is used.

30 As the signal sequence for antibody secretion, when produced in the periplasm of E. coli, the pelB signal sequence (Lei, S. P. et al., J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383) can be used. After separating the antibody produced in the periplasm, the structure of the antibody
35 is appropriately refolded before use (see, for example, WO 96/30394).

As the origin of replication, there can be used those derived from SV40, polyoma virus, adenovirus, bovine papilloma virus (BPV) and the like. Furthermore, for the amplification of the gene copy number in the host cell system, expression vectors can include as selectable markers the aminoglycoside phosphotransferase (APH) gene, the thymidine kinase (TK) gene, E. coli xanthine guanine phosphoribosyl transferase (Ecogpt) gene, the dihydrofolate reductase (dhfr) gene and the like.

For the production of antibody for use in the present invention, any production system can be used. The production system for antibody preparation comprises the in vitro or the in vivo production system. As the in vitro production system, there can be mentioned a production system which employs eukaryotic cells and the production system which employs prokaryotic cells.

When the eukaryotic cells are used, there are the production systems which employ animal cells, plant cells, or fungal cells. Known animal cells include (1) mammalian cells such as CHO cells, COS cells, myeloma cells, baby hamster kidney (BHK) cells, HeLa cells, and Vero cells, (2) amphibian cells such as Xenopus oocytes, or (3) insect cells such as sf9, sf21, and Tn5. Known plant cells include, for example, those derived from *Nicotiana tabacum*, which may be subjected to callus culture. Known fungal cells include yeasts such as the genus *Saccharomyces*, more specifically *Saccharomyces cerevisiae*, or filamentous fungi such as the genus *Aspergillus*, more specifically *Aspergillus niger*.

When the prokaryotic cells are used, there are the production systems which employ bacterial cells. Known bacterial cells include *Escherichia coli* (E. coli), and *Bacillus subtilis*.

By introducing via transformation the gene of the desired antibody into these cells and culturing the transformed cells in vitro, the antibody can be obtained. Culturing is conducted in the known methods. For

example, as the culture liquid, DMEM, MEM, RPMI1640, and IMDM can be used, and serum supplements such as fetal calf serum (FCS) may be used in combination. In addition, antibodies may be produced in vivo by
5 implanting cells into which the antibody gene has been introduced into the abdominal cavity of an animal and the like.

As in vivo production systems, there can be mentioned those which employ animals and those which
10 employ plants. When animals are used, there are production systems which employ mammals and insects.

As mammals, goats, pigs, sheep, mice, and cattle can be used (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). Also as insects, silkworms can be
15 used. When plants are used, tobacco, for example, can be used.

Antibody genes are introduced into these animals or plants, and the antibodies are produced in such animals or plants, and recovered. For example, an antibody gene
20 is inserted into the middle of the gene encoding protein which is inherently produced in the milk such as goat β casein to prepare fusion genes. DNA fragments containing the fusion gene into which the antibody gene has been inserted are injected into a goat embryo, and the embryo
25 is introduced into a female goat. The desired antibody is obtained from the milk produced by the transgenic goat borne to the goat who received the embryo or the offspring thereof. In order to increase the amount of milk containing the desired antibody produced by the
30 transgenic goat, hormones may be given to the transgenic goat as appropriate. (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702).

When silkworms are used, a baculovirus into which the desired antibody gene has been inserted is infected
35 to the silkworm, and the desired antibody can be obtained from the body fluid of the silkworm (Maeda, S. et al., Nature (1985) 315, 592-594). Moreover, when tobacco is

used, the desired antibody gene is inserted into an expression vector for plants, for example pMON 530, and then the vector is introduced into a bacterium such as *Agrobacterium tumefaciens*. The bacterium is then
5 infected to tobacco such as *Nicotiana tabacum* to obtain the desired antibody from the leaves of the tobacco (Julian, K.-C. Ma et al., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24, 131-138).

When antibody is produced in vitro or in vivo
10 production systems, as described above, DNA encoding the heavy chain (H chain) or the light chain (L chain) of antibody may be separately integrated into an expression vector and the hosts are transformed simultaneously, or DNA encoding the H chain and the L chain may be
15 integrated into a single expression vector, and the host is transformed therewith (see International Patent Publication WO 94-11523).

Antibodies for use in the present invention may be antibody fragments or modified versions thereof as long
20 as they are preferably used. For example, as fragments of antibody, there may be mentioned Fab, F(ab')₂, Fv or single-chain Fv (scFv) in which Fv's of H chain and L chain were ligated via a suitable linker.

Specifically, antibodies are treated with an enzyme,
25 for example, papain or pepsin, to produce antibody fragments, or genes encoding these antibody fragments are constructed, and then introduced into an expression vector, which is expressed in a suitable host cell (see, for example, Co, M.S. et al., *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976; Better, M. and Horwitz, A.H., *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496; Plueckthun, A. and Skerra, A., *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496; Lamoyi, E., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., *Methods in Enzymology* (1989) 121,
30 663-66; Bird, R.E. et al., *TIBTECH* (1991) 9, 132-137).

35 scFv can be obtained by ligating the V region of H chain and the V region of L chain of antibody. In scFv,

the V region of H chain and the V region of L chain are preferably ligated via a linker, preferably a peptide linker (Huston, J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 5879-5883). The V region of H chain and the V
5 region of L chain in scFv may be derived from any of the above-mentioned antibodies. As the peptide linker for ligating the V regions, any single-chain peptide comprising, for example, 12-19 amino acid residues may be used.

10 DNA encoding scFv can be obtained using DNA encoding the H chain or the H chain V region of the above antibody and DNA encoding the L chain or the L chain V region of the above antibody as the template by amplifying the portion of the DNA encoding the desired amino acid
15 sequence among the above sequences by the PCR technique with the primer pair specifying the both ends thereof, and by further amplifying the combination of DNA encoding the peptide linker portion and the primer pair which defines that both ends of said DNA be ligated to the H
20 chain and the L chain, respectively.

Once DNAs encoding scFv have been constructed, an expression vector containing them and a host transformed with said expression vector can be obtained by the conventional methods, and scFv can be obtained using the
25 resultant host by the conventional methods.

These antibody fragments can be produced by obtaining the gene thereof in a similar manner to that mentioned above and by allowing it to be expressed in a host. "Antibody" as used herein also encompasses these
30 antibody fragments.

As modified antibodies, antibodies associated with various molecules such as polyethylene glycol (PEG) can be used. "Antibody" as used herein also encompasses these modified antibodies. These modified antibodies can
35 be obtained by chemically modifying the antibodies thus obtained. These methods have already been established in the art.

Antibodies produced and expressed as described above can be separated from the inside or outside of the host cell and then may be purified to homogeneity. Separation and purification of the antibody for use in the present invention may be accomplished by affinity chromatography. As the column used for such affinity chromatography, there can be mentioned Protein A column and Protein G column. Examples of the carriers used in the Protein A column are Hyper D, POROS, Sepharose F. F. and the like. Alternatively, methods for separation and purification conventionally used for proteins can be used without any limitation.

Separation and purification of the antibody for use in the present invention may be accomplished by combining, as appropriate, chromatography other than the above-mentioned affinity chromatography, filtration, ultrafiltration, salting-out, dialysis and the like. Chromatography includes, for example, ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, gel-filtration and the like. These chromatographies can be applied into high performance liquid chromatography (HPLC). Alternatively, reverse-phase HPLC can be used.

The concentration of antibody obtained in the above can be determined by the measurement of absorbance or by ELISA and the like. Thus, when absorbance measurement is employed, a sample is appropriately diluted with PBS(-) and then the absorbance is measured at 280 nm, followed by calculation using the absorption coefficient of 1.35 OD at 1 mg/ml. When the ELISA method is used, measurement is conducted as follows. Thus, 100 μ l of goat anti-human IgG (manufactured by TAG) diluted to 1 μ g/ml in 0.1 M bicarbonate buffer, pH 9.6, is added to a 96-well plate (manufactured by Nunc), and is incubated overnight at 4°C to immobilize the antibody. After blocking, 100 μ l each of appropriately diluted antibody of the present invention or a sample containing the

antibody, or 100 µl of human IgG (manufactured by CAPPEL), as the standard, is added and incubated at room temperature for 1 hour.

5 After washing, 100 µl of 5000-fold diluted alkaline phosphatase-labeled anti-human IgG (manufactured by BIO SOURCE) is added, and incubated at room temperature for 1 hour. After washing, the substrate solution is added and incubated, followed by the measurement of absorbance at 405 nm using the MICROPLATE READER Model 3550
10 (manufactured by Bio-Rad) to calculate the concentration of the desired antibody.

The altered IL-6 for use in the present invention has an activity of binding to IL-6 receptor and does not transmit the biological activity of IL-6. Thus, the
15 altered IL-6, though it competes with IL-6 for binding to IL-6 receptor, does not transmit the biological activity of IL-6, and thereby it blocks signal transduction by IL-6.

Altered IL-6 may be constructed through the
20 introduction of mutation by replacing amino acid residues of the amino acid sequence of IL-6. IL-6, the source of the altered IL-6, may be of any origin, but when the antigenicity is to be considered, it is preferably human IL-6.

25 Specifically, the secondary structure of IL-6 is predicted using a known molecular modeling program of the amino acid sequence, for example WHATIF (Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990), 8, 52-56), and the overall effects on the amino acid residue to be replaced is
30 evaluated. After an appropriate amino acid residue has been determined, mutation is introduced to effect amino acid substitution by the commonly used polymerase chain reaction (PCR) method using a vector containing the base sequence encoding human IL-6 gene as a template thereby
35 to obtain a gene encoding an altered IL-6. This is then integrated, as desired, into an appropriate expression vector, from which the altered IL-6 can be obtained

according to the expression, production and purification methods of said recombinant antibody.

Specific examples of the altered IL-6 are disclosed in Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93,
5 and Savino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367, WO 96-18648, and WO 96-17869.

The IL-6 partial peptide or the IL-6 receptor partial peptide for use in the present invention has an activity of binding to IL-6 receptor or IL-6,
10 respectively, and does not transmit the biological activity of IL-6. Thus, the IL-6 partial peptide or the IL-6 receptor partial peptide specifically inhibits the binding of IL-6 to IL-6 receptor by binding to IL-6 receptor or IL-6, respectively, and thereby capturing it.
15 As a result, they do not transmit the biological activity of IL-6, and thus block signal transduction of IL-6.

The IL-6 partial peptide or the IL-6 receptor partial peptide is a peptide comprising some or all of the amino acid sequence of the region involved in the
20 binding to IL-6 and IL-6 receptor in the amino acid sequence of IL-6 or IL-6 receptor. Such a peptide generally comprises 10 - 80, preferably 20 - 50, more preferably 20 - 40 amino acid residues.

The IL-6 partial peptide or the IL-6 receptor partial peptide can be constructed by specifying the
25 region involved in the binding to IL-6 and IL-6 receptor in the amino acid sequence of IL-6 or IL-6 receptor, and by producing some or all of the amino acid sequence by a conventional method such as a genetic engineering
30 technology or a peptide synthesis method.

In order to prepare the IL-6 partial peptide or the IL-6 receptor partial peptide by a genetic engineering technology, the DNA sequence encoding the desired peptide
35 is integrated into an expression vector, from which the peptide can be obtained by the expression, production, and purification methods of said recombinant antibody.

Preparation of the IL-6 partial peptide or the IL-6

receptor partial peptide by the peptide synthesis method can be effected using a method commonly used in peptide synthesis such as solid phase synthesis or liquid phase synthesis.

5 Specifically, the method described in Zoku-Iyakuhin
no Kaihatsu (Sequel to Development of Pharmaceuticals),
Vol. 14, Peputido Gousei (Peptide Synthesis), edited by
Haruaki Yajima, Hirokawa Shoten, 1991, may be used. The
10 solid phase synthesis method used includes, for example,
a reaction in which an amino acid corresponding to the C-
terminal of the peptide to be synthesized is coupled to a
support which is insoluble in organic solvents, and then
an amino acid in which α -amino group or a side chain
15 functional group has been protected with an appropriate
protecting group is condensed, one amino acid at a time,
from the C-terminal to the N-terminal direction, and a
reaction in which said protecting group of the α -amino
group of the amino acid or the peptide coupled to the
20 resin is eliminated are alternately repeated to elongate
the peptide chain. The solid phase peptide synthesis
methods are divided into the Boc method and the Fmoc
method depending on the type of protecting group to be
used.

25 After the synthesis of the desired peptide is
complete, a deprotection reaction and a reaction for
cleaving the peptide chain from the support are carried
out. For cleavage from the peptide chain, hydrogen
fluoride or trifluoromethane sulfonic acid in the Boc
method, and TFA in the Fmoc method are generally used.
30 In the Boc method, for example, the above protected
peptide resin is treated in hydrogen fluoride in the
presence of anisole. Subsequently, the protecting group
is eliminated and the peptide is recovered by cleaving
from the support. By lyophilizing, a crude peptide can
35 be obtained. On the other hand, in the Fmoc method, the
deprotection reaction and the cleavage reaction of the
peptide from the support may be performed in TFA for

example, in a procedure similar to the above.

5 The crude peptide thus obtained can be applied to HPLC for its separation and purification. Its elution can be carried out in a water-acetonitrile solvent system that is commonly used for protein purification under an optimum condition. The fraction corresponding to the peak of the profile of the chromatography obtained is collected and lyophilized. The peptide fraction thus purified is identified by subjecting it to the analysis of molecular weight by mass spectroscopic analysis, the
10 analysis of amino acid composition, or the analysis of amino acid sequence, and the like.

Specific examples of the IL-6 partial peptide or the IL-6 receptor partial peptide are disclosed in Japanese
15 Unexamined Patent Publication (Kokai) 2-188600, Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) 7-324097, Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) 8-311098, and United States Patent Publication US 5210075.

The activity of the IL-6 antagonist for use in the
20 present invention of blocking signal transduction of IL-6 can be evaluated using a conventionally known method. Specifically, the IL-6-dependent human myeloma cell line (S6B45, KPMM2), human Lennert's T-lymphoma cell line KT3, or IL-6-dependent cell MH60.BSF2 is cultured, to which
25 IL-6 is added, and the activity can be evaluated using the incorporation of ³H-thymidine into the IL-6-dependent cell with the coexistence of the IL-6 antagonist.

Alternatively, U266, an IL-6 receptor-expressing cell, may be cultured, to which ¹²⁵I-labeled IL-6 is added
30 and an IL-6 antagonist is added at the same time, and then the ¹²⁵I-labeled IL-6 bound to the IL-6 receptor-expressing cell is determined. In the above assay system, a negative control group containing no IL-6 antagonists, in addition to the group in which an IL-6
35 receptor antagonist is present, is set up, and the results obtained for them are compared to evaluate the IL-6-inhibiting activity of the IL-6 antagonist.

270

As described in the Example below, anti-IL-6 receptor antibody exhibited a therapeutic effect in patients with spinal cord injury. The subject to be treated in the present invention is a mammal. The
5 subject mammal to be treated is preferably a human.

The therapeutic agents for spinal cord injury of the present invention may be administered, either orally or parenterally, systemically or locally. For example, intravenous injection such as drip infusion,
10 intramuscular injection, intraperitoneal injection, subcutaneous injection, suppositories, intestinal lavage, oral enteric coated tablets, and the like can be selected, and the method of administration may be chosen, as appropriate, depending on the age and the conditions
15 of the patient.

The effective dosage is chosen from the range of 0.01 mg to 100 mg per kg of body weight per administration. Alternatively, the dosage in the range of 1 to 1000 mg, preferably 5 to 50 mg per patient may be
20 chosen. Preferred dosages and preferred methods of administration are such that, in the case of anti-IL-6 receptor antibody, the amounts wherein free antibody is present in the blood are effective dosages. In specific examples, 0.5 mg to 40 mg per kg of body weight,
25 preferably 1 mg to 20 mg, per month (4 weeks) are administered in one to several doses, for example in the administration schedule of twice per week, once per week, once every two weeks, once every four weeks and the like by intravenous injection such as drip infusion and
30 subcutaneous injection. The administration schedule can be adjusted by observing the disease conditions and blood levels of laboratory tests by, for example, extending the administration interval from twice per week or once per week to once per two weeks, once per three weeks, once
35 per four weeks, and the like.

The therapeutic agents for spinal cord injury of the present invention may contain pharmaceutically acceptable

carriers or additives depending on the route of administration. Examples of such carriers or additives include water, a pharmaceutical acceptable organic solvent, collagen, polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, a carboxyvinyl polymer, carboxymethylcellulose sodium, polyacrylic sodium, sodium alginate, water-soluble dextran, carboxymethyl starch sodium, pectin, methyl cellulose, ethyl cellulose, xanthan gum, gum Arabic, casein, gelatin, agar, diglycerin, propylene glycol, polyethylene glycol, Vaseline, paraffin, stearyl alcohol, stearic acid, human serum albumin (HSA), mannitol, sorbitol, lactose, a pharmaceutically acceptable surfactant and the like. Additives used are chosen from, but not limited to, the above or combinations thereof depending on the dosage form.

Examples

The present invention will now be explained in more details with reference to the examples and reference examples. It should be noted, however, that the present invention is not limited to them in any way.

Example 1

Materials and Methods

Animals:

Adult (18-22g) female c57BL/6J mice were used in all experiment groups.

Spinal cord injury:

Female mice were anesthetized by the intraperitoneal injection of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). The back was shaved, a 20 mm midline skin incision was made, and then the spine was exposed. After the thoracic region of the spine was exposed by separation to the sides of the back muscle, the spinous process of the T7-T13 vertebra was exposed. Laminectomy was made at the ninth thoracic spine level to expose the spinal cord taking care not to injure the dura mater. The spine was stabilized with forceps and clamps on the

T7 and T11 spinous processes and the ligament. After the animal body was floated by lowering the stage, spinal cord injury (SCI) was made by the NYU impactor. A 3g weight (the apex with a diameter of 1.2 mm) was dropped from a height of 25 mm to the T9 level spinal cord. Muscles and the incised part were closed in layers, and the animals were placed in a temperature-controlled chamber until temperature control is reestablished. Urination by manual bladder expulsion was performed twice per day until spontaneous urination was established.

Protocol and the injection of rat anti-mouse IL-6 receptor mAb (MR16-1):

Immediately after injury, 100 µg of MR16-1 per gram of mouse body weight was administered by a single intraperitoneal injection (the MR16-1 group, n=15), and the control group received the same amount of rat IgG by intraperitoneal injection (the control group, n=15). For histological and immunohistochemical analyses of the both groups, the intraperitoneal injection of BrdU (50 mg/kg body weight) was performed for two weeks from the day of surgery in order to label the dividing cells.

Evaluation of motor function:

Using three different tests, the present inventors evaluated the recovery of motor function after injury. The functional evaluation was continued to week 6 after injury.

Evaluation of motor function of the lower limbs: In order to evaluate the functional effect of SCI, the present inventors performed a motor function evaluation by the Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) score which has been commonly and widely used. Three different testers evaluated individual animals for four minutes in a double blind manner, and scored (0-21) the function of individual lower limbs as defined. All tests were recorded in videotapes.

SCANET: SCANET is an automated analytical system of animal movement comprising a cage equipped with an

infrared sensor frame. This monitors minor (M1) and major (M2) lateral and vertical motions (RG), i.e. the number of times of standing up, which quantitates the amount of motion spontaneously performed by the animal in a given time. In particular, it is said that there is a positive statistical relationship between the RG score and the BBB score.

Rotarod treadmill: The coordinated motion of four limbs was evaluated by placing a mouse on a revolving rod device comprising a plastic rod so as to force the mice to walk. The mouse was placed on the revolving rod at speeds of 5, 10 and 15 rpm, and the latent time until it dropped was monitored for 120 seconds. The function of coordinated motion was each evaluated from the mean value and the maximum.

Immunohistochemistry:

For histological examination, mice were anesthetized by inhalation of diethyl ether, and 4% paraformaldehyde was transcardiacly perfused, and the mice were fixed.

The spinal cord was extracted, and postfixed with 4% paraformaldehyde at room temperature for a few hours. The tissue sample was immersed in 10% sucrose at 4°C for 24 hours, and placed in 30% sucrose for 48 hours prior to embedding it in the OTC compound. The embedded tissue was frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. The cryosections were made by sagittal section and axial section at a thickness of 20 micrometers, and stained with the HE stain or the immunofluoro double stain.

For the immunofluoro double stain experiment, the spinal cord section was blocked in 0.03% Triton X-100 and 10% normal goat serum in 0.01M PBS (pH 7.4) for 30 minutes. As the primary antibody, rabbit anti-GFAP antibody, rat anti-Brd-U antibody and human anti-Hu antibody (as a neuron marker) were used, and incubated overnight at 4°C. As the secondary antibody FITC-conjugated rabbit IgG antibody and Texas Red-conjugated

rat antibody were used, and double-stained. The slides were washed, wet-fixed, and analyzed under a fluoromicroscope.

Western blot analysis:

5 Twelve hours after injury creation (n=4 for each group), a 8 mm segment of the spinal cord (from the center of injury, 4 mm proboscis side and 4 mm caudal side) was excised, which was homogenized in a MAPK bacteriolytic buffer containing a protease inhibitor, and
10 sonicated followed by centrifugation at 15,000 rpm. Protein was separated from the supernatant of each sample by SDS-PAGE, and blotted to a poly(difluoride) vinylidene membrane by electrophoresis. After the membrane was blocked in a TBST buffer containing 5% defatted milk, 150
15 mM NaCl and 0.05% Tween 20 (pH 7.5) at room temperature for one hour, either of polyclonal rabbit anti-stat3 antibody or rabbit anti-phosphorylated stat3 antibody or rabbit anti-IL-6R α antibody was used as the primary antibody, and then incubated together with HRP-conjugated
20 anti-rabbit IgG antibody as the secondary antibody. After developing into a film by an automated developer, it was quantitated by the α -imager.

Result:

(1) Evaluation of motor function of lower limbs

25 For 15 spinal cord injured mice that received anti-IL-6 receptor antibody (MR16) and 15 spinal cord injured mice (control) that did not receive the above antibody, mean values of BBB scores are shown in a graph in Fig. 1. After spinal cord injury, on day 7 and thereafter, the
30 recovery of motion was good in the group of mice that received MR16 antibody, and on week 5 and week 6 a significant difference was noted.

(2) SCANET

35 For 15 spinal cord injured mice that received anti-IL-6 receptor antibody (MR16) and 15 spinal cord injured mice (control) that did not receive the above antibody, lateral motion and the number of times of standing up

were compared, with a result that no significant difference was noted in lateral motion, but the standing up motion was observed in 12 of 15 spinal cord injured mice that received anti-IL-6 receptor antibody (MR16) whereas it was only observed in 3 of 15 spinal cord injured mice (control) that did not receive the above antibody. This difference was significant by Fisher's exact probability test with $p < 0.05$.

(3) Rotarod treadmill

For 15 spinal cord injured mice that received anti-IL-6 receptor antibody (MR16) and 15 spinal cord injured mice (control) that did not receive the above antibody, the above experiment was performed, with a result that no significant difference was noted when the revolving speed of the rod was 10 rpm (10 revolutions per minute) and 15 rpm, whereas at 5 rpm, as shown in Fig. 2, on day 358 and thereafter after spinal cord injury, the recovery of the spinal cord injured mice that received anti-IL-6 receptor antibody (MR16) was significantly ($p < 0.05$) higher than that of the spinal cord injured mice (control) that did not receive the above antibody.

(4) Immunohistochemical examination

Despite the presence of inherent neural stem cells in the adult spinal cord, the repair of the spinal cord due to the differentiation of the cells does not occur. This is probably because the inherent neural stem cells differentiate into glia precursor cells and further into astrocytes in the injured spinal cord and thus do not differentiate into neuronal cells. When the formation of reactive astrocytes was counted by an immunofluorescent method using anti-GFAP antibody and anti-BrDU antibody for the spinal cord of the injured part of four spinal cord injured mice that received anti-IL-6 receptor antibody (MR16) and the injured part of four spinal cord injured mice (control) that did not receive the above antibody, as shown in Fig. 3, the administration of the above antibody significantly reduced the formation of

reactive astrocytes ($p<0.01$).

(5) Western blot analysis

For four spinal cord injured mice and four spinal cord injured mice (control), the expression of IL-6 receptor at 12 hours after spinal cord injury was investigated by Western blot analysis. The result is shown in Fig. 4. The expression of IL-6 receptor was only observed in the spinal cord injured mice. Also, as shown in Fig. 5, the administration of MR16 suppressed the amount of phosphorylated STAT3, indicating that the intraperitoneally administered MR16 acted in the spinal cord.

The foregoing confirmed that IL-6 antagonists promote the repair of spinal cord injury.

Reference example 1. Preparation of human soluble IL-6 receptor

Soluble IL-6 receptor was prepared by the PCR method using a plasmid pBSF2R.236 containing cDNA that encodes IL-6 receptor obtained according to the method of Yamasaki et al., (Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828). Plasmid pBSF2R.236 was digested with a restriction enzyme Sph I to obtain the cDNA of IL-6 receptor, which was then inserted into mp18 (manufactured by Amersham). Using a synthetic oligoprimer designed to introduce a stop codon into the cDNA of IL-6 receptor, a mutation was introduced into the cDNA of IL-6 receptor by the PCR method using the in vitro Mutagenesis System (manufactured by Amersham). The procedure resulted in the introduction of a stop codon to the amino acid at position 345, and gave cDNA encoding soluble IL-6 receptor.

In order to express the cDNA of soluble IL-6 receptor in CHO cells, it was ligated to a plasmid pSV (manufactured by Pharmacia) to obtain a plasmid pSVL344. The cDNA of soluble IL-6 receptor that was cleaved with Hind III-Sal I was inserted to plasmid pECdhfr containing the cDNA of dhfr to obtain a plasmid

pECEdhfr344 that can be expressed in the CHO cells.

Ten µg of plasmid pECEdhfr344 was transfected to a dhfr-CHO cell line DXB-11 (Urlaub G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) by the calcium phosphate precipitation method (Chen C. et al., Mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745-2751). The transfected CHO cells were cultured for 3 weeks in a nucleoside-free α MEM selection medium containing 1 mM glutamine, 10% dialyzed FCS, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin.

The selected CHO cells were screened by the limiting dilution method to obtain a single CHO cell clone. The CHO cell clone was amplified in 20 nM - 200 nM methotrexate (MTX) to obtain a CHO cell line 5E27 that produces human soluble IL-6 receptor. The CHO cell line 5E27 was cultured in an Iscov-modified Dulbecco's medium (IMDM, manufactured by Gibco) containing 5% FBS. The culture supernatant was collected and the concentration of soluble IL-6 receptor in the culture supernatant was determined by ELISA. The result confirmed that soluble IL-6 receptor is present in the culture supernatant.

Reference example 2. Preparation of anti-human IL-6 antibody

Ten µg of the recombinant IL-6 (Hirano et al., Immunol. Lett., (1988) 17, 41) was used for immunizing BALB/c mice together with Freund's complete adjuvant, and this was repeated every week until anti-IL-6 antibody could be detected in the serum. Immune cells were extracted from local lymph nodes and were then fused with a myeloma cell line P3U1 using polyethylene glycol 1500. Hybridomas were selected according to the method of Oi et al. (Selective Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) that employs the HAT medium, and the hybridoma that produces anti-human IL-6 antibody was established.

The hybridoma that produces anti-human IL-6 antibody

was subjected to the IL-6 binding assay as follows. Thus, a 96-well microtiter plate made of flexible polyvinyl (manufactured by Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA) was coated with 100 μ l of goat anti-mouse Ig (10 μ l/ml, manufactured by Cooper Biomedical, Inc., Malvern, PA) overnight at 4°C in 0.1 M carbonate-hydrogen carbonate buffer, pH 9.6. Subsequently, the plate was treated with 100 μ l of PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA) at room temperature for 2 hours.

After washing it in PBS, 100 μ l of the hybridoma culture supernatant was added to each well, and then was incubated overnight at 4°C. The plate was washed, ^{125} I-labeled recombinant IL-6 was added to each well to a concentration of 2000 cpm/0.5 ng/well, and then the radioactivity of each well after washing was determined by a gamma counter (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA). Of 216 hybridoma clones, 32 were positive in the IL-6 binding assay. From these clones, stable MH166.BSF2 was finally obtained. Anti-IL-6 antibody MH166 produced by said hybridoma has a subtype of IgG1 κ .

Then, the IL-6-dependent mouse hybridoma clone MH60.BSF2 was used to examine a neutralizing activity with respect to the growth of the hybridoma by MH166 antibody. MH60.BSF2 cells were dispensed to 1×10^4 /200 μ l/well, and samples containing MH166 antibody were added thereto, cultured for 48 hours, 0.5 μ Ci/well of ^{3} H-thymidine (New England Nuclear, Boston, MA) was added, and the culturing was continued for further 6 hours. The cells were placed on a glass filter paper and were treated by the automatic harvester (Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan). As the control, rabbit anti-IL-6 antibody was used.

As a result, MH166 antibody inhibited, in a dose dependent manner, the incorporation of ^{3} H-thymidine of

MH60.BSF2 cells induced by IL-6. This revealed that MH166 antibody neutralizes the activity of IL-6.

Reference example 3. Preparation of anti-human IL-6 receptor antibody

5 Anti-IL-6 receptor antibody MT18 prepared by the method of Hirata et al. (Hirata, Y. et al. J. Immunol., (1989) 143, 2900-2906) was bound to CNBr-activated Sepharose 4B (manufactured by Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) according to the attached regimen, and
10 IL-6 receptor (Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828) was purified. A human myeloma cell line U266 was solubilized with 1 mM p-para-aminophenyl methane sulfonyl fluoride hydrochloride (manufactured by Wako Chemicals) (digitonin buffer) containing 1% digitonin
15 (manufactured by Wako Chemicals), 10 mM triethanolamine (pH 7.8) and 0.15 M NaCl, and mixed with MT18 antibody bound to Sepharose 4B beads. Then, the beads were washed six times with the digitonin buffer to prepare the partially purified IL-6 receptor to be used for
20 immunization.

 BALB/c mice were immunized four times every ten days with the above partially purified IL-6 receptor obtained from 3×10^9 U266 cells, and then a hybridoma was prepared using a standard method. The hybridoma culture
25 supernatant from the growth-positive well was tested for its activity of binding to IL-6 receptor according to the method described below. 5×10^7 U266 cells were labeled with ^{35}S -methionine (2.5 mCi) and were solubilized with the above digitonin buffer. The solubilized U266 cells
30 were mixed with a 0.04 ml volume of MT18 antibody bound to Sepharose 4B beads, and then were washed six times with the digitonin buffer. ^{35}S -methionine-labeled IL-6 receptor was eluted with 0.25 ml of the digitonin buffer (pH 3.4) and was neutralized in 0.025 ml of 1M Tris (pH
35 7.4).

 0.05 ml of the hybridoma culture supernatant was mixed with 0.01ml of Protein G Sepharose (manufactured by

Pharmacia). After washing, Sepharose was incubated with 0.005 ml ³⁵S-labeled IL-6 receptor solution prepared as described above. The immunoprecipitate was analyzed by SDS-PAGE to investigate the hybridoma culture supernatant that reacts with IL-6 receptor. As a result, a reaction-positive hybridoma clone PM-1 (FERM BP-2998) was established. The antibody produced from the hybridoma PM-1 has a subtype of IgG1 κ.

The inhibitory activity of the antibody produced by the hybridoma PM-1 on the binding of IL-6 to human IL-6 receptor was studied using the human myeloma cell line U266. A human recombinant IL-6 was prepared from E. coli (Hirano et al., Immunol. Lett., (1988) 17, 41-45), and was labeled with ¹²⁵I using the Bolton-Hunter reagent (New England Nuclear, Boston, MA) (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981).

4 × 10⁵ U266 cells were cultured with the 70% (v/v) culture supernatant of hybridoma PM-1 together with 14,000 cpm of ¹²⁵I-labeled IL-6 for one hour. Seventy μl of the sample was layered on 300 μl FCS in a 400 μl microfuge polyethylene tube. After centrifugation, the radioactivity of the cell was determined.

The result revealed that the antibody produced by the hybridoma PM-1 inhibits the binding of IL-6 to IL-6 receptor.

Reference example 4. Preparation of mouse anti-IL-6 receptor antibody

A monoclonal antibody directed against mouse IL-6 receptor was prepared according to the method described in Saito, et al., J. Immunol. (1991) 147, 168-173.

The CHO cells that produce mouse soluble IL-6 receptor were cultured in the IMDM culture liquid containing 10% FCS. From the culture supernatant, mouse soluble IL-6 receptor was purified using an affinity column in which anti-mouse IL-6 receptor antibody RS12 (see Saito, et al., supra) had been fixed to Affigel 10

gel (manufactured by Biorad).

5 The mouse soluble IL-6 receptor (50 µg) thus
obtained was mixed with Freund's complete adjuvant, which
was then injected to the abdomen of Wistar rats. From
two weeks after the administration, the animals were
boosted with Freund's incomplete adjuvant. On day 45,
10 rat spleen cells were harvested, and about 2×10^8 cells
thereof were fused with 1×10^7 mouse myeloma cells P3U1
using a 50% PEG1500 (manufactured by Boehringer Mannheim)
according to the conventional method, and then were
screened by the HAT culture medium.

15 After the hybridoma culture supernatant was added to
the plate coated with rabbit anti-rat IgG antibody
(manufactured by Cappel), mouse soluble IL-6 receptor was
reacted. Subsequently, using rabbit anti-mouse IL-6
receptor antibody and alkaline phosphatase-labeled sheep
anti-rabbit IgG, hybridomas producing antibody directed
against mouse soluble IL-6 receptor were screened by
ELISA. Hybridoma clones for which antibody production
20 was confirmed were subscreened twice to obtain a single
hybridoma clone. The clone was designated as MR16-1.

25 The neutralizing activity of the antibody produced
by the hybridoma on signal transduction of mouse IL-6 was
examined by ^3H -thymidine incorporation using MH60.BSF2
cells (Matsuda, T. et al., J. Immunol. (1988) 18, 951-
956). To a 96-well plate, MH60.BSF2 cells were prepared
at 1×10^4 cells/200 µl/well. To the plate were added 10
pg/ml mouse IL-6 and MR16-1 antibody or RS12 antibody at
12.3 - 1000 ng/ml, then they were cultured at 37°C and 5%
30 CO₂ for 44 hours, and then 1 µCi/well of ^3H -thymidine was
added. After 4 hours, the incorporation of ^3H -thymidine
was measured. As a result, it was found that MR16-1
antibody suppressed the incorporation of ^3H -thymidine by
the MH60.BSF2 cells.

35 Thus, it was demonstrated that the antibody produced
by the hybridoma MR16-1 (FERM BP-5875) inhibits the

- 42 -

binding of IL-6 to IL-6 receptor.

CLAIMS

1. A therapeutic agent for spinal cord injury comprising an interleukin-6 (IL-6) antagonist as an active ingredient.

5 2. The therapeutic agent for spinal cord injury according to claim 1 wherein said IL-6 antagonist is an antibody against IL-6 receptor.

 3. The therapeutic agent for spinal cord injury according to claim 2 wherein said antibody is a
10 monoclonal antibody.

 4. The therapeutic agent for spinal cord injury according to claim 2 or 3 wherein said antibody is a monoclonal antibody against human IL-6 receptor.

 5. The therapeutic agent for spinal cord injury according to claim 2 or 3 wherein said antibody is a
15 monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor.

 6. The therapeutic agent for spinal cord injury according to any one of claims 1 to 4 wherein said antibody is a recombinant antibody.

20 7. The therapeutic agent for spinal cord injury according to any one of claims 1 to 6 wherein said monoclonal antibody against human IL-6 receptor is PM-1 antibody.

 8. The therapeutic agent for spinal cord injury according to claim 5 wherein said monoclonal antibody
25 against mouse IL-6 receptor is MR16-1 antibody.

 9. The therapeutic agent for spinal cord injury according to any one of claims 1 to 8 wherein said
30 antibody is a chimeric antibody, a humanized antibody, or a human antibody against IL-6 receptor.

 10. The therapeutic agent for spinal cord injury according to claim 9 wherein said humanized antibody is a humanized PM-1 antibody.

35 11. A modulator of differentiation of neural stem cells comprising an interleukin-6 (IL-6) antagonist as an active ingredient.

 12. An inhibitor of differentiation into glia cells

comprising an interleukin-6 (IL-6) antagonist as an active ingredient.

5 13. The use of an interleukin-6 (IL-6) antagonist for the manufacture of a therapeutic agent for spinal cord injury.

 14. The use according to claim 13 wherein said IL-6 antagonist is an antibody against IL-6 receptor.

 15. The use according to claim 14 wherein said antibody is a monoclonal antibody.

10 16. The use according to claim 13 or 14 wherein said antibody is a monoclonal antibody against human IL-6 receptor.

15 17. The use according to claim 14 or 15 wherein said antibody is a monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor.

 18. The use according to any one of claims 13 to 16 wherein said antibody is a recombinant antibody.

20 19. The use according to any one of claims 13 to 18 wherein said monoclonal antibody against human IL-6 receptor is PM-1 antibody.

 20. The use according to claim 17 wherein said monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor is MR16-1 antibody.

25 21. The use according to any one of claims 13 to 20 wherein said antibody is a chimeric antibody, a humanized antibody, or a human antibody against IL-6 receptor.

 22. The use according to claim 21 wherein said humanized antibody is a humanized PM-1 antibody.

30 23. The use of interleukin-6 (IL-6) antagonist for the manufacture of a modulator of differentiation of neural stem cells.

 24. The use of interleukin-6 (IL-6) antagonist for the manufacture of an inhibitor of differentiation into glia cells.

35 25. A therapeutic method for spinal cord injury of a subject which comprises administering an interleukin-6 (IL-6) antagonist to the subject.

6
BOS

26. The method according to claim 25 wherein said IL-6 antagonist is an antibody against IL-6 receptor.

27. The method according to claim 26 wherein said antibody is a monoclonal antibody.

5 28. The method according to claim 26 or 27 wherein said antibody is a monoclonal antibody against human IL-6 receptor.

10 29. The method according to claim 26 or 27 wherein said antibody is a monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor.

30. The method according to any one of claims 25 to 28 wherein said antibody is a recombinant antibody.

15 31. The method according to any one of claims 25 to 30 wherein said monoclonal antibody against human IL-6 receptor is PM-1 antibody.

32. The method according to claim 29 wherein said monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor is MR16-1 antibody.

20 33. The method according to any one of claims 25 to 32 wherein said antibody is a chimeric antibody, a humanized antibody, or a human antibody against IL-6 receptor.

34. The method according to claim 33 wherein said humanized antibody is a humanized PM-1 antibody.

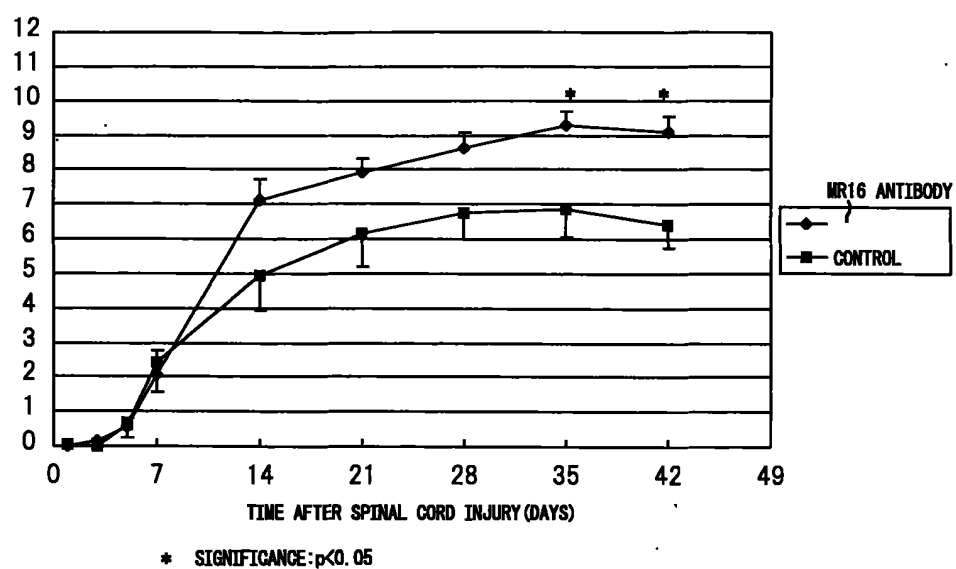
25 35. A method of modulating the differentiation of neural stem cells of a subject which comprises administering an interleukin-6 (IL-6) antagonist to the subject.

30 36. A method of inhibiting differentiation into glia cells, in a subject, which comprises administering an interleukin-6 (IL-6) antagonist to the subject.

ABSTRACT

5 A therapeutic agent for spinal cord injury, a
modulator of differentiation of neural stem cells and an
inhibitor of differentiation into glia cells comprising
an interleukin-6 antagonist as an active ingredient.

Fig.1



2/5

Fig.2

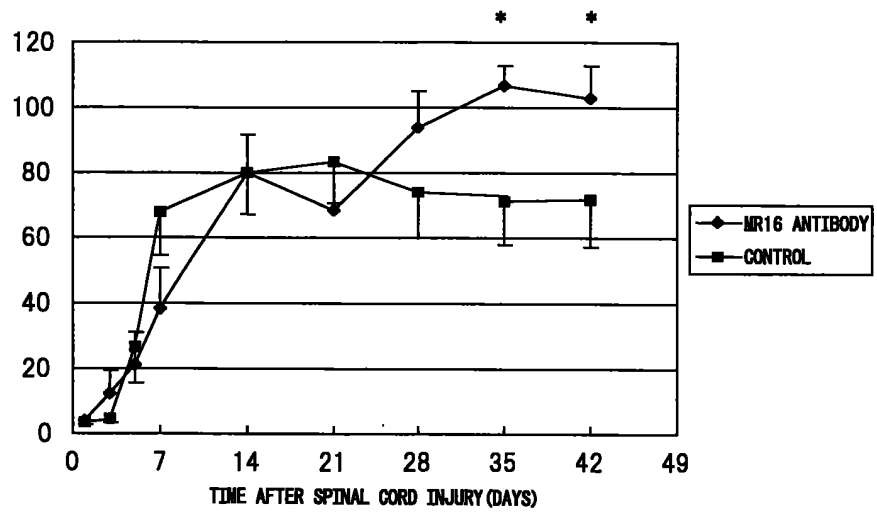


Fig.3

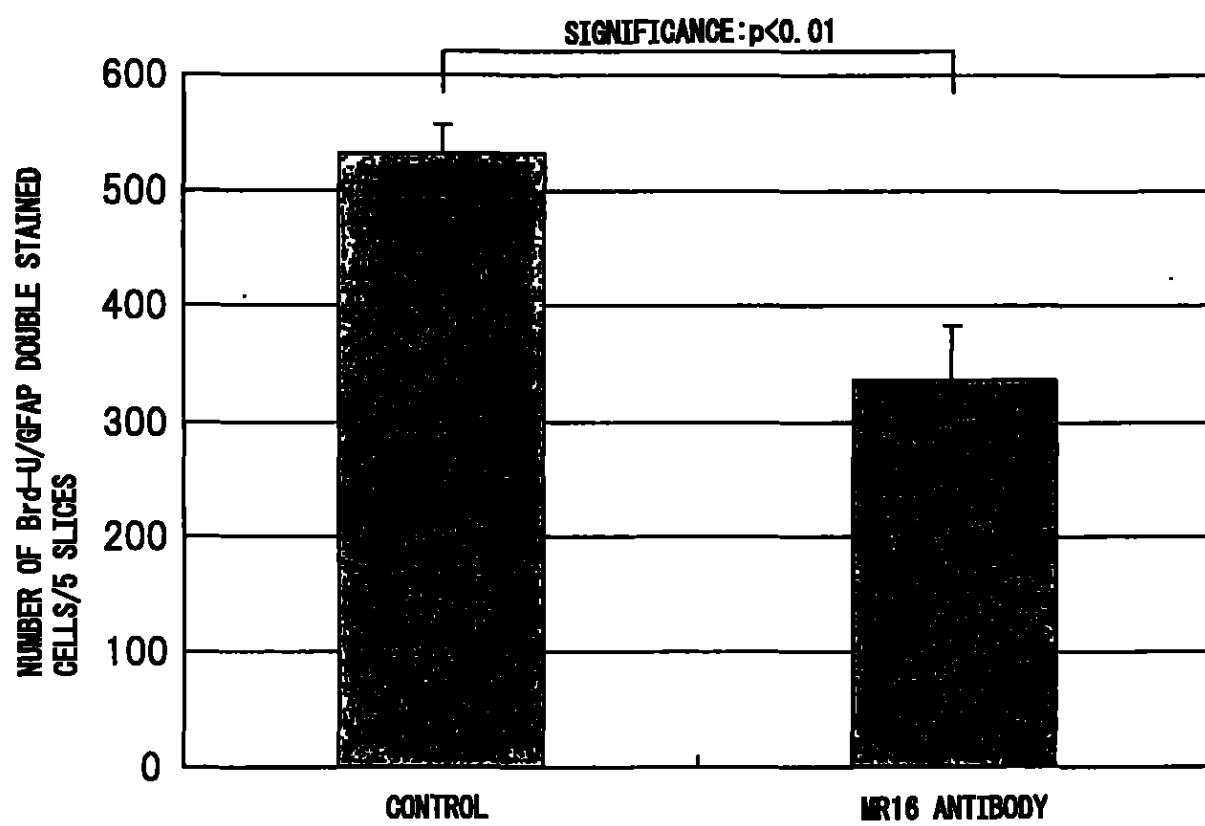


Fig. 4

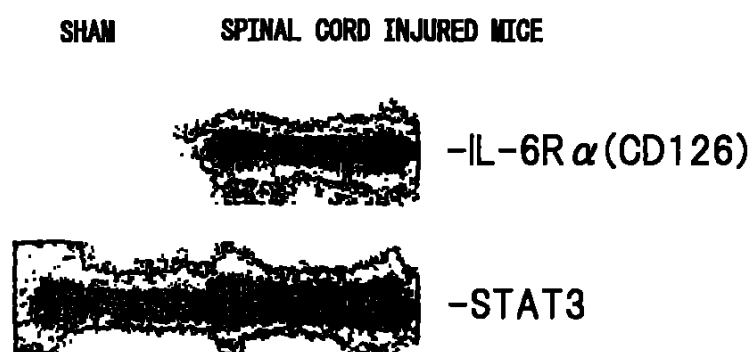
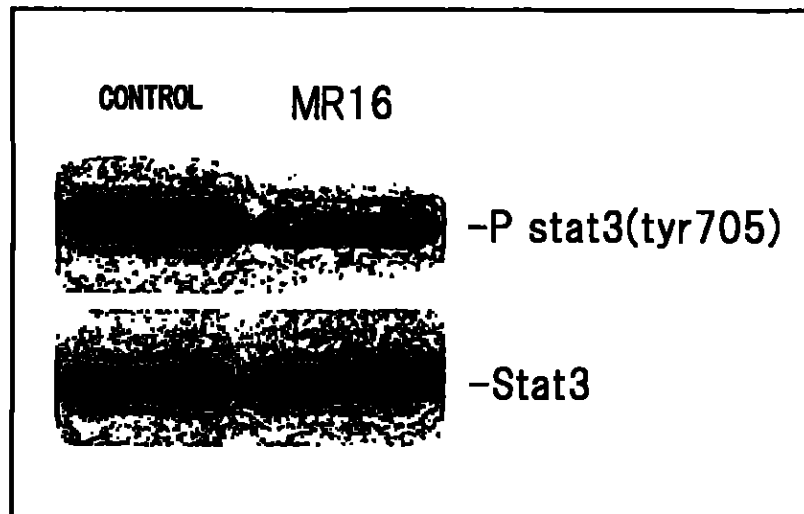
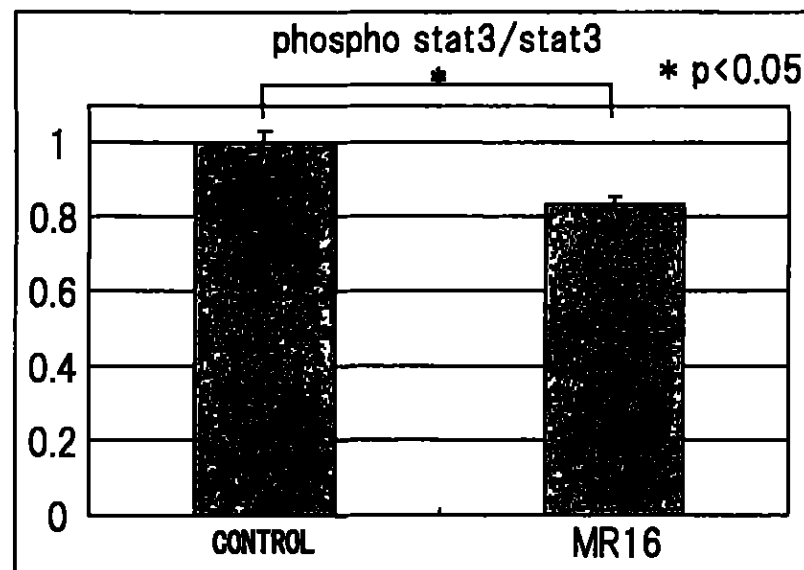


Fig.5

(A)



(B)



DESCRIPCIÓN

AGENTE TERAPÉUTICO PARA DAÑO DE ESPINA DORSAL QUE COMPRENDE ANTAGONISTA DE INTERLEUCINAS-6

Campo Técnico

La presente invención se relaciona con un agente terapéutico para daño de la espina dorsal que comprende antagonista de interleucina-6 (IL-6) como un ingrediente activo.

Técnica Anterior

En la sociedad de hoy, una persona puede sufrir de daño de espina dorsal debido a un accidente en vehículo motor como una caída, una voltereta, daño en deportes y similar. En Japón, el número anual de gente afectada es aproximadamente 5000 con un número acumulado de pacientes que posiblemente llegan a 100,000. Los síntomas del daño de espina dorsal son muy severos incluyendo cuadriplejía permanente, parálisis motor y parálisis sensorial, desordenes de la vejiga y el recto, desordenes respiratorios etc., y el manejo diario de estos incluye rehabilitación, manejo respiratorio, prevención de úlcera de decúbito, el manejo de defecación de orina, y similares.

Como regimenes terapéuticos para el daño de espina dorsal, no se encuentran en el momento métodos efectivos de tratamiento y existen solo tratamientos sintomáticos que incluyen estabilización local tal como cirugía. Con el fin de evitar el agravamiento de las condiciones patológicas, los ácidos administrados

esteroides en grandes cantidades, pero no se han obtenido resultados que indiquen la recuperación de la parálisis. Muchos daños de espina dorsal inician con un daño (daño primario) por una acción mecánica externa y progreso adicional destrucción de tejido (daño secundario) a través de los caminos de reacción en el cuerpo viviente. La única droga para uso en la inhibición de la progresión de tales daños secundarios es la metil prednisolona, que ha sido administrada en cantidades tan grandes como cerca de 10,000 mg. Se ha reportado, sin embargo, que éste método +esta asociado con efectos colaterales tal como el agravamiento de la diabetes melitus y neumonía.

En el inicio del siglo 19, Ramón y Cajal, un neuroanatomista, estableció en su libro "El sistema nervioso central, (el cerebro y la espina dorsal) de mamíferos es incapaz de regeneración una vez que este se ha dañado", y desde entonces esto se ha creído. En los 90, sin embargo, el implante de nervios periféricos para daño de espina dorsal (A. Aguayo et al., J. Exp. Biol. 95: 231-240, 1981) y el implante de espina dorsal fetal (Bregman B. S., Dev. Brain. Res., 34:265-279, 1987) se han reportado, indicando que aún después del daño de espina dorsal la regeneración de axones dañados se puede observar si ha sido introducido un ambiente apropiado en el sitio dañado. También, una multiplicidad de reportes sobre regeneración axonal ha sido hecha tal como la promoción de la regeneración de axones dañados por factores neurotróficos (Cai, D. et al., Neuron, 22:89-101, 1999), la identificación de factores inhibitorios de crecimiento axonal (Chen, D. et al., Nature 403:434-439, 2000) y similares, sugiriendo que la regeneración de el daño de espina dorsal dañada puede ser una realidad. Sin embargo, la aplicación clínica del implante de espina dorsal fetal es muy difícil debido al almacenamiento de los donadores y a problemas éticos.

Adicionalmente, las células madre neurales, son células no diferenciadas (pluripotentes) del sistema nervioso que se pueden propagar y pasajes repetidos (habilidad auto-replicante) y simultáneamente generar tres tipos de células (neuronas, astrocitos, oligodendrocitos) que constituyen el sistema nervioso central y, como también ocurre en la espina dorsal del adulto, ellas asumen ser capaces de reparar tejidos dañados. De hecho, sin embargo, ellos no diferencian el neuronas después del daño, y todas se diferencian en células glía formando de esta manera cicatrices.

Existen reportes esporádicos sobre citoquinas involucradas en inducción de diferenciación en células madre neurales. Weiss et al, reportó que la diferenciación de las células madre neurales derivadas de un cuerpo estriado de un feto de ratón en neuronas se promovió mediante el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) (Ahmed, S. et al., J. Neurosci. 15:5765-5778, 1995). Ghosh et al también reportaron que la diferenciación de las células madre neurales derivadas de la piel cerebral de un feto de rata en neuronas se promueve por la neurotrofina-3 (NT-3) (Ghosh, A. et al., Neurón 15:89-103, 1995). McKay et al. Reportaron que la diferenciación de las células madre neurales derivadas del hipocampus de un feto de rata es "instructivamente" inducido en neuronas mediante factor neurotrófico derivado de plaqueta (PDNF), en astrocitos por factor neurotrófico ciliar (CNTF), y en oligodendrocitos por hormona tiroidea (T3) (Jones, K. et al., Gene & Dev. 10:3129-3140).

Adicionalmente, Taga et al. Reportaron recientemente que la diferenciación de las células madre neurales derivadas de las células epiteliales neurales de un feto de ratón en astrocitos es promovida por un factor inhibitorio de leucemia (LIF) y proteína-2 morfogénica de hueso (BMP-2) (Nakashima et al., Science 284:479-

482, 1992). Lo común a estos reportes es la llamada superfamilia IL-6 tal como CNTF y LIF. Así, una vía de señal gp130, es una subunidad de un receptor de citoquina, se cree que induce la diferenciación de las células madre neurales en astrositos.

Sin embargo, no existe literatura que demuestre que el daño de espina dorsal puede ser reparado por la inducción de diferenciación de células madre neurales mediante citoquinas.

El IL-6 es una citoquina que también es denominada factor 2 estimulante de célula B (BSF2) o interferón de $\beta 2$. El IL-6 fue descubierto como un factor de diferenciación involucrado en la activación de células B-lifáticas (Hirano, T. et al., *Nature* (1986) 324, 73-76). Posteriormente, se encontró que era una citoquina multifuncional que influencia varias funciones de la célula (Akira, S. et al., *Adv. In Immunology* (1993) 54, 1-78). El IL-6 ha sido reforzado por inducir la maduración de las células linfáticas T (Lotz, M. et al., *J. Exp. Med.* (1998) 167, 1253-1258).

El IL-6 transmite su actividad biológica a través de dos tipos de proteína sobre la célula. Una de ellas es el receptor IL-6, una proteína unida al ligando con un peso molecular de aproximadamente 80 kD al cual se une IL-6 (Taga T. et al., *J. Exp. Med.* (1987) 166, 967-981; Yamasaki, K. et al., *Science* (1987) 241, 825-828). El receptor IL-6 ocurre no solamente en forma unida a la membrana que penetra a través y es expresado en la membrana de la célula sino también como un receptor IL-6 soluble que consiste principalmente de la región extracelular.

La otra es una proteína unida a membrana la gp130 que tiene un peso molecular de aproximadamente 130 kD que esta involucrado en transducción de señal no

unida al ligando. El IL-6 receptor IL-6 forman el complejo receptor IL-6/IL-6 el cual, después de unirse al gp130, transmite la actividad biológica del IL-6 a la célula (Taga, T. et al., Cell (1989) 58, 573-581).

Un antagonista IL-6 es una sustancia que inhibe la transducción de actividad biológica de IL-6. Han sido conocidos hasta ahora anticuerpos dirigidos contra el IL-6 (anticuerpos anti-IL-6), anticuerpo dirigido contra receptor IL-6 (anticuerpo receptor anti IL-6, anticuerpo dirigido contra gp130 (anticuerpo anti-gp130), IL-6 alterado, péptidos parciales de IL-6 o receptor de IL-6 y similares.

El anticuerpo receptor anti-IL-6 ha sido descrito en varios reportes (Novick D. et al., Híbrido (1991) 10, 137-146, Huang, Y. W. et al., Híbrido (1993) 12, 621-630, Publicación de Patente Internacional WO 95-09873, Solicitud de Patente Francesa FR 2694767, Patente Estadounidense US 521628). El anticuerpo PM-1 humanizado se obtuvo mediante trasplante de la región que determina la complementariedad (CDR) de uno de ellos, un anticuerpo de ratón PM-1 (Hirata, Y. et al., J. Immunology (1989) 143, 2900-2906), a un anticuerpo humano (la Publicación de Patente Internacional WO 92-19759).

El documento de patente 1: WO95-09873

El documento de patente 2: FR 2694767

El documento de patente 3: USP 0521628

El documento no patente 1: A. Aguayo et al., J. Exp. Biol. 95: 231-240, 1981

El documento no patente 2: Bregman B. S., Dev. Brain Res. 34: 265-279, 1987

El documento no patente 3: Cai, D. et al., Neuron 22: 89-101, 1999

El documento no patente 4: Chen, D. et al., Nature 403: 434-439, 2000

El documento no patente 5: Ahmed, S. et al., J. Neurosci. 15: 5765-5778, 1995

El documento no patente 6: Ghosh, A. et al., Neuron 15: 89-103, 1995

El documento no patente 7: Jone, K. et al., Gene & Dev. 10: 3129-3140, 1996

El documento no patente 8: Nakashima, K. et al., Science 284: 479-482, 1999

El documento no patente 9: Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76

El documento no patente 10: Akira, S. et al., Adv. in. Immunology (1993) 54, 1-78

El documento no patente 11: Lotz, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258

El documento no patente 12: Taga, T. et al., Cell (1989) 58, 573-581

El documento no patente 13: Yamasaki, K. et al., Science (1987) 241, 825-828

El documento no patente 14: Novick, D. et al., Hibridoma (1991) 10, 137-146

El documento no patente 15: Huang, Y.W. et al., Hibridoma (1993) 12, 621-630

El documento no patente 16: Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906

Descripción de la Invención

Así, subsiste la necesidad para un medio terapéutico que no solamente evite el agravamiento de una condición de un daño de espina dorsal sino también ayude a la recuperación de este, y la presente invención suministra una composición farmacéutica útil como uno de los medios.

Después de estudios intensivos y extensivos para resolver el problema anterior, los presentes inventores han encontrado que el agonista contra IL-6, por ejemplo, el anticuerpo contra el receptor IL-6 tiene un efecto de ayudar a la recuperación de daño de espina dorsal. Así, la presente invención suministra un agente terapéutico para el tratamiento de un daño de espina dorsal que comprende antagonista de interleucina-6 (IL-6) como un ingrediente activo.

La presente invención también suministra un modulador de la diferenciación de las células madre neurales que comprende un antagonista de interleucina -6 (IL-6) como un ingrediente activo.

La presente invención también suministra un inhibidor de diferenciación en células glia que comprende antagonista de interleucina-6 que comprende antagonista de interleucina-6 (IL-6) como un ingrediente activo.

El antagonista IL-6 anterior es preferiblemente un anticuerpo contrareceptor IL-6, y más preferiblemente un anticuerpo monoclonal. Como tal anticuerpo monoclonal, se puede mencionar, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal contra receptor IL-6 humano y un anticuerpo monoclonal contra receptor IL-6 de ratón. Como un ejemplo específico del anticuerpo monoclonal anterior contra receptor IL-6 humano, se puede mencionar por ejemplo el anticuerpo PM-1, y como un ejemplo específico del anticuerpo monoclonal anterior contra el receptor IL-6 de ratón, se puede mencionar por ejemplo el anticuerpo MR16-1. adicionalmente, como un anticuerpo contra receptor IL-6 se puede mencionar un anticuerpo recombinante, por ejemplo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, y similar, que ha sido obtenido al trabajar con ingeniería artificialmente un gen clonado proveniente de un hibridoma que produce anticuerpo monoclonal.

Breve Explicación de los Dibujos

La figura 1 es una gráfica que muestra que la recuperación del movimiento después del daño de espina dorsal es mayor en ratones con daño de espina dorsal que recibieron un anticuerpo receptor anti- IL-6 (MR16) comparado con los

ratones con daño de espina dorsal (control) que no recibieron el anticuerpo anterior en la evaluación de función motora de las extremidades inferiores.

La figura 2 es una gráfica que muestra que la recuperación de la coordinación del movimiento después de daño de espina dorsal es mayor en ratones con daño de espina dorsal que recibieron un anticuerpo receptor anti- IL-6 (MR16) comparados con ratones de daño de espina dorsal (control) que no recibieron el anticuerpo anterior en el ensayo de cinta rodante Rotarod.

La figura 3 es una gráfica que muestra que la formación gila en el sitio de daño de espina dorsal ha sido inhibida en ratones con daño de espina dorsal que recibieron un anticuerpo receptor anti- IL-6 (MR16) comparado con los ratones de daño de espina dorsal (control) que no recibieron el anticuerpo anterior.

La figura 4 es una gráfica que muestra que el receptor IL-6 ha sido expresado en el sitio de daño de espina dorsal en ratones con daño de espina dorsal comparado con ratones (sham) que no tenían daño de espina dorsal.

La figura 5 es el "Western blot" de un STAT3 fosforilado que muestra que la administración de un anticuerpo receptor anti- IL-6 (MR16) de hecho inhibió la cascada de señal de IL-6 en el sitio de daño de espina dorsal.

Mejor Modo de Llevar a Cabo la Invención

Los antagonistas IL-6 para uso en la presente invención pueden ser de cualquier origen, cualquier clase, y cualquier forma, en tanto ellos exhiban un efecto terapéutico sobre el daño de espina dorsal.

La transducción de señal de un bloque de antagonistas IL-6 mediante IL-6 y la inhibición de la actividad biológica de IL-6. Los antagonistas de IL-6 son preferiblemente sustancias que tienen una actividad de inhibir la unión de un IL-6, un receptor de IL-6, y gp130. Como los antagonistas IL-6, se puede mencionar por ejemplo anticuerpo anti- IL-6, anticuerpo receptor anti- IL-6, anticuerpo anti-gp130, IL-6 alterado, receptor IL-6 soluble alterado, un péptido parcial de IL-6 o receptor IL-6, y una sustancia de bajo peso molecular que tiene la misma actividad que estos.

Anticuerpos anti- IL-6 para uso con la presente invención se pueden obtener como anticuerpos policlonales o monoclonales utilizando un método conocido. Como los anticuerpos anti- IL-6 para uso en la presente invención, anticuerpos monoclonales de, en particular, un origen de mamífero, son los preferidos. Los anticuerpos monoclonales de origen mamífero incluyen aquellos producidos por un hibridoma o un anticuerpo recombinante producido por un huésped que ha sido transformado con un vector de expresión que contiene genes de anticuerpo trabajados con ingeniería genética. Estos anticuerpos, por vía de unión a IL-6, bloquean la unión del IL-6 al receptor IL-6, y de esta manera bloquean la transducción de señal de la actividad biológica de IL-6 en la célula.

Ejemplos de tales anticuerpos incluyen MH166 (Matsuda T. et al., Eur. J. Immunol. (1988) 18, 951-956) y un anticuerpo SK2 (Sato, K. et al., The 21st Nihon Menekigakkai Soukai (General Meeting of the Japan Immunology Society), Academic Record (1991) 21, 166) y similares.

Un hibridoma que produce anticuerpo anti- IL-6 puede ser básicamente construido utilizando un procedimiento conocido como el descrito adelante. Así, el IL-6 puede ser utilizado como un antígeno sensibilizante que es inmunizado y el método convencional de inmunización. Las células inmunes así obtenidas son fusionadas con células padres conocidas en el proceso de fusión de célula convencional, y luego las células que producen anticuerpo monoclonal son seleccionadas mediante el método de selección convencional para preparar el hibridoma deseado.

Específicamente, el anticuerpo anti- IL-6 puede ser obtenido de la siguiente manera. Por ejemplo, un IL-6 humano para uso como el antígeno sensibilizante para obtener anticuerpo puede ser obtenido utilizando la secuencia de gen/aminoácido IL-6 descrita en Eur. J. Biochem (1987) 168, 543-550, J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541, o Agr. Biol. (1990) 54, 2685-2688.

Después de que una célula huésped adecuada es transformada al insertar la secuencia de gen IL-6 en un sistema de vector de expresión conocido, la proteína IL-6 de interés es purificada de la célula huésped o del supernadante del cultivo de este, y la proteína IL-6 purificada utilizada como el antígeno sensibilizante. Alternativamente, la proteína de fusión de la proteína IL-6 y otra proteína, pueden ser utilizadas como el antígeno sensibilizante.

Los anticuerpos receptores anti- IL-6 para uso en la presente invención se pueden obtener como anticuerpos policlonales o monoclonales utilizando un método conocido. Los anticuerpos de receptor anti- IL-6 para uso en la presente invención, los anticuerpos monoclonales de, en particular un origen mamífero, son los preferidos. Los anticuerpos monoclonales de un origen mamífero incluyen aquellos

producidos por un hibridoma y aquellos producidos por un huésped que ha sido transformado con un vector de expresión que contiene genes de anticuerpo trabajados con Ingeniería genética. Los anticuerpos, por vía de unión al receptor IL-6, inhiben la unión del IL-6 al receptor IL-6, y de esta manera bloquean la transducción de la actividad biológica del IL-6 a la célula.

Ejemplos de tales anticuerpos incluyen el anticuerpo MR16-1 (Tramura, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924-11928), El anticuerpo PM-1 (Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2908), o el anticuerpo AOK12-20, el anticuerpo AUK64-7 o el anticuerpo AUK146-15 (publicación de Patente Internacional WO 92-19759) y similares. Entre ellos, el anticuerpo PM-1 es más preferido.

Incidentalmente, la línea de célula de hibridoma que produce el anticuerpo PM-1 ha sido internacionalmente depositada bajo las provisiones del Tratado de Budapest como PM-1 en julio 12, 1989 con el Patent Microorganism Depository of National Institute of Industrial Science and Technology, of Chuo 6, 1-1 Higashi 1-chome, ciudad Tsukuba, Ibaraki pref., Japón, como FERM BP-2998. La línea de célula de hibridoma que produce el anticuerpo MR16-1 ha sido depositado internacionalmente bajo las previsiones del Tratado de Budapest como el hibridoma de Rata-ratón MR16-1 en marzo 13, 1997 con el Patent Microorganism Depository of National Institute of Industrial Science and Technology, of Chuo 6, 1-1, Higashi 1-chome, ciudad Tsukuba, Ibaraki pref., Japón, como FERM BP-5875.

Los hibridomas que producen anticuerpo monoclonal del receptor anti- IL-6 pueden ser básicamente preparados utilizando un procedimiento conocido como se describió adelante. Así, el receptor IL-6 es utilizado como un antígeno

sensibilizante y es inmunizado de acuerdo con el método convencional de inmunización. Las células inmunes así obtenidas son fusionadas con células madre conocidas en el proceso de fusión de célula convencional, y entonces las células que producen anticuerpo monoclonal pueden ser seleccionadas mediante método de selección convencional para preparar el hibridoma deseado.

Específicamente, el anticuerpo receptor anti- IL-6 puede ser preparado de la siguiente manera. Por ejemplo, el receptor IL-6 humano como el antígeno sensibilizante para obtener anticuerpo puede ser obtenido utilizando la secuencia de gen receptor/secuencia aminoácido descrita en la Solicitud de Patente Europea EP 325474, y el receptor IL-6 de ratón puede ser obtenido utilizando la secuencia de gen receptor IL-6, la secuencia de aminoácido descrita en la Publicación de Patente Japonesa no Examinada (Kokai) 3-155795.

Existen dos tipos de proteínas receptoras IL-6: el receptor IL-6 expresado sobre la membrana de la célula, el receptor IL-6 separado de la membrana de la célula (receptor IL-6 soluble) (Yasukawa K. et al., J. Biochem, (1990) 108, 673-676). El anticuerpo receptor IL-6 soluble está compuesto sustancialmente de la región extracelular del receptor IL-6 unido a la membrana de la célula, y por lo tanto es diferente del receptor IL-6 unido a membrana por que al anterior le falta la región de transmembrana o ambas de la región de transmembrana en la región intracelular. Como la proteína receptora IL-6, cualquier receptor IL-6 puede ser utilizado, en tanto éste puede ser utilizado como un antígeno sensibilizante para la producción del anticuerpo receptor anti- IL-6 para uso en la presente invención.

Después de que la secuencia genética receptor IL-6 es insertada en el sistema de vector de expresión conocido para transformar una célula huésped apropiada, en

la proteína receptora IL-6 deseada puede ser purificada de la célula huésped o un supernadante de cultivo de este utilizando un método conocido, y la proteína receptora IL-6 purificada puede ser utilizada como el antígeno sensibilizante. Alternativamente, las células que están expresando receptor IL-6 o una proteína de fusión de la proteína receptora IL-6 y otra proteína pueden ser utilizadas como el antígeno sensibilizante.

La *Escherichia coli* (E. coli) que tiene un plásmido de pIBBSF2R que contiene receptor IL-6 humano que codifica cADN ha sido internacionalmente depositada bajo las previsiones del Tratado de Budapest como HB101-pIBBSF2R en enero 9, 1989 con el Patent Microorganism Depository of National Institute of Industrial Science and Technology, of Chuo 6, 1-1, Higashi 1-Chome, como ciudad Tsukuba, Ibaraki pref., Japon, como FERM BP-2232.

Los anticuerpos anti-gp130 para uso en la presente invención puede ser obtenidos como anticuerpos policlonales o monoclonales que utiliza un método conocido. Los anticuerpos anti-gp130 para uso de la presente invención, anticuerpos monoclonales de, en particular un origen mamífero, son los preferidos. Los anticuerpos monoclonales de un origen mamífero incluyen aquellos producidos por hibridoma y aquellos producidos por un huésped que ha sido transformado con un vector de expresión que contiene genes de anticuerpo trabajados con ingeniería genética. Los anticuerpos, por vía de unión al gp130, inhiben la unión del complejo receptor IL-6 al gp130, y de esta manera bloquea la transducción de la actividad biológica del IL-6 hacia la célula.

Ejemplos de tales anticuerpos incluyen anticuerpo AM64 (publicación de patente no examinada japonesa (Kokai) 3-219894), del anticuerpo 4B11 y 2H4 (US

25

5571513), el anticuerpo B-S12 y el anticuerpo B-P8 (publicación de patente no examinada japonesa (Kokal) 8-291199) y similares.

Un hibridoma que produce anticuerpo monoclonal anti-gp130 puede ser básicamente creado utilizando un procedimiento conocido como se describe adelante. Así, el gp130 puede ser utilizado como un antígeno sensibilizante y es utilizado para inmunizar un método convencional de inmunización y las células inmunes así obtenidas son fusionadas con células padre conocidas en un proceso de fusión celular convencional y los hibridomas que produce el anticuerpo monoclonal son seleccionados mediante un método de selección convencional para preparar el hibridoma deseado.

Específicamente, el anticuerpo monoclonal puede ser obtenido de la siguiente manera. Por ejemplo, el gp130 utilizado como el agente de sensibilización para la generación de anticuerpos puede ser obtenido utilizando la secuencia de gen gp130/secuencia de aminoácido descrita en la solicitud de patente europea EP 411946.

Después una célula huésped adecuada es transformada la insertar la secuencia de gen gp130 en un sistema de vector de expresión conocido, la proteína gp130 de interés es purificada de la célula huésped o del supernadante de cultivo de este en un método convencional. La proteína de receptor gp130 purificada puede ser utilizada como el antígeno sensibilizante. Alternativamente, las células que expresan gp130 a una proteína de fusión, de la proteína gp130 y otra proteína, puede ser utilizada como el agente de sensibilización.

Aunque los mamíferos al ser inmunizados con el antígeno de sensibilización no están específicamente limitados, ellos son preferiblemente seleccionados en consideración de su compatibilidad de la célula padre para uso en fusión celular. Ellos generalmente incluyen roedores tales como ratones, ratas, hámsters y similares.

La inmunización de animales con un antígeno de sensibilización es llevada a cabo utilizando un método conocido. Un método general, por ejemplo, involucra la inyección intraperitoneal o subcutánea de un agente de sensibilización al mamífero. Específicamente, un antígeno de sensibilización que ha sido diluido y suspendido en una cantidad apropiada de solución salina amortiguada con fosfato (PBS) o solución salina fisiológica etc., es mezclado, según se desee, con una cantidad apropiada del adyuvante común, como por ejemplo el adyuvante completo de Freund. Después de ser emulsificada, es preferiblemente administrada a un mamífero varias veces cada 4 a 21 días. Alternativamente un portador adecuado puede ser utilizado en el momento de la inmunización del antígeno sensibilizante.

Después de la inmunización y de la confirmación del incremento en los niveles del anticuerpo deseado en el suero, las células inmunes son sacadas del mamífero y son sometidas a fusión de célula. Las células inmunes preferidas a ser sometidas a fusión de célula incluyen en particular, las células de bazo.

Las células de mieloma de mamífero, como las otras células padre que son fusionadas con las células inmunes anteriormente mencionadas, preferiblemente incluyen varias líneas de célula conocidas como P3X63Ag8.653 keamey, J. F. Et al., J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3X63Ag8U.1 (Current Topics in

Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, D.H. et al., cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270), FO (de St. Groth, S.F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 32; 1-21), S194 (Trowbridge, I.S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323), R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277; 131-133) y similares.

La fusión de células entre las células inmunes anteriores y las células del mieloma pueden esencialmente conducidas de acuerdo con un método conocido tal como se describe en Milstein et al. (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) y similares.

Más específicamente, la fusión celular anterior es llevada a cabo en un cultivo de nutrientes convencionales la presencia de, por ejemplo, un acelerador de fusión celular. Como acelerador de la fusión celular puede ser utilizado, por ejemplo, polietileno glicol (PEG), virus Sendai (HVJ) y similares, y, además, un adyuvante tal como dimetil sulfoxido etc. Puede ser agregado según desee para mejorar la deficiencia de la fusión.

La proporción preferida de las células inmunes y las células de mieloma a ser utilizadas es, por ejemplo, 1 a 10 veces mas células inmune que las células del mieloma. Ejemplos de medios de cultivo a ser utilizados para la fusión celular anterior incluyen medio RPMI1640 y medio de cultivo MEM adecuado para el crecimiento de las líneas celulares del mieloma anteriores, y el medio de cultivo convencional utilizado para este tipo de cultivo de célula, y además puede ser agregado un suplemento de suero tal como suero de ternero fetal (FCS).

En la fusión celular, las cantidades predeterminadas de las células inmunes anteriores y de las células de mieloma son mezcladas bien en el líquido de cultivo anterior, a lo cual una solución PEG previamente calentada a aproximadamente 37°C, por ejemplo una solución PEG con un peso molecular promedio de aproximadamente 1000 a 6000, se agrega a una concentración de 30 a 60% (w/v) y se mezcla para formar las células de fusión deseadas (hibridoma). Entonces al repetir la adición secuencial del líquido de cultivo adecuado y la centrifugación para remover el supernadante, los agentes de fusión celular etcétera que son indeseables para el crecimiento del hibridoma pueden ser removidos.

Dicho hibridoma puede ser seleccionado al cultivar en el medio de selección convencional, por ejemplo, el medio de cultivo HAT (un líquido de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina, y timidita). Cultivando el dicho líquido de cultivo HAT se continua generalmente durante un periodo de tiempo suficiente para efectuar la muerte de las células (células de no fusión) diferentes del hibridoma deseado, y generalmente durante varios días a varias semanas. Luego el método de dilución limitante convencional es conducido para efectuar la selección y clonación de los hibridomas que producen el anticuerpo deseado.

Además de obtener el hibridoma anterior al inmunizar un animal diferente a un humano con un antígeno, es también posible sensibilizar los linfocitos humanos in vitro con una proteína de antígeno deseada o células que expresan antígeno deseado, y los linfocitos B sensibilizados resultantes son fusionados con células de mieloma humano, por ejemplo U266, para obtener el anticuerpo humano deseado que tiene la actividad de unión al antígeno deseado o las células que expresan antígeno deseado (ver publicación de patente japonesa post-examen (Kokoku) número 1-59878). Adicionalmente, un animal transgénico que tiene un

repertorio de todos los genes de anticuerpo humano pueden ser inmunizado con el antígeno o las células que expresan antígeno para obtener el anticuerpo humano deseado en el método descrito anteriormente (ver publicación de patente internacional WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 y WO 96/33735).

El hibridoma que produce anticuerpo monoclonal así construido puede ser subcultivado en el líquido de cultivo convencional, o puede ser almacenado durante un periodo prolongado de tiempo en nitrógeno líquido.

Con el fin de obtener anticuerpos monoclonales de dicho hibridoma, puede ser utilizado un método en el cual dicho hibridoma es cultivado en el método convencional y los anticuerpos son obtenidos como el supernadante, o un método en el cual el hibridoma es administrado y crecido en un mamífero compatible con dicho hibridoma y los anticuerpos son obtenidos como ascitos. El método anterior es adecuado para obtener anticuerpos de alta pureza, mientras que el último es adecuado para producción de anticuerpos a gran escala.

Por ejemplo, un anticuerpo receptor anti-IL-6 que produce hibridoma puede ser construido utilizando el método descrito en la publicación de patente japonesa no examinada (Kokai) 3-139293. Este puede ser construido mediante un método en el cual el hibridoma que produce anticuerpo PM-1 que fue internacionalmente depositado a un bajo las previsiones del tratado de Budapest como FERM BP-2998 de julio 12, 1989 con el Patent Microorganism Depository of Nacional Institute of Industrial Science and technology, of Chuo 6, 1-1, Higashi 1-Chome, ciudad Tsukuba, Ibaraki pref., Japón es intraperitonealmente inyectado a los ratones BALB/c para obtener los ascitos de los cuales se purifica el anticuerpo

PM-1, o un método en cual dicho hibridoma es cultivado en un medio de cultivo adecuado tal como el medio RPMI1640 que contiene 10% de suero fetal de bovino y 5% de MB-condimed H1 (elaborado por Boehringer Mannheim), el medio SMF de hibridoma (elaborado por GIBCO-BRL), el medio PFHM-II (elaborado Por GIBCO-BRL) y similares y el anticuerpo PM-1 pueden ser purificados del supernadante.

Un anticuerpo recombinante que ha sido producido por tecnología de gen recombinante en el cual un gen de anticuerpo fue clonado del hibridoma e integrado en un vector adecuado que fue entonces introducido en el huésped puede ser utilizado en la presente invención como anticuerpo monoclonal (ver, por ejemplo, borrebaeck C.A.K., y Larrick J.W. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Publisher in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD. 1990).

Específicamente, el mRNA que codifica la región variable (V) del anticuerpo deseado es aislado de las células que producen anticuerpo tal como un hibridoma. El aislamiento del mRNA es conducido al preparar el ARN total que utiliza, por ejemplo un método conocido tal como el método de ultracentrifuga de guanidina (Chirgwin, J.M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299), el método AGPC (Chomczynsky, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159), y luego el mRNA es preparado del ARN total utilizando el kit de purificación de mRNA (elaborado por farmacia) y similares. Alternativamente, el mRNA puede ser directamente preparado utilizando el kit de preparación a mRNA QuickPrep (elaborado por farmacia).

El cADN de región V del anticuerpo puede ser sintetizado del mARN así obtenido utilizando una transcriptasa inversa. El cADN puede ser sintetizado utilizando el kit de síntesis de cADN de primer hebra de transcriptasa Inversa AMV y similares. Alternativamente, para la síntesis de amplificación del cADN, el kit FINDER RACE 5'Ampli (elaborado por Clontech) y el método 5'-RACE (Frohman, M.A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) que emplea la reacción de cadena de polimerasa (PCR) puede ser utilizado. El fermento de ADN es purificado del producto PCR obtenido y puede ser ligado al ADN del vector. Mas aun, un vector recombinante es construido de este y luego es introducido dentro del E. Coli etcétera; del cual son seleccionadas colonias para prepara el vector recombinante dedeado. La secuencia base del ADN deseado se puede confirmar mediante un método conocido tal como el método de dideoxi.

Una vez que el ADN que codifica la región V del anticuerpo deseado ha sido obtenido, este puede ser ligado al ADN que codifica la región constante (región C) del anticuerpo deseado, que es entonces integrada en un vector de expresión, alternativamente, el ADN que codifica la región B del anticuerpo puede ser integrado en un vector de expresión que contiene ADN que codifica la región C del anticuerpo.

Con el fin de producir el anticuerpo para uso en la presente invención, el gen de anticuerpo se integra como se describe adelante en un vector de expresión con el fin de ser expresado bajo el control de la región regulatoria de expresión, por ejemplo un mejorador y/o un promotor. Subsecuentemente, el vector de expresión se puede transformar en una célula huésped y el anticuerpo puede entonces ser expresado ahí.

De acuerdo con la presente invención, el anticuerpo recombinante artificialmente alterado tal como el anticuerpo quimérico, el anticuerpo humanizado, y el anticuerpo humano puede ser utilizado para el propósito de bajar la antigenicidad heteróloga contra humanos. Estos anticuerpos alterados pueden ser producidos utilizando métodos conocidos.

El anticuerpo quimérico puede ser obtenido al ligar el ADN así obtenido que codifica la región V del anticuerpo al ADN que codifica la región C del anticuerpo humano, que es luego integrado en un vector de expresión introducido en un huésped para producción del anticuerpo allí (ver solicitud de patente europea EP 125023, y publicación de patente internacional WO 92-19759). Utilizando este método conocido, el anticuerpo quimérico útil para la presente invención puede ser obtenido.

Por ejemplo, un plásmido que contiene ADN que codifica la región de cadena L o la región V cadena H del anticuerpo PM-1 quimérico fue designado como pPM-k3 o pPM-h1, respectivamente, y los E. coli que tienen estos plásmidos han sido internacionalmente depositados bajo las previsiones del tratado de Budapest como NCIMB 40366 y NCIMB 40362, respectivamente, en febrero 12, 1991 con the National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited.

El anticuerpo humanizado que también es llamado anticuerpo humano reconvertido a sido hecho al transplantar la región que determina la complementariedad (CDR) del anticuerpo de un mamífero diferente del humano, por ejemplo el anticuerpo del ratón, en una región determinante de complementariedad del anticuerpo humano. La tecnología de ADN recombinante general para la preparación de tales anticuerpos también es conocida (ver solicitud

de patente europea EP 125023 y publicación de patente internacional WO 92-19759).

Específicamente, la secuencia de ADN que fue designada para ligar el CDR del anticuerpo de ratón con la región de fragmento (FR) del anticuerpo humano es sintetizada de varios oligonucleótidos divididos que tienen secciones que se traslapan una con la otra en los extremos de estos mediante el método TCR. El ADN así obtenido es ligado al ADN que codifica la región C del cuerpo humano y luego se integra en un vector de expresión, que es introducido en un huésped para la producción de anticuerpo (ver solicitud de patente europea EP 239400 y publicación de patente internacional WO 92-19759).

Para el FR del anticuerpo humano ligado a través del CDR, son seleccionados aquellos en los cuales la región que determina la complementaridad que forma el sitio de unión de antígeno variable. Cuando se desea, los aminoácidos el región de estructura de la región variable del anticuerpo puede ser sustituida de tal forma que la región que determina la complementaridad del anticuerpo humano reconvertido puede formar un sitio de unión de antígeno apropiado (Sato, K. et al., cancer Res. (1993) 53, 851-856)

Por ejemplo, para el anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado, se utiliza la región C del anticuerpo humano. Como la región C del anticuerpo humano, se puede mencionar Cy, y Cy1, Cy2, Cy3, y Cy4, como ejemplos, pueden ser utilizados. La región C del anticuerpo humano puede ser modificada para mejorar la estabilidad del anticuerpo o la producción de estos.

El anticuerpo quimérico consiste de la región variable del anticuerpo derivado de un mamífero diferente de un humano y la región C derivada del anticuerpo humano, mientras que el anticuerpo humanizado consiste de la región que determina la complementariedad del anticuerpo derivada de un mamífero diferente del humano y la región de estructura y la región C derivada del anticuerpo humano. De acuerdo con esto, la antigenicidad de este en el cuerpo humano ha sido reducida de tal forma que ellas son útiles como anticuerpo para uso de en la presente invención.

Como un anticuerpo preferido del anticuerpo humanizado para uso en la presente invención, se puede mencionar el anticuerpo PM-1 humanizado (ver Publicación de Patente Internacional WO 92-19759).

Adicionalmente, como un método para obtener anticuerpo humano, una tecnología que emplea panning con librería de anticuerpo humano es conocida además de aquellas descritas anteriormente. Por ejemplo, la región variable de anticuerpo humano se expresa sobre la superficie de un fago mediante el método de despliegue de fago como un anticuerpo de cadena simple (ScFv) para seleccionar un fago que se une al antígeno. Al analizar el gen del fago seleccionado, la secuencia de ADN que codifica la región variable del anticuerpo humano que se une al antígeno puede ser determinada. Una vez que la secuencia de ADN del ScFv que se une al antígeno es clarificada, es posible construir un vector de expresión apropiado que contiene dicha secuencia y luego obtener el anticuerpo humano. Estos métodos ya son conocidos y pueden ser encontrados en la WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, y WO 95/15388.

Los genes del anticuerpo contruidos como se describió anteriormente pueden ser expresados y obtenidos en un método conocido. En el caso de las células de mamífero, la expresión puede ser lograda utilizando un vector que contiene un promotor útil comúnmente utilizado, el gen del anticuerpo a ser expresado, el ADN en el cual la señal pol A ha sido operablemente ligada a la corriente descendente 3' de este o un vector que contiene dicho ADN. Ejemplos incluyen promotor/mejorador temprano inmediato del citomegalovirus humano.

Adicionalmente, como el promotor/mejorador que puede ser utilizado para la expresión del anticuerpo para uso de la presente invención, se puede utilizar promotores/mejoradores virales tal como retrovirus, polioma virus, adenovirus, y virus de simio 40 (SV40), y promotores/mejoradores derivados de células de mamífero tal como factor de elongación humano 1 α (HEF1 α).

Por ejemplo, la expresión puede ser fácilmente lograda mediante el método de Mulligan et al. (Mulligan, R.C. et al., Nature (1979) 277, 108-114) cuando el promotor/mejorador SV40 es utilizado, mediante el método de Mizushima et al. (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) Cuando el promotor/mejorador HEF1 α se utiliza.

En el caso de E. coli, la expresión puede ser conducida al ligar operablemente un promotor útil comúnmente conocido, una secuencia de señal para secreción de anticuerpos, y el gen de anticuerpo a ser expresado, seguido por la expresión de este. Como el promotor, por ejemplo, se puede mencionar el promotor lacZ y el promotor araB. El método de Ward et al. (Ward, E.S. et al., Nature (1989) 341, 544-546; Ward, E.S. et al., FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) puede ser utilizado cuando

el promotor lacZ es utilizado, y el método de Better et al. (Better, M. et al., Science (1988) 240, 1041-1043) puede ser utilizado cuando el promotor araB se utiliza.

Como la secuencia de señal para la secreción del anticuerpo, cuando se produce en el periplasma de E. coli, la secuencia de señal pelB (Lei, S.P. et al., J. Bacterial. (1987) 169, 4379-4383) puede ser utilizada. Después de separar el anticuerpo producido en el periplasma, la estructura del anticuerpo es apropiadamente redoblada antes de uso (ver, por ejemplo, WO 96/30394).

Como el origen de la replicación, se pueden utilizar aquellos derivados del SV40, polioma virus, adenovirus, virus del papiloma bovino (BPV) y similares. Adicionalmente, para la especificación del número de copia del gen en el sistema de célula huésped, los vectores de expresión pueden incluir como marcadores seleccionables la aminoglicosido fosfotransferasa (APH), el gen de timidina quinasa (TK), el gen de xantina guanina fosforibosil transferasa de E. coli (Ecogpt), el gen de dihidrofolato reductasa (dhfr) y similares.

Para la producción del anticuerpo para uso en la presente invención, cualquier sistema de producción puede ser utilizado. El sistema de producción para la preparación de anticuerpo comprende el sistema de producción in vitro o el in vivo. Como el sistema de producción in vitro, se puede mencionar un sistema de producción que emplea células eucarióticas y el sistema de producción que emplea células procarióticas.

Cuando son utilizadas células eucarióticas, existen sistemas de producción que emplean células animales, células de plantas, o células de hongos. Las células de animal conocidas incluyen (1) células de mamífero tales como célula CHO, células

COS, células de mieloma, células de riñón de hámster bebe (BHK), células HeLa, y células Vero , (2) células de anfibio tales como oocitos *Xenopus*, o (3) células de Insecto tales como sf9, sf21, y Tn5. Las células de plantas conocidas incluyen, por ejemplo, aquellas derivadas de *Nicotiana tabacum*, que pueden ser sometidas a cultivo de callo. Las células de hongo incluyen levaduras tales como el género *Saccharomyces*, más específicamente *Saccharomyces cerevisiae*, o los hongos filamentosos tales como el género *Aspergillus*, más específicamente *Aspergillus Niger*.

Cuando son utilizadas células procarlóticas, existen sistemas de producción que emplean células bacteriales. Las células bacteriales conocidas incluyen *Escherichia coli* (E. coli), y *Bacillus subtilis*.

Mediante la introducción por vía de transformación del gen del anticuerpo deseado en estas células y cultivar las células transformadas in vitro, puede ser obtenido el anticuerpo. El cultivo es conducido en los métodos conocidos. Por ejemplo, como el líquido de cultivo, pueden ser utilizados DMEM, MEM, RPMI1640, e IMDM, y los suplementos de suero tales como el suero de becerro fetal (FCS) pueden ser utilizados en combinación. Además, los anticuerpos pueden ser producidos in vivo al implantar células en las cuales el gen del anticuerpo ha sido introducido en la cavidad abdominal de un animal y similar.

Como en sistemas de producción in vivo, pueden ser mencionados aquellos que pueden emplear animales y aquellos que emplean plantas. Cuando son utilizados animales, existen sistemas de producción que emplean mamíferos e insectos.

Como mamíferos, cabras, cerdos, ovejas, ratones, y ganado puede ser utilizado (Vicki Glaser, *SPECTRUM Biotechnology Applications*, 1993). También como insectos, pueden ser utilizados gusanos de seda. Cuando las plantas son utilizadas, puede ser utilizado, por ejemplo tabaco.

Los genes del anticuerpo son introducidos en estos animales o plantas, y son producidos anticuerpos en tales animales o plantas, y recuperados. Por ejemplo, un gen de anticuerpo es insertado en el medio del gen que codifica la proteína que es inherentemente producida en la leche tal como la caseína β de cabra para preparar genes de fusión. Los fragmentos de ADN que contienen el gen de fusión en el cual el gen del anticuerpo ha sido insertado son inyectados en el embrión de cabra, y el embrión es introducido en la cabra hembra. El anticuerpo deseado es obtenido de la leche producida por la cabra transgénica nacida de la cabra que recibió el embrión o la progenie de éste. Con el fin de incrementar la cantidad de leche que contiene el anticuerpo deseado producido por la cabra transgénica, las hormonas pueden ser dadas a la cabra transgénica según sea apropiado. (Ebert, K.M. et al., *Bio/Technology* (1994) 12, 699-702).

Cuando son utilizados gusanos de seda, un baculovirus en el cual el gen del anticuerpo deseado ha sido insertado es infectado al gusano de seda, y el anticuerpo deseado puede ser obtenido del fluido del cuerpo del gusano de seda. Maeda, S. et al., *Nature* (1985) 315, 592-594). Más aún, cuando el tabaco es utilizado, el gen del anticuerpo deseado es insertado en un vector de expresión para plantas, por ejemplo pMON 530, y entonces el vector es introducido en una bacteria tal como *Agrobacterium tumefaciens*. La bacteria es entonces infectada al tabaco tal como *Nicotiana tabacum* para obtener el anticuerpo deseado de las hojas del tabaco (Julian, K.-C. Ma et al., *Eur. J. Immunol.* (1994) 24, 131-138).

Cuando el anticuerpo es producido el sistema de producción in vitro o in vivo, como se describió anteriormente, el ADN que codifica la cadena pesada (cadena H) o cadena ligera (cadena L) del anticuerpo puede ser separadamente integrada en un vector de expresión y los huéspedes son transformados simultáneamente, o un ADN que codifica la cadena H y la cadena L puede ser integrada en un vector de expresión simple, y el huésped es transformado con éste (ver Publicación de Patente Internacional WO 94-11523).

Los anticuerpos para uso en la presente invención pueden ser fragmentos de anticuerpo o versiones modificadas de este en tanto que ellas son preferiblemente utilizadas. Por ejemplo, como fragmentos de anticuerpo, se pueden mencionar el Fab, F(ab')₂, Fv o Fv de cadena simple (scFv) en el cual los Fv's de la cadena H y de la cadena L fueron ligados por vía de un ligador adecuado.

Específicamente, los anticuerpos son tratados con una enzima, por ejemplo, papaína o pepsina, para producir los fragmentos de anticuerpo, o los genes que codifican estos fragmentos de anticuerpo son construidos, y luego introducidos en un vector de expresión que es expresado en una célula huésped adecuada (ver, por ejemplo, Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. y Horwitz, A.H., Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496; Plueckthun, A. y Skerra, A., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-66; Bird, R.E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137).

El scFv puede ser obtenido al ligar la región V de la cadena H y la región V de la cadena L del anticuerpo. En el scFv, la región V de la cadena H y la región V de la

cadena L están preferiblemente ligadas por vía de un ligador, preferiblemente un ligador de péptido (Huston, J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 5879-5883). La región V de la cadena H y la región V de la cadena L en el scFv pueden ser derivadas de cualquiera de los anticuerpos anteriormente mencionados. Como el ligador de péptido para ligar las regiones V, puede ser utilizado cualquier péptido de cadena simple que comprende, por ejemplo, 12-19 residuos de aminoácido.

El ADN que codifica el scFv puede ser obtenido utilizando ADN que codifica la cadena H o la región V de la cadena H del anticuerpo anterior y el ADN que codifica la cadena L o la región V de la cadena L del anticuerpo anterior como el molde al amplificar la porción del ADN que codifica la secuencia de aminoácido deseada entre las secuencias anteriores mediante técnicas PCR con el par iniciador que especifica los ambos extremos de éste, y al amplificar adicionalmente la combinación de ADN que codifica la porción ligadora del péptido y el par iniciador que define que ambos extremos de dicho ADN sean ligados a la cadena H y la cadena L, respectivamente.

Una vez que los ADN que codifican el scFv han sido contruidos, un vector de expresión que los contiene y un huésped transformado con dicho vector de expresión puede ser obtenido mediante los métodos convencionales, y el scFv puede ser obtenido utilizando el huésped resultante mediante los métodos convencionales.

Estos fragmentos de anticuerpo pueden ser producidos al obtener el gen de este de manera similar a aquel mencionado anteriormente y al permitirle ser expresado

en un huésped. "Anticuerpo" como el utilizado aquí también comprende estos fragmentos de anticuerpo.

Como anticuerpos modificados, los anticuerpos asociados con varias moléculas tales como polietilen glicol (PEG) pueden ser utilizados. "Anticuerpo" como se utiliza aquí también comprende estos anticuerpos modificados. Estos anticuerpos modificados pueden ser obtenidos al modificar químicamente los anticuerpos así obtenidos. Estos métodos ya han sido establecidos en la técnica.

Los anticuerpos producidos y expresados como se describieron anteriormente pueden ser separados del interior o exterior de la célula huésped y luego pueden ser purificados hasta homogeneidad. La separación y purificación del anticuerpo para uso en la presente invención puede ser lograda mediante cromatografía de afinidad. Como la espina dorsal utilizada para tal cromatografía de afinidad, se puede mencionar la espina dorsal de proteína A y la espina dorsal de proteína G. Ejemplos de los portadores utilizados en la espina dorsal de proteína A son Hiper D, POROS, Sefarosa F.F. y similares. Alternativamente, los métodos para la separación y purificación convencionalmente utilizados para proteínas pueden ser utilizados sin ninguna limitación.

La separación y purificación del anticuerpo para uso en la presente invención puede ser lograda al combinar, según sea apropiado, cromatografía diferente de la cromatografía de afinidad anteriormente mencionada, filtración, ultra filtración, salteado, diálisis y similares. La cromatografía incluye, por ejemplo, cromatografía de intercambio de ión, cromatografía hidrófoba, filtración de gel y similares. Estas cromatografías pueden ser aplicadas en cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC). Alternativamente, puede ser utilizado HPLC de fase inversa.

La concentración de anticuerpo obtenida en lo anterior se puede determinar mediante la medición de absorbancia o mediante ELISA y similares. Así, cuando se emplea medición de absorbancia, una muestra es apropiadamente diluida con PBS(-) y luego la absorbancia es medida a 280 nm, seguida mediante cálculo utilizando el coeficiente de absorción de 1,35 OD a 1 mg/ml. Cuando se utiliza el método ELISA, la medición es conducida como sigue. Así, 100 μ l de IgG anti-humano de cabra (elaborado por TAG) diluido a 1 μ g/ml en un amortiguador de bicarbonato 0,1 M, pH 9,6, se agrega a un plato de 96 pozos (elaborado por Nunc), y es incubado durante toda la noche a 4° C para inmovilizar el anticuerpo. Después del bloqueo, 100 μ l cada uno del anticuerpo apropiadamente diluido de la presente invención o la muestra que contiene el anticuerpo, o 100 μ l de IgG humano (elaborado por CAPPEL), como el estándar, se agregan e incuban a temperatura ambiente durante 1 hora.

Después de lavar, 100 μ l de IgG anti-humano marcado con fosfatasa alcalina diluida 5000 veces (elaborado por BIO SOURCE) se agregan, e incubado a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de lavado, la solución de sustrato se agrega y se incuba, seguida por la medición de absorbancia a 405 nm utilizando el MICROPLATE READER Modelo 3550 (elaborado por Bio-Rad) para calcular la concentración del anticuerpo deseada.

El IL-6 alterado para uso en la presente invención tiene una actividad de unión al receptor IL-6 y no transmite la actividad biológica del IL-6. Así, el IL-6 alterado, aunque compite con el IL-6 para unirse al receptor IL-6, no transmite la actividad biológica del IL-6, y de esta manera este bloquea la transducción de señal por el IL-6.

El IL-6 alterado puede ser construido a través de la introducción de mutación al reemplazar residuos de aminoácido de la secuencia de aminoácido de IL-6. El IL-6, la fuente del IL-6 alterada, puede ser de cualquier origen, pero cuando la antigenicidad va a ser considerada, es preferiblemente IL-6 humano.

Específicamente, la estructura secundaria del IL-6 es predicha utilizando programa de modelación molecular conocido de la secuencia de aminoácido, por ejemplo el WHATIF (Vriend et al., J. Mol. Graphics (1990), 8, 52-56), y los efectos totales del residuo de aminoácido a ser reemplazado es evaluado. Después de que ha sido determinado un residuo de aminoácido apropiado, la mutación es introducida para efectuar la sustitución de aminoácido mediante el método de reacción de cadena de polimerasa comúnmente utilizado (PCR) utilizando un vector que contiene la secuencia base que codifica el gen IL-6 humano como un molde para obtener de esta manera un gen que codifica un IL-6 alterado. Este es entonces integrado, según se desee, en un vector de expresión apropiado, del cual puede ser obtenido el IL-6 alterado de acuerdo a la expresión, producción y métodos de purificación de dicho anticuerpo recombinante.

Ejemplos específicos de IL-6 alterado son descritos en Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93, y Savino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367, WO 96-18648, y WO 96-17869.

El péptido parcial IL-6 o el péptido parcial del receptor IL-6 para uso en la presente invención tiene una actividad de unión al receptor IL-6 o al IL-6, respectivamente, y no transmiten la actividad biológica del IL-6. Así, el péptido parcial IL-6 o el péptido parcial del receptor del IL-6 inhiben específicamente la unión del IL-6 al receptor

IL-6 al unirse al receptor IL-6 o al IL-6, respectivamente, y capturarlo de esta manera. Como resultado, ellos no transmiten la actividad biológica del IL-6, y así bloquea la transducción de señal del IL-6.

El péptido parcial IL-6 o el péptido parcial del receptor IL-6 es un péptido que comprende algunas o todas las secuencias de aminoácido de la región involucrada en la unión al IL-6 y al receptor IL-6 en la secuencia de aminoácido del IL-6 o el receptor IL-6. Tal péptido generalmente comprende 10-80, preferiblemente 20-50, más preferiblemente 20-40 residuos de aminoácido.

El péptido parcial IL-6 o el péptido parcial de receptor IL-6 pueden ser contruidos al especificar la región involucrada en la unión del IL-6 y el receptor IL-6 en una secuencia de aminoácido del IL-6 o el receptor IL-6, y al producir algunas o todas las secuencias de aminoácido mediante un método convencional tal como tecnología de ingeniería genética o un método de síntesis de péptido.

Con el fin de preparar el péptido parcial IL-6 o el péptido parcial de receptor IL-6 mediante una tecnología de ingeniería genética, la secuencia de ADN que codifica el péptido deseado es integrada en un vector de expresión, del cual puede ser obtenido el péptido mediante métodos de expresión, producción, y purificación de dicho anticuerpo recombinante.

La preparación del péptido parcial IL-6 o el péptido parcial de receptor IL-6 por el método de síntesis de péptido puede ser efectuada utilizando un método comúnmente utilizado en la síntesis de péptido tal como la síntesis de fase sólida o la síntesis de fase líquida.

Específicamente, el método descrito en *Zoku-Iyakuhin no Kaihatsu (Sequel to Development of Pharmaceuticals)*, Vol. 14, *Peputido Gousei (Peptide Sintesis)*, editado por Haruaki Yajima, Hirokawa Shoten, 1991, puede ser utilizado. El método de síntesis de fase sólida utilizado incluye, por ejemplo, una reacción en la cual un aminoácido que corresponde al terminal C del péptido a ser sintetizado es acoplada a un soporte que es insoluble en solventes orgánicos, y entonces un aminoácido en el cual el grupo α -amino o el grupo funcional de cadena lateral ha sido protegido con un grupo protector apropiado es condensada, un aminoácido a la vez, con dirección desde el terminal C al terminal N, y una reacción en la cual dicho grupo protector del grupo α -amino del aminoácido o el péptido acoplado a la resina es eliminada son alternativamente repetidos para alongar la cadena de péptido. Los métodos de síntesis de péptido de fase sólida son divididos en el método Boc y el método Fmoc dependiendo del tipo de grupo protector a ser utilizado.

Después que la síntesis de péptido deseada es completada, son llevadas a cabo una reacción de desprotección y una reacción para clivar la cadena de péptido desde el soporte. Para clivado desde la cadena de péptido, son generalmente utilizados fluoruro de hidrógeno o ácido trifluorometanosulfónico en el método Boc, y TFA en el método Fmoc. En el método Boc, por ejemplo, la resina de péptido protegida anterior es tratada en fluoruro de hidrógeno en la presencia de anisol. Subsecuentemente, el grupo protector es eliminado y el péptido recuperado mediante clivage desde el soporte. Al liofilizar, se puede obtener un péptido crudo. De otra parte, en el método Fmoc, la reacción de desprotección y la reacción de clivage del péptido desde el soporte pueden ser desarrolladas en TFA por ejemplo, en un procedimiento similar al anterior.

El péptido crudo así obtenido puede ser aplicado al HPLC para su separación y purificación. Su elusión puede ser llevada a cabo en un sistema solvente de agua-acetonitrilo que es comúnmente utilizada para purificación de proteína bajo una condición óptima. La fracción que corresponde al pico del perfil de la cromatografía obtenida es recolectada y liofilizada. La fracción de péptido así purificada es identificada al someterla al análisis del peso molecular mediante análisis de espectroscopia de masa, el análisis de la composición de aminoácido, o el análisis de la secuencia de aminoácido, y similares.

Los ejemplos específicos del péptido parcial IL-6 o el péptido parcial de receptor IL-6 son descritos en la Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) 2-188600, Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) 7-324097, Publicación de Patente Japonesa No Examinada (Kokai) 8-311098, y la Publicación de Patente de Estados Unidos US 5210075.

La actividad del antagonista de IL-6 para uso en la presente invención para bloquear la transducción de señal del IL-6 puede ser evaluada utilizando un método conocido convencionalmente. Específicamente, la línea celular de mieloma humano dependiente de IL-6 (S6B45, KPMM2), la línea de célula de linfoma-T de Lennert humano KT3, o la célula dependiente de IL-6 MH60.BSF2 es cultivada, a la cual se agrega el IL-6, y la actividad puede ser evaluada utilizando la incorporación del ^3H -timidina en la célula dependiente de IL-6 con la coexistencia del antagonista del IL-6.

Alternativamente, puede ser cultivado U266, una célula que expresa el receptor IL-6, al cual se agrega IL-6 marcado con ^{125}I y se agrega un antagonista de IL-6 al mismo tiempo, y se determina entonces el IL-6 marcado con ^{125}I unido a la célula

que expresa el receptor de IL-6. En el sistema de ensayo anterior, un grupo de control negativo que no contiene antagonistas de IL-6, además del grupo en el cual está presente el antagonista del receptor IL-6, es configurado, y el resultado obtenido de ellos es comparado para evaluar la actividad que inhibe el IL-6 del antagonista IL-6.

Como se describe en el ejemplo que sigue, el anticuerpo del receptor anti-IL-6 exhibe un efecto terapéutico en los pacientes con daño de espina dorsal. El sujeto a ser tratado en la presente invención es un mamífero. El mamífero sujeto a ser tratado es preferiblemente un humano.

Los agentes terapéuticos para daño de espina dorsal de la presente invención pueden ser administrados, bien sea oralmente o parenteralmente, sistémicamente o localmente. Por ejemplo, la inyección intravenosa tal como infusión por goteo, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, supositorios, lavado intestinal, tabletas recubiertas entéricas orales, y similares pueden ser seleccionadas, y el método de administración puede ser escogido, según sea apropiado, dependiendo de la edad y las condiciones del paciente.

La dosis efectiva es escogida del rango de 0,01 g a 100 mg por kg de peso de cuerpo por administración. Alternativamente, la dosis en el rango de 1 a 1000 mg, preferiblemente 5 a 50 mg por paciente puede ser escogida. Las dosis preferidas y los métodos preferidos de administración son tales que, en el caso del anticuerpo receptor anti-IL-6, las cantidades en donde el anticuerpo libre está presente en la sangre son dosis efectivas. En los ejemplos específicos, 0,5 mg a 40 mg por kg de peso de cuerpo, preferiblemente 1 mg a 20 mg, por mes (4 semanas) son administradas en una o varias dosis, por ejemplo en la programación de

administración de dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada cuatro semanas y similares mediante inyección intravenosa tal como infusión por goteo e inyección subcutánea. La programación de administración puede ser ajustada al observar las condiciones de la enfermedad y los niveles de sangre de los ensayos de laboratorio mediante, por ejemplo, extensión del intervalo de administración desde dos veces por semana o una vez por semana a una vez por dos semanas, una vez por tres semanas, una vez por cuatro semanas, y similares.

Los agentes terapéuticos para daño de espina dorsal de la presente invención pueden contener portadores o aditivos farmacéuticamente aceptables que dependen de la ruta de administración. Ejemplos de tales transportadores o aditivos incluyen agua, un solvente orgánico farmacéuticamente aceptable, colágeno, alcohol polivinilo, polivinilpirrolidona, un polímero carboxivinilo, carboximetilcelulosa de sodio, sodio poliacrílico, alginato de sodio, dextran soluble en agua, almidón de carboximetilo de sodio, pectina, metil celulosa, etil celulosa, goma xantano, goma Arábiga, caseína, gelatina, agar, diglicerina, propilen glicol, polietilen glicol, vaselina, parafina, alcohol estearilo, ácido esteárico, albúmina de suero humano (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, y un tensoactivo farmacéuticamente aceptable y similares.

Aditivos utilizados se escogen a partir, pero no limitados a, las anteriores o combinaciones de estos dependiendo de la forma de dosis.

Ejemplos

La presente invención se explicará ahora en mas detalle con referencia a los ejemplos y ejemplos de referencia. Esto debe ser notado, sin embargo, que la presente invención no se limita a ellos en ninguna forma.

Ejemplo 1

Materiales y Métodos

Animales:

Ratones adultos (18-22 g) hembras c57BL/6J fueron utilizados en todos los grupos de experimentos.

Daños de la médula espinal

Ratones hembras fueron anestesiadas mediante la inyección intraperitoneal de Cetamina (100 mg/kg) y xilazina (10 mg/kg). La espalda fue afeitada, se hizo una incisión en la piel de 20 mm y luego se expuso la espina. Después la región torácica de la espina se expuso mediante separación de los lados del músculo de la espalda. El proceso de la espina de la vértebra T7-T13 fue expuesta. Se hizo laminectomía al nivel de la novena vértebra torácico para exponer la espina dorsal teniendo cuidado en no herir la duramadre. La espina dorsal se estabilizó con forceps y ganchos en los procesos de espina T7 y T11 y el ligamento. Después el cuerpo del animal fue flotado al reducirse la etapa, se hizo daño en la médula espinal (SCI) mediante el impactor NYU. Un peso de 3g (el ápice con un diámetro de 1,2 mm) fue agregado gota a gota a partir de un peso de 25 mm a nivel de la vértebra T9. Los músculos y la incisión fueron cerrados en capas, y los animales fueron colocados en un lugar con la temperatura controlada hasta que el control

de temperatura se restableció. Se recolectó orina mediante expulsión manual de la vejiga dos veces por día hasta que la orina espontánea se restableció.

Protocolo y la inyección de receptor mAb (MR16-1) IL-6 anti-ratón rata

Inmediatamente después de la lesión 100 µg de MR16-1 por gramo de peso corporal de ratón se administró mediante una inyección sencilla intraperitoneal (el grupo MR16-1, n=15), y el grupo de control recibieron la misma cantidad de IgG de rata mediante inyección intraperitoneal (el grupo de control, n=15). Por análisis histológicos e inmunohistoquímico de ambos grupos la inyección intraperitoneal de BrdU (50 mg/kg peso corporal) fue desarrollada durante dos semanas a partir del día de la cirugía con el fin de marcar las células divisoras.

Evaluación de la función motora:

Utilizando tres ensayos diferentes, los presentes inventores evaluaron la recuperación de la función motora después de la lesión. La evaluación funcional se continuó hasta 6 semanas después de la lesión.

La evaluación de la función motora de los miembros inferiores: con el fin de evaluar el efecto funcional del SCI, los presentes inventores desarrollaron una evaluación de la función motora mediante la puntuación Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) que ha sido común y ampliamente utilizado. Tres diferentes probadores evaluaron animales individuales durante cuatro minutos en la forma doble ciego, y calificados (0-21) la función individual de los miembros inferiores como se definió. Todos los ensayos fueron registrados en videocintas.

SCANET: SCANET es un sistema analítico automático del movimiento animal que comprende una jaula equipada con una estructura sensora infrarroja. Este monitorea menor (M1) y mayor (M2) movimientos verticales y laterales (RG), es decir, el número de veces de levantadas, la cual cuantifica la cantidad de movimientos espontáneos realizados por el animal en un tiempo dado. En particular, se dice que hay una relación estadística positiva entre la puntuación RG y la puntuación BBB.

Cinta rodante Rotarod: El movimiento coordinado de cuatro extremidades se evaluó al colocar un ratón en un dispositivo de rodillos giratorios que comprende un rodillo plástico para forzar al ratón a caminar. El ratón fue colocado en el rodillo giratorio a velocidades de 5, 10, y 15 rpm, y el tiempo latente hasta que este se cayó fue monitoreado durante 120 segundos. La función del movimiento coordinado fue evaluada cada vez a partir del valor medio y el máximo.

Inmunohistoquímica:

Para examen histológico, los ratones fueron anestesiados mediante inhalación de dietil éter, y 4% de paraformaldehído fue perfundido transcardialmente, y los ratones fueron fijados. Se extrajo la médula espinal, y se postfijó con 4% de paraformaldehído a temperatura ambiente durante unas pocas horas.

La muestra de tejido fue inmersa en 10% de sucrosa a 4°C por 24 horas, y colocadas en 30% de sucrosa durante 48 horas antes de embeberla en el compuesto OTC. El tejido embebido fue congelado en nitrógeno líquido y almacenado a -80°C. Las crio secciones fueron hechas mediante sección sagital y

sección axial en un espesor de 20 micrómetros, y teñida con tinte HE o tinte doble Inmunofluoro.

Para el experimento de tñido doble inmunofluoro, la sección de médula espinal fue bloqueada en 0,03% de Tritón X-100 y 10% de suero de cabra normal en 0,01M PBS (pH 7,4) por 30 minutos. Como el anticuerpo primario, el anticuerpo anti-GFAP de conejo, el anticuerpo anti-Brd-U de rata y el anticuerpo anti-Hu de humano (como un marcador neuronal) fueron usados, e incubados durante la noche a 4°C. Como el anticuerpo secundario FITC- anticuerpo IgG de conejo conjugado y anticuerpo conjugado de rata-texas rojo, y tñido doble. Las rodajas fueron lavadas, fijadas, y analizadas bajo un fluoromicroscopio.

Análisis de transferencia Western

12 horas después de la creación de la daño (n=4 para cada grupo), un segmento de 8 mm de la médula espinal (del centro de la daño, 4 mm de proboscis lateral y 4 mm del caudal lateral) fueron escindida, que fue homogenizada en un amortiguador bacteriológico MAPK que contiene un inhibidor de proteasa, y sonificado seguido por centrifugación a 15.000 rpm.

La proteína fue separada del supernadante de cada muestra mediante SDS-PAGE, y transferida a una membrana de poli (difloruro) vinilideno mediante electrofóresis. Después la membrana fue bloqueada en un amortiguador en un amortiguador TBST que contiene 5% de leche descremada, 150 mM de NaCl y 0,05% de Tween 20 (pH 7,5) a temperatura ambiente durante una hora, ya sea de anticuerpo anti-stat 3 de conejo policlonal o anticuerpo stat3 anti-fosforilado de conejo o anticuerpo anti-IL-6R α de conejo fue utilizado como el anticuerpo

primario, y luego incubado junto con anticuerpo IgG anti-conejo HRP-conjugado como el anticuerpo secundario. Después de desarrollarlo en una película mediante un desarrollador automatizado, este fue cuantificado por el formador de imágenes α .

Resultado:

(1) Evaluación de la función motora de los miembros inferiores

Para 15 ratones con daños en la médula espinal que recibieron anticuerpo receptor anti-IL-6 (MR16) y 15 ratones con daño en la médula espinal (control) que no recibieron el anterior anticuerpo, los valores medios de la puntuación BBB se muestran en una gráfica en la Figura 1. Después del daño en la médula espinal, en el 7 día y después, la recuperación del movimiento fue buena en el grupo de ratones que recibieron anticuerpo MR16 y en la semana 5 y semana 6 se notó una diferencia significativa.

(2) SCANET

Para 15 ratones con daño en la médula espinal que recibieron anticuerpo receptor anti-IL-6 (MR16) y 15 ratones con daño en la médula espinal (control) que no recibieron el anterior anticuerpo, el movimiento lateral y el número de veces de levantamiento fueron comparados con un resultado que no notó diferencia significativa en el movimiento lateral, pero el movimiento de levantarse se observó en 12 de 15 ratones con daño en la espina dorsal que recibieron anticuerpo anti-IL-6 (MR16) mientras este no fue solo observado en 3 de los 15 ratones con daño en la médula espinal (control) que no recibieron

el anterior anticuerpo. Esta diferencia fue significativa por el ensayo de probabilidad exacto de Fisher con $p < 0,05$.

(3) Cinta rodante Rotarod

Para 15 ratones con daño en la médula espinal que recibieron anticuerpo anti-IL-6 receptor (MR16) y 15 ratones con daño en la médula espinal (control) que no recibieron el anterior anticuerpo el experimento anterior se desarrolló, con un resultado que no notó diferencia significativas cuando la velocidad de revolución del rodillo fue de 10 rpm (10 revoluciones por minuto) y 15 rpm, mientras en 5 rpm, como se mostró en la Figura 2, en el día 358 y después de la daño de la médula espinal, la recuperación del ratón con la daño de espina dorsal que recibió el anticuerpo anti-IL-6 (MR16) fue significativamente mayor ($p < 0.05$) mas alto que los de ratón con daño en la médula espinal (control) que no recibieron el anterior anticuerpo.

(4) Examen inmunohistoquímico

A pesar de la presencia de células madres neurales inherentes de la médula espinal del adulto, la reparación de la espina dorsal se debe a que no ocurre la diferenciación de las células. Eso se debe probablemente a que las células madres neurales inherentes se diferencian de las células precursoras glia y además dentro de los astrositos en la médula espinal daño y así no se diferencian dentro de las células neuronales. Cuando la formación de los astrositos reactivos se continuó mediante un método de inmunofluorescencia usando anticuerpo anti-GFAP y anticuerpo anti-BrDU para la médula espinal de la parte daño de 4 ratones que recibieron el anticuerpo receptor anti-IL-6

105

(MR16) y la parte daño de 4 ratones con daño de médula espinal (control) que no recibieron el anterior anticuerpo, como se mostró en la Figura 3, la administración del anterior anticuerpo reduce significativamente la formación de astrositos reactivos ($p < 0,01$).

(5) Análisis de transferencia Western

4 ratones con daño en la médula espinal y 4 ratones con daño en la médula espinal (control) la expresión del receptor IL-6 a 12 horas después de la daño de la médula espinal fue investigada mediante análisis de transferencia Western. El resultado se muestra en la Fig.4. La expresión del receptor IL-6 fue solamente observada en ratones con daño de la médula espinal. También como se muestra en la Fig. 5 la administración de MRN-16 suprimió la cantidad de STAT3 fosforilado indicando que la cantidad de MR16 administrado intraperitonealmente actuó en la médula espinal.

Lo anterior confirmó que los antagonistas IL-6 promueven la reparación de la daño de la médula espinal.

Ejemplo de referencia 1. Preparación de receptor IL-6 soluble humano

El receptor IL-6 soluble preparado mediante el método PCR utilizando un plásmido pBSF2R.236 que contiene cDNA que codifica el receptor IL-6 obtenido de acuerdo con el método Yamasaki et al. , (Yamasaki, K. et al. , Science (1988) 241, 825-828). El plásmido pBSF2R.236 fue digerido con una enzima de restricción Sph I para obtener el cDNA del receptor IL-6, que fue luego insertado dentro de mp18 (fabricado por Amersham). Utilizando un oligoiniciador sintético diseñado para

introducir un codón de parada dentro del cDNA del receptor IL-6, una mutación se introdujo dentro del cDNA del receptor IL-6 mediante el método PCR usando el sistema Mutagénesis In vitro (fabricado por Amersham). El procedimiento resultó en la introducción de un codón de parada en el aminoácido en la posición 345, y dio el cDNA que codifica el receptor IL-6 soluble.

Con el fin de expresar el cDNA del receptor IL-6 soluble en células CHO, esta se ligó a un plásmido pSV (manufacturado por farmacia) para obtener un plásmido pSVL344. El cDNA del receptor IL-6 soluble que fue clivado con Hind III-Sal I fue insertado al plásmido pECEdhfr que contiene el cDNA de dhfr para obtener un plásmido pECEdhfr344 que puede ser expresado en las células CHO.

Diez µg de plásmido pECEdhfr344 fue transferido a una línea de células dhfr-CHO DXB-11 (Urlaub G. et al. , Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) por el método de precipitación de fosfato de calcio (Chen C. et al. , Mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745-2751). Las células CHO transfectadas fueron cultivadas durante tres semanas en una selección MEN α libre de nucleósido medio que contiene un mM de glutamina, 10% de FCS dializado, 100 U/ml de penicilina, y 100 µg /ml de estreptomycin.

Las células CHO seleccionadas fueron tamizadas mediante el método de dilución de límite para obtener un clon de células CHO sencillos. El clon de células CHO fue amplificado en 20 nM – 200 nM de metotrexato (MTX) para obtener una línea de célula CHO 5E27 que produce receptor soluble IL-6 humano. La línea de células CHO 5E27 fue cultivada en un medio Dulbecco modificado Iscob (IMDM, manufacturado por Gibco) que contiene 5% de FBS. El cultivo supernadante fue recolectado y la concentración del receptor IL-6 soluble en el supernadante de

cultivo se determinó mediante ELISA. El resultado confirmó que el receptor IL-6 soluble está presente en el supernadante del cultivo.

Ejemplo de referencia 2. Preparación de anticuerpo IL-6 anti-humano

Diez µg del IL-6 recombinante (Hirano et al. , Immunol. Lett. , (1988) 17, 41) fue usado para inmunizar ratones BALB/c junto con adyuvante completo de Freund, y esto fue repetido cada semana hasta que el cuerpo anti –IL-6 pudo ser detectado en el suero. Las células inmunes fueron extraídas de los nódulos linfáticos locales y fueron luego fusionadas con líneas de célula mieloma P3U1 usando glicol polietileno 1500. Se seleccionaron hibridomas de acuerdo al método de Oi et al. (Selective Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) que emplea el medio HAT, y el hibridoma que produce el anticuerpo IL-6 humano fue estabilizado.

El hibridoma que produce el anticuerpo IL-6 anti-humano se sometió al ensayo de unión IL-6 como sigue. Así, una placa de microtítulo de 96 pozos hecha de polivinilo flexible (fabricado por Laboratorios Dynatech, Inc., Alexandria, VA) fue recubierta con 100 µl Ig anti-ratón de cabra (10 µl/ml) fabricado por Cooper Biomedical, Inc. , Malvern, PA) durante la noche a 4°C en 0.1M hidrogen-carbonato-carbonato, pH 9,6. La placa fue tratada con 100 µl de PBS que contiene 1% de albúmina de suero bovino (BSA) a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de lavarla en PBS, 100 µl del supernadante del cultivo hidridoma fue agregado a cada pozo, y luego fue incubado durante la noche a 4°C. La placa fue lavada, se agregó IL-6 recombinante etiquetado ¹²⁵ a cada pozo a una concentración de 2000 cpm/0,5 ng/pozo, y luego la radioactividad de cada pozo se determinó mediante un contador gamma (Beckman Gamma 9000, Beckman

Instruments, Fullerton, CA). De clones hibridoma 216, 32 fueron positivos en el ensayo de unión IL-6. A partir de estos clones, se obtuvo finalmente MH166.BSF2 estable. El anticuerpo anti-IL-6 MH166 producido por dicho hibridoma tiene un subtipo de IgG1 k.

Luego, el clon MH60.BSF2 hibridoma de ratón IL-6-dependiente fue utilizado para examinar una actividad neutralizante con respecto al crecimiento del hibridoma por el anticuerpo MH166. Las células MH60.BSF2 fueron dispensadas por $1 \times 10^4/200\mu\text{l}$ /pozo, y las muestras que contienen MH166 se agregaron a esta, cultivadas durante 48 horas, $0,5 \mu\text{Ci}$ /pozo de timidina ^3H (New England Nuclear, Boston, MA) se agregó y el cultivo se continuó durante 6 horas adicionales. Las células fueron colocadas sobre un papel de filtro de vidrio y luego fueron tratadas por el cosechador automático (Labo Mash Science Co. , Tokio, Japan). Para el control, se utilizó el anticuerpo IL-6.

Como un resultado, el anticuerpo MH166 inhibió, en forma dependiente de dosis, la incorporación de ^3H -timidina de MH60.BSF2 inducidas por IL-6.

Ejemplo de Referencia 3. Preparación del anticuerpo del receptor IL-6 antihumano

El anticuerpo MT18 de receptor anti-IL-6 preparado por el método de Hirata et al. (Hirata, Y. et al. J. Immunol. , (1989) 143, 2900-2906) se unió a la sefarosa 4B activada por CNBr (fabricado por Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) de acuerdo con el régimen adjunto y el receptor IL-6 (Yamasaki, K. et al. , Science (1988) 241, 825-828) fue purificado. Una línea de célula mieloma humana U266 fue solubilizada con un mM clorhidrato de fluoruro sulfonilo metano p-para-aminofenil (fabricado pro Wako chemicals) (amortiguador de digitonina) que

contiene 1% de digitonina (fabricado por Wako Chemicals), 10 nM de trietanolamina (pH 7,8) y 0,15 M NaCl, y mezclado con anticuerpo MT18 unido a glóbulos de sefarosa 4B. Entonces, los glóbulos fueron lavados seis veces con amortiguador de digitonina para preparar el receptor IL-6 purificado parcialmente para ser usado para inmunización.

Los ratones BALB/C fueron inmunizados cuatro veces cada diez días con el receptor IL-6 purificado parcialmente anterior obtenido de 3×10^9 U266 células, y luego se preparó un hibridoma preparando un método estándar. El supernadante del cultivo hibridoma del pozo de crecimiento positivo fue evaluado para su actividad de unión al receptor IL-6 de acuerdo con el método escrito adelante. 5×10^7 U266 fueron etiquetadas con ^{35}S -metionina (2,5 mCi) y fueron solubilizadas con el amortiguador de digitonina anterior. Las células U266 solubilizadas fueron mezcladas con 0,04 ml de volumen de anticuerpo MT18 unido a glóbulos 4B de sefarosa, y luego fueron lavados seis veces con amortiguador de digitonina. El receptor IL-6 etiquetado ^{35}S -metionina fue eluado con 0,25 ml de amortiguador de digitonina (pH 3,4) y fue neutralizado en 0,025 ml de 1M Tris (pH 7,4).

0,05 ml del supernadante del cultivo hibridoma fue mezclado con 0,01 de proteína G sefarosa (fabricada por Pharmacia). Después de lavar, la sefarosa fue incubada con 0,005 ml de solución IL-6 ^{35}S -etiquetada preparada como se describió anteriormente. El inmunoprecipitado fue analizado por SDS-PAGE para investigar el supernadante del cultivo hibridoma que reacciona con el receptor IL-6. Como un resultado, una reacción del clon PM-1 hibridoma positivo (FERM BP-2998) fue estabilizado. El anticuerpo producido a partir del hibridoma PM-1 tiene un subtipo de IgG1 k.

La actividad inhibitoria del anticuerpo producida por el hibridoma PM-1 en la unión del IL-6 al receptor IL-6 humano fue estudiado utilizando la línea de célula mieloma humana U266. Un IL-6 recombinante humano fue preparado a partir de E. Coli (Hirano et al. , Immunol. Lett. , (1988)17. 41-45), y fue etiquetado con ^{125} I usando el reactivo Bolton-Hunter (New England Nuclear, Boston, MA) (Taga, T. et al. , J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981).

4×10^5 U266 fueron cultivadas con el 70% (v/v) de cultivo supernadante de hibridoma PM-1 junto con 14.000 cpm etiquetado ^{125} I por una hora. Setenta μ l de la muestra fue cubierta con 300 μ l de FCS en 400 μ l de tubo de polietileno microfugo. Después de centrifugación la radioactividad de la célula fue determinada.

El resultado reveló que el anticuerpo producido por el hibridoma PM-1 inhibe la unión del IL-6 al receptor IL-6.

Ejemplo de referencia 4. Preparación del anticuerpo receptor IL-6 de ratón

Un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor IL-6 de ratón fue preparado de acuerdo al método descrito en Saito, et al. , J. Immunol. (1991) 147, 168-173. Las células CHO que produce el receptor IL-6 soluble de ratón fueron cultivadas en cultivo IMDM líquido que contiene 10% de FCS. A partir del supernadante de cultivo el receptor IL-6 soluble de ratón fue purificado utilizando una espina dorsal de afinidad en la que el anticuerpo de RS12 receptor IL-6 anti-ratón (ver Saito, et al. , supra) ha sido fijado al gel Affigel 10 fabricado por Biorad)

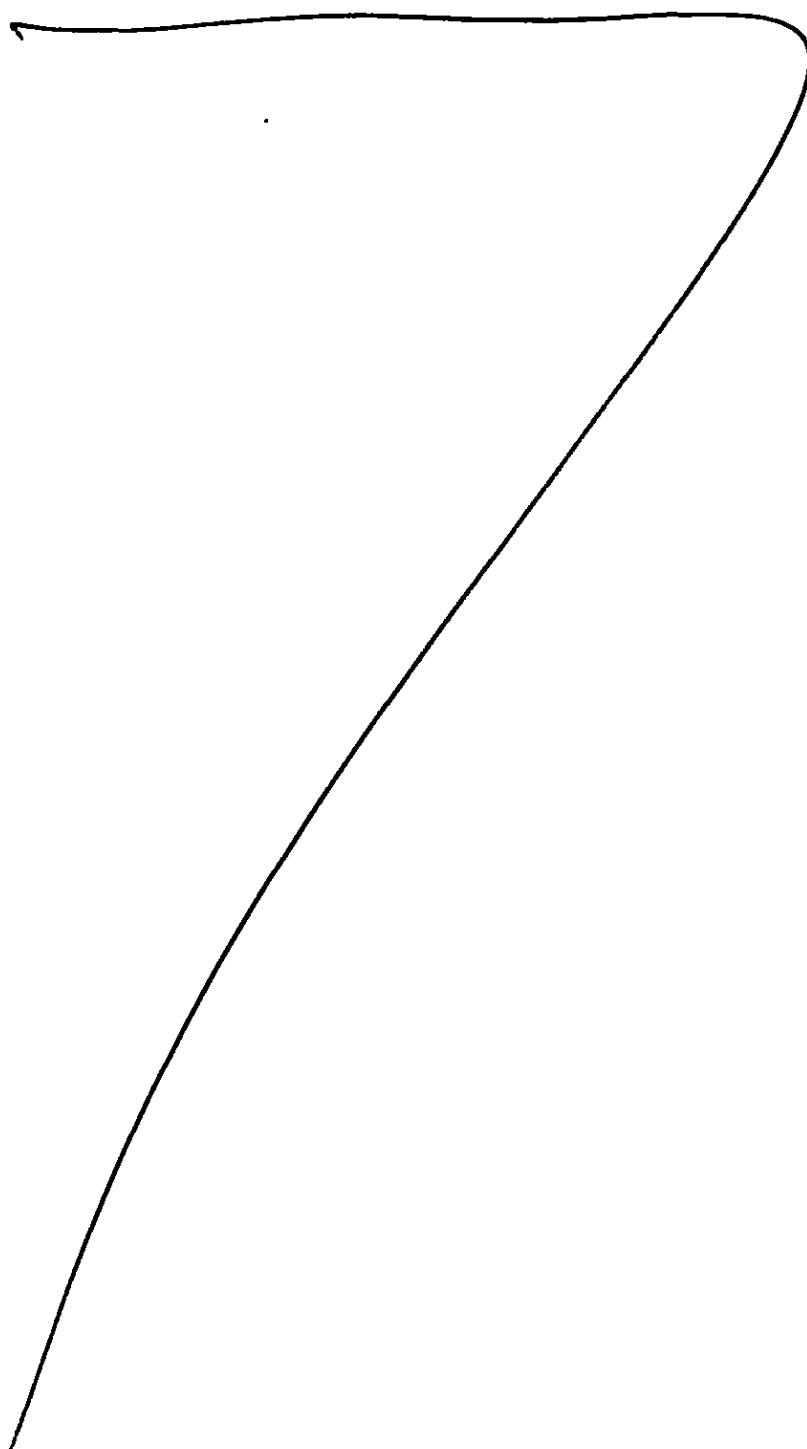
El receptor soluble IL-6 de ratón (50 μ g) así obtenido fue mezclado con adyuvante completo de Freund, el cual fue luego inyectado al abdomen de ratas Wistar. A

partir de dos semanas después de la administración, los animales fueron alzados con el adyuvante incompleto Freund. En el día 45, se cultivaron células de Bazo de rata, y cerca de 2×10^8 células de esta fueron fusionadas con 1×10^7 células de mieloma de ratón P3U1 usando un 50% de PEG1500 (fabricado por Boehringer Mannheim) de acuerdo con el método convencional, y luego fueron tamizadas por un medio de cultivo HAT.

Después el supernadante del cultivo híbridoma fue agregado al plato cubierto con anticuerpo IgG anti-rata de conejo (fabricado por Cappel), haciendo reaccionar el receptor IL-6 soluble de ratón. Posteriormente utilizando anticuerpo de receptor IL-6 anti-ratón de conejo y IgG anti-conejo de oveja etiquetado fosfatasa, híbridomas que producen anticuerpos dirigido contra el receptor IL-6 soluble de ratón fueron seleccionados por ELISA. Los clones híbridoma para los cuales la producción de anticuerpos fue confirmada fueron subseleccionadas dos veces para obtener un clon híbridoma sencillo. El clon fue designado como MR16-1.

La actividad neutralizante del anticuerpo producido por el híbridoma sobre la transducción de la señal de ratón IL-6 fue examinada por la incorporación de timidina ^3H utilizando células MH 60. BSF2 (Matsuda, T. et al. , J. Immunol. (1988) 18, 951-956). A una placa de 96 pozos, células MH60.BSF2 fueron preparadas en 1×10^4 células /200 μl /pozo. A la placa fueron agregados 10 pg/ml de anticuerpo MR16-1 y anticuerpo IL-6 de ratón o anticuerpo RS12 a 12,3- 1000 ng/ml, luego ellos fueron cultivados a 37°C y 5% de CO_2 durante 44 horas, y luego 1 μl / pozo de ^3H -timidina fueron agregados. Después de 4 horas, la incorporación de timidina ^3H fue medida. Como un resultado, no se encontró que el anticuerpo MR16-1 suprimió la incorporación de la timidina ^3H por las células MH60.BFS2.

Así, se demostró que el anticuerpo producido por el hibridoma MR16-1 (FERM BP-5875) inhibe la unión del receptor IL-6 al IL-6.



REIVINDICACIONES

1. Un agente terapéutico para daño de la médula espinal que comprende un antagonista interleukin-6 (IL-6) como un ingrediente activo,
2. El agente terapéutico para daño de la médula espinal de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dicho antagonista IL-6 es un anticuerpo receptor IL-6 antagonista.
3. El agente terapéutico para daño de la médula espinal de acuerdo con la reivindicación 2 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
4. El agente terapéutico para daño de la médula espinal de acuerdo con la reivindicación 2 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal contra el receptor IL-6 humano.
5. El agente terapéutico para daño de la médula espinal de acuerdo con la reivindicación 2 o 3 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal contra el receptor IL-6 de ratón
6. El agente terapéutico para daño de la médula espinal de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 4 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo recombinante.
7. El agente terapéutico para daño de la médula espinal de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6 en donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor IL-6 humano es anticuerpo PM-1.

8. El agente terapéutico para daño de la médula espinal de acuerdo con la reivindicación 5 en donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor IL-6 de ratón es anticuerpo MR16-1.
9. El agente terapéutico para daño de la médula espinal de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano contra el receptor IL-6
10. El agente terapéutico para daño de la médula espinal de acuerdo con la reivindicación 9 en donde dicho anticuerpo humanizado es un anticuerpo PM-1 humanizado.
11. Un modulador de diferenciación de células madres neurales que comprenden un antagonista interleucina-6 (IL-6) como un ingrediente activo
12. Un inhibidor de diferenciación en células glia que comprende un antagonista interleucina -6 (IL-6) como un ingrediente activo
13. El uso de un antagonista interleucina-6 (IL-6) para la fabricación de un agente terapéutico para daño de la espina dorsal.
14. El uso de acuerdo a la reivindicación 13 en donde dicho antagonista IL-6 es un anticuerpo contra el receptor IL-6.

113

15. El uso de acuerdo a la reivindicación 13 en donde dicho antagonista IL-6 es un anticuerpo monoclonal
16. El uso de acuerdo a la reivindicación 13 o 14 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal contra el receptor IL-6 humano.
17. El uso de acuerdo a la reivindicación 14 o 15 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal contra el receptor IL-6 de ratón.
18. El uso de acuerdo a algunas de las reivindicaciones 13 o 16 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo recombinante.
19. El uso de acuerdo a algunas de las reivindicaciones 13 a 18 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal contra el receptor IL-6 humano es anticuerpo PM-1.
20. El uso de acuerdo a la reivindicación 17 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal contra el receptor IL-6 de ratón es anticuerpo MR16-1.
21. El uso de acuerdo a alguna de las reivindicaciones 13 a 20 en donde dicho anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano contra el receptor IL-6.
22. El uso de acuerdo a la reivindicación 21 en donde dicho anticuerpo humanizado es un anticuerpo humanizado PM-1.

23. El uso de un antagonista interleucina-6 (IL-6) para la fabricación de un modulador de diferenciación de células madres neurales.
24. El uso de un antagonista interleucina-6 (IL-6) para la fabricación de un inhibidor de diferenciación de células glia.
25. Un método terapéutico para daño de espina dorsal de un sujeto que comprende administrar un antagonista Interleucina-6 (IL-6) al sujeto.
26. El método de acuerdo con la reivindicación 25 en donde dicho antagonista IL-6 es un anticuerpo antagonista del receptor IL-6.
27. El método de acuerdo con la reivindicación 26 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal
28. El método de acuerdo con la reivindicación 26 o 27 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal contra el receptor IL-6 humano.
29. El método de acuerdo con la reivindicación 26 o 27 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo monoclonal contra receptor IL-6 de ratón.
30. El método de acuerdo a alguna de las reivindicaciones 25 o 28 en donde dicho anticuerpo es un anticuerpo recombinante.
31. El método de acuerdo a alguna de las reivindicaciones 25 a 30 en donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor IL-6 es anticuerpo PM-1.

32. El método de acuerdo con la reivindicación 29 en donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor IL-6 de ratón es anticuerpo MR16- 1.
33. El método de acuerdo a alguna de las reivindicaciones 25 a 32 en donde dicho anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano contra el receptor IL-6.
34. El método de acuerdo con la reivindicación 33 en donde dicho anticuerpo humanizado es anticuerpo PM-1 humanizado.
35. Un método de modular la diferenciación de las células madres neurales de un sujeto que comprende administrar un antagonista (IL-6) interleucina-6 al sujeto.
36. Un método de inhibir la diferenciación dentro de las células glia, en un sujeto que comprende administrar un antagonista (IL-6) interleucina-6 al sujeto

RESUMEN

Un agente terapéutico para daño de médula espinal, un modulador o diferenciación de células madres neurales y un inhibidor de diferenciación dentro de células glia que comprende un antagonista interleucina-6 como un ingrediente activo.

M979-PCT

1/5

特許協力条約に基づく国際出願願

原本(出願用)

0	受理官庁記入欄	
0-1	国際出願番号	
0-2	国際出願日	
0-3	(受付印)	



0-4	様式-PCT/RO/101 この特許協力条約に基づく国際出願願書は、	
0-4-1	右記によって作成された。	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.50 (Build 0002.158)
0-5	申立て 出願人は、この国際出願が特許協力条約に従って処理されることを請求する。	
0-6	出願人によって指定された受理官庁	日本国特許庁 (RO/JP)
0-7	出願人又は代理人の登録番号	M979-PCT
I	発明の名称	インターロイキン-6アンタゴニストを含有する脊髄損傷治療剤
II	出願人	
II-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
II-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除く全ての指定国 (all designated States except US)
II-4ja	名称	中外製薬株式会社
II-4en	Name:	CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
II-5ja	あて名	1158543 日本国
II-5en	Address:	東京都北区浮間5丁目5番1号 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 1158543 Japan
II-6	国籍(国名)	日本国 JP
II-7	住所(国名)	日本国 JP

III-1	その他の出願人又は発明者	
III-1-1	この欄に記載した者は	出願人である (applicant only)
III-1-2	右の指定国についての出願人である。	米国を除く全ての指定国 (all designated States except US)
III-1-4a	名称	学校法人慶應義塾
III-1-4en	Name:	KEIO UNIVERSITY
III-1-5a	あて名	1088345 ,
		日本国
III-1-5en	Address:	東京都港区三田2丁目15番45号
		15-45, Mita 2-chome, Minato-ku, Tokyo
		1088345
		Japan
III-1-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-1-7	住所(国名)	日本国 JP
III-2	その他の出願人又は発明者	
III-2-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-2-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-2-4a	氏名(姓名)	岡野 栄之
III-2-4en	Name (LAST, First):	OKANO, Hideyuki
III-2-5a	あて名	1608582
		日本国
		東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学 医学部内
III-2-5en	Address:	c/o Keio University School of Medicine, 35, Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo
		1608582
		Japan
III-2-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-2-7	住所(国名)	日本国 JP
III-3	その他の出願人又は発明者	
III-3-1	この欄に記載した者は	出願人及び発明者である (applicant and inventor)
III-3-2	右の指定国についての出願人である。	米国のみ (US only)
III-3-4a	氏名(姓名)	岡田 誠司
III-3-4en	Name (LAST, First):	OKADA, Seiji
III-3-5a	あて名	1608582
		日本国
		東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学 医学部内
III-3-5en	Address:	c/o Keio University School of Medicine, 35, Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo
		1608582
		Japan
III-3-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-3-7	住所(国名)	日本国 JP

M979-PCT

3/5

特許協力条約に基づく国際出願願

原本(出願用)

III-4	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) 中村 雅也 NAKAMURA, Masaya 1608582 日本国 東京都新宿区信濃町35番地 慶應義塾大学 医学部内 c/o Keio University School of Medicine, 35, Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 1608582 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-4-1	この欄に記載した者は	
III-4-2	右の指定国についての出願人である。	
III-4-4a	氏名(姓名)	
III-4-4en	Name (LAST, First):	
III-4-5a	あて名	
III-4-5en	Address:	
III-4-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-4-7	住所(国名)	日本国 JP
III-5	その他の出願人又は発明者	出願人及び発明者である (applicant and inventor) 米国のみ (US only) 吉崎 和幸 YOSHIZAKI, Kazuyuki 6580016 日本国 兵庫県神戸市東灘区本山中町2丁目8番22号 8-22, Motoyamanakamachi 2-chome, Higashinada-ku, Kobe-shi, Hyogo 6580016 Japan 日本国 JP 日本国 JP
III-5-1	この欄に記載した者は	
III-5-2	右の指定国についての出願人である。	
III-5-4a	氏名(姓名)	
III-5-4en	Name (LAST, First):	
III-5-5a	あて名	
III-5-5en	Address:	
III-5-6	国籍(国名)	日本国 JP
III-5-7	住所(国名)	日本国 JP
IV-1	代理人又は共通の代表者、通知のあて名 下記の者は国際機関において右記のごとく 出願人のために行動する。	代理人 (agent)
IV-1-1a	氏名(姓名)	青木 篤
IV-1-1en	Name (LAST, First):	AOKI, Atsushi
IV-1-2a	あて名	1058423 日本国 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 A. AOKI, ISHIDA & ASSOCIATES Toranomon 37 Mori Bldg., 5-1, Toranomon 3-chome, Minato-ku, Tokyo 1058423 Japan
IV-1-2en	Address:	
IV-1-3	電話番号	03-5470-1900
IV-1-4	ファクシミリ番号	03-5470-1911
IV-1-6	代理人登録番号	100099759

M979-PCT

4/5

特許協力条約に基づく国際出願

原本(出願用)

IV-2	その他の代理人	筆頭代理人と同じあて名を有する代理人 (additional agent(s) with the same address as first named agent)	
IV-2-1a	氏名	石田 敬; 福本 積; 古賀 哲次; 西山 雅也	
IV-2-1en	Name(s)	ISHIDA, Takashi; FUKUMOTO, Tsumoru; KOGA, Tetsuji; NISHIYAMA, Masaya	
V	国の指定		
V-1	この願書を用いてされた国際出願は、規則4.9(a)に基づき、国際出願の時点で拘束される全てのPCT締約国を指定し、取得しうるあらゆる種類の保護を求め、及び該当する場合には広域と国内特許の両方を求める国際出願となる。		
VI-1	先の国内出願に基づく優先権主張		
VI-1-1	出願日	2003年 02月 24日 (24. 02. 2003)	
VI-1-2	出願番号	2003-046214	
VI-1-3	国名	日本国 JP	
VII-1	特定された国際調査機関(ISA)	日本国特許庁 (ISA/JP)	
VIII	申立て	申立て数	
VIII-1	発明者の特定に関する申立て	-	
VIII-2	出願し及び特許を与えられる国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-3	先の出願の優先権を主張する国際出願日における出願人の資格に関する申立て	-	
VIII-4	発明者である旨の申立て(米国を指定国とする場合)	-	
VIII-5	不利にならない開示又は新規性喪失の例外に関する申立て	-	
IX	願書欄	用紙の枚数	添付された電子データ
IX-1	願書(申立てを含む)	5	✓
IX-2	明細書	40	-
IX-3	請求の範囲	3	-
IX-4	要約	1	✓
IX-5	図面	5	-
IX-7	合計	54	
	添付書類	添付	添付された電子データ
IX-8	手数料計算用紙	✓	-
IX-16	寄託した微生物又は他の生物材料に関する書類	✓	-
IX-17	PCT-SAFE 電子出願	-	✓
IX-18	その他:	納付する手数料に相当する特許印紙を貼付した書面	
IX-19	要約書とともに提示する図の番号		
IX-20	国際出願の使用言語名	日本語	

特許協力条約に基づく国際出願願

原本(出願用)

X-1	出願人、代理人又は代表者の記名押印	
X-1-1	氏名(姓名)	青木 篤
X-1-2	署名者の氏名	
X-1-3	権限	
X-2	出願人、代理人又は代表者の記名押印	
X-2-1	氏名(姓名)	石田 敬
X-2-2	署名者の氏名	
X-2-3	権限	
X-3	出願人、代理人又は代表者の記名押印	
X-3-1	氏名(姓名)	福本 積
X-3-2	署名者の氏名	
X-3-3	権限	
X-4	出願人、代理人又は代表者の記名押印	
X-4-1	氏名(姓名)	古賀 哲次
X-4-2	署名者の氏名	
X-4-3	権限	
X-5	出願人、代理人又は代表者の記名押印	
X-5-1	氏名(姓名)	西山 雅也
X-5-2	署名者の氏名	
X-5-3	権限	

受理官庁記入欄

10-1	国際出願として提出された書類の実際の受理の日	
10-2	図面	
10-2-1	受理された	
10-2-2	不足図面がある	
10-3	国際出願として提出された書類を補充する 図又は図面であつてその最期間内に提出されたものの実際の受理の日(訂正日)	
10-4	特許協力条約第11条(2)に基づく必要な補充の期間内の受理の日	
10-5	出願人により特定された国際調査機関	ISA/JP
10-6	調査手数料未払いにつき、国際調査機関に調査用事しを送付していない	

国際事務局記入欄

11-1	記録原本の受理の日	
------	-----------	--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002111

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 39/395, A61P19/00, 25/00, 43/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN), JSTplus (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 2001/0016195 A1 (TOBINICK, E.L.), 23 August, 2001 (23.08.01), Par. Nos. [0019], [0039], [0050]; claims (Family: none)	1,13 2-10,14-22
X Y	TUNA, M. et al., Effect of anti-rat interleukin-6 antibody after spinal cord injury in the rat; inducible nitric oxide synthase expression, sodium - and potassium-activated, magnesium-dependent adenosine-5'-triphosphatase and superoxide dis mutase activation, and ultrastructural changes., Journal of neurosurgery, 2001, Vol.95, Supple.1, pages 64 to 73	1,13 2-10,14-22

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 April, 2004 (30.04.04)

Date of mailing of the international search report

25 May, 2004 (25.05.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002111

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	HIRATA.Y. et al., CHARACTERIZATION OF IL-6 RECEPTOR EXPRESSION BY MONOCLONAL AND POLY CLONAL ANTIBODIES, The Journal of Immunology, 1989, Vol.43, No.9, pages 2900 to 2906	1-4,6,7,9, 10,13-16,18, 19,21,22
Y	TAMURA, T. et al., Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1993, Vol.90, pages 11924 to 11928	1-3,5,6,8,9, 13-15,17,18, 20,21
Y	WO 92/19759 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 12 November, 1992 (12.11.92), Full text & EP 628639 A1 & US 5795965 A	1-10,13-22
A	JP 2002-506000 A. (Creative Biomolecules, Inc.), 26 February, 2002 (26.02.02), Full text & WO 99/21574 A1	1-24
A	JP 2002-503460 A (THE WISTER INSTITUTE), 05 February, 2002 (05.02.02), Full text & WO 99/41364 A1	1-24
A	GUO, X. et al., Leukemia inhibitory factor and ciliary neurotrophic factor causedendritic retraction in cultured rat sympathetic neurons., Te Journal of Neuroscience, 1999, Vol.19, No.6, pages 2113 to 2121	1-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002111

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 25-36

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 25 to 36 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/002111

Although the statement in the description is examined, it is unclear what substances are involved in the scope of the expression "interleukin-6 (IL-6) antagonist" as set forth in claims 1, 11 to 13, 23 and 24 and what are not, other than various antibodies presented in the description. Thus, the claims of the present invention are unclear.

Namely, claims 1, 11 to 13, 23 and 24 do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out.

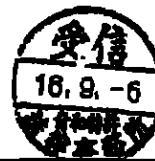
In this international search report, therefore, prior art documents were searched based on the antibodies particularly cited in the description.

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT**NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED**

To:

AOKI, Atsushi
A. Aoki, Ishida & Associates, Toranomon 37 Mori Bldg., 5-1,
Toranomon 3-chome, Minato-ku, Tokyo
1058423
JAPON



Date of mailing (*day/month/year*)
02 September 2004 (02.09.2004)

Applicant's or agent's file reference
M979-PCT

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/JP2004/002111

International filing date (*day/month/year*)
24 February 2004 (24.02.2004)

Priority date (*day/month/year*)
24 February 2003 (24.02.2003)

Applicant

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al

The International Bureau transmits herewith the following documents:

- ☒ copy of the international application as published by the International Bureau on 02 September 2004 (02.09.2004) under No. WO 2004/073741
- ☐ copy of international application as republished by the International Bureau on under No. WO
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (*as the case may be*) on the front page of the attached document.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Yoshiko Kuwahara

Facsimile No.+41 22 740 14 35

Facsimile No.+41 22 338 90 90

Form PCT/IB/311 (January 2004)

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

SECOND AND SUPPLEMENTARY NOTICE
INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES
WHICH APPLY THE 30 MONTH TIME
LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To:

AOKI, Atsushi
A. Aoki, Ishida & Associates, Toranomon 37 Mori Bldg., 5-1,
Toranomon 3-chome, Minato-ku,
Tokyo 105-8423
JAPON



Date of mailing (day/month/year)
30 June 2005 (30.06.2005)

Applicant's or agent's file reference
M979-PCT

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/JP2004/002111

International filing date (day/month/year)
24 February 2004 (24.02.2004)

Priority date (day/month/year)
24 February 2003 (24.02.2003)

Applicant

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al

1. **ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), does not apply, please see Form PCT/IB/308(First Notice) issued previously.
2. Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does apply, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 30, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
02 September 2004 (02.09.2004)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, NA, RU, SY, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

3. The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does apply, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BW, BZ, CA, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, KE, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PG, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SG, SK, SL, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated or elected Office(s) listed above, the applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date.

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated or elected Office(s) listed above. For regular updates on the applicable time limits (30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Yoshiko Kuwahara

Facsimile No.+41 22 740 14 35

Facsimile No.+41 22 338 90 90

PCT

特許性に関する国際予備報告（特許協力条約第二章）

(法第12条、法施行規則第56条)
〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 M979-PCT	今後の手続きについては、様式PCT/IPEA/416を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP2004/002111	国際出願日 (日.月.年) 24.02.2004	優先日 (日.月.年) 24.02.2003
国際特許分類 (IPC) Int. Cl. ⁷ A61K45/00, 39/395, A61P19/00, 25/00, 43/00		
出願人 (氏名又は名称) 中外製薬株式会社		

1. この報告書は、PCT35条に基づきこの国際予備審査機関で作成された国際予備審査報告である。 法施行規則第57条（PCT36条）の規定に従い送付する。	
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 8 ページからなる。	
3. この報告には次の附属物件も添付されている。 a ☐ 附属書類は全部で ページである。 ☐ 補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関が認めた訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面の用紙（PCT規則70.16及び実施細則第607号参照） ☐ 第I欄4.及び補充欄に示したように、出願時における国際出願の開示の範囲を超えた補正を含むものとこの国際予備審査機関が認定した代替用紙 b ☐ 電子媒体は全部で (電子媒体の種類、数を示す)。 配列表に関する補充欄に示すように、コンピュータ読み取り可能な形式による配列表又は配列表に関連するテーブルを含む。（実施細則第802号参照）	
4. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 ☒ 第I欄 国際予備審査報告の基礎 ☐ 第II欄 優先権 ☒ 第III欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 ☐ 第IV欄 発明の単一性の欠如 ☒ 第V欄 PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文獻及び説明 ☐ 第VI欄 ある種の引用文獻 ☐ 第VII欄 国際出願の不備 ☒ 第VIII欄 国際出願に対する意見	

国際予備審査の請求書を受理した日 28.05.2004	国際予備審査報告を作成した日 13.01.2005		
名 及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)	4C	3127
	川口 裕美子 電話番号 03-3581-1101 内線 3451		

様式PCT/IPEA/409 (表紙) (2004年1月)

第I欄 報告の基礎

1. この国際予備審査報告は、下記に示す場合を除くほか、国際出願の言語を基礎とした。

- ☐ この報告は、_____ 語による翻訳文を基礎とした。
それは、次の目的で提出された翻訳文の言語である。

- ☐ PCT規則12.3及び23.1(b)にいう国際調査
☐ PCT規則12.4にいう国際公開
☐ PCT規則55.2又は55.3にいう国際予備審査

2. この報告は下記の出願書類を基礎とした。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差替え用紙は、この報告において「出願時」とし、この報告に添付していない。)

- ☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書

第 _____ ページ、出願時に提出されたもの
第 _____ ページ、 _____ 付けて国際予備審査機関が受理したもの
第 _____ ページ、 _____ 付けて国際予備審査機関が受理したもの

- ☐ 請求の範囲

第 _____ 項、出願時に提出されたもの
第 _____ 項、PCT19条の規定に基づき補正されたもの
第 _____ 項、 _____ 付けて国際予備審査機関が受理したもの
第 _____ 項、 _____ 付けて国際予備審査機関が受理したもの

- ☐ 図面

第 _____ ページ/図、出願時に提出されたもの
第 _____ ページ/図、 _____ 付けて国際予備審査機関が受理したもの
第 _____ ページ/図、 _____ 付けて国際予備審査機関が受理したもの

- ☐ 配列表又は関連するテーブル

配列表に関する補充欄を参照すること。

3. ☐ 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 第 _____ ページ/図
☐ 配列表 (具体的に記載すること) _____
☐ 配列表に関連するテーブル (具体的に記載すること) _____

4. ☐ この報告は、補充欄に示したように、この報告に添付されかつ以下に示した補正が出願時における開示の範囲を超えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c))

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 第 _____ ページ/図
☐ 配列表 (具体的に記載すること) _____
☐ 配列表に関連するテーブル (具体的に記載すること) _____

* 4. に該当する場合、その用紙に“superseded”と記入されることがある。

第Ⅲ欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解の不作成

1. 次に關して、当該請求の範圍に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により査しない。

☐ 国際出願全体

☒ 請求の範圍 25-36

理由:

☒ この国際出願又は請求の範圍 25-36 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている(具体的に記載すること)。

請求の範圍 25-36 は治療による人体の処置方法に関するものであつて、PCT 34 条(4)(a)(i)及びPCT規則 67.1(iv)に該当するため、この国際予備審査機關が予備審査することを要しない対象に係るものである。

☐ 明細書、請求の範圍若しくは圖面(次に示す部分)又は請求の範圍 _____ の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない(具体的に記載すること)。

☐ 全部の請求の範圍又は請求の範圍 _____ が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

☒ 請求の範圍 25-36 について、国際調査報告が作成されていない。

☐ スクレオチド又はアミノ酸の配列表が、実施細則の附屬書C(塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン)に定める基準を、次の点で満たしていない。

書面による配列表が

- ☐ 提出されていない。
- ☐ 所定の基準を満たしていない。
- ☐ 提出されていない。
- ☐ 所定の基準を満たしていない。

コンピュータ読み取り可能な形式による配列表が

☐ コンピュータ読み取り可能な形式によるスクレオチド又はアミノ酸の配列表に関連するテーブルが、実施細則の附屬Cの2に定める技術的な要件を、次の点で満たしていない。

- ☐ 提出されていない。
- ☐ 所定の技術的な要件を満たしていない。

☐ 詳細については補充欄を参照すること。

第V欄 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	2-12, 14-24	有 無
	請求の範囲	1, 13	
進歩性 (IS)	請求の範囲	11, 12, 23, 24	有 無
	請求の範囲	1-10, 13-22	
産業上の利用可能性 (IA)	請求の範囲	1-24	有 無
	請求の範囲		

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

- 文献1: US 2001/0016195 A1 (TOBINICK, E. L.) 2001. 08. 23
 文献2: TUNA, M. et al, Journal of neurosurgery, 2001, Vol. 95, Suppl. 1, p. 64-73
 文献3: HIRATA, Y. et al, The Journal of Immunology, 1989, Vol. 143, No. 9, p. 2900-2906
 文献4: TAMURA, T. et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, Vol. 90, p. 11924-11928
 文献5: WO 92/19759 A1 (中外製薬株式会社) 1992. 11. 12

請求の範囲 1, 13:

請求の範囲 1, 13に係る発明は、国際調査報告に引用された文献 1, 2により新規性及び進歩性を有さない。

文献 1, 2には、インターロイキン-6 アンタゴニストが脊髄損傷の治療に有効であることが記載されている。

請求の範囲 1-10, 13-22:

請求の範囲 1-10, 13-22に係る発明は、国際調査報告に引用された文献 1-5により進歩性を有さない。

請求の範囲 2-10, 14-22に係る発明は、請求の範囲 1, 13に係る発明のインターロイキン-6 アンタゴニストを、さらに IL-6 受容体に対する各種抗体に特定したものであるが、文献 1, 2に記載された前記アンタゴニストは、IL-6 自体に対する抗体である点で、本願発明と文献 1, 2に記載された発明とは相違する。

しかしながら、文献 1, 2においては、上記アンタゴニストが IL-6 自体に対する抗体のみに限定されているとは認められず (文献 1: [0050]、文献 2: 要旨等、参照)、また、当業者であれば、文献 3-5に記載されるような公知のインターロイキン-6 アンタゴニストを脊髄損傷の治療に使用してみることは、当業者が容易になし得たことである。

第Ⅳ欄 国際出願に対する意見

請求の範囲、明細書及び図面の明瞭性又は請求の範囲の明細書による十分な裏付についての意見を次に示す。

請求の範囲 1、11-13、23、24は、インターロイキン-6アンタゴニストに関する発明であって、前記アンタゴニストは、非常に多数の化合物を包含するものである。しかしながら、インターロイキン-6アンタゴニストとして、PCT 6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT 5条の意味において開示されているのは、インターロイキン-6受容体に対する抗体のみであると認められる。

補充欄

いずれかの欄の大きさが足りない場合

第 V 欄の続き

請求の範囲 11, 12, 23, 24:

請求の範囲 11、12、23、24に係る発明は、国際調査報告に引用されたいずれの文献にも記載されておらず、新規性及び進歩性を有する。

インターロイキン-6アンタゴニストが神経幹細胞のグリア細胞への分化を抑制することについては記載も示唆もされていない。

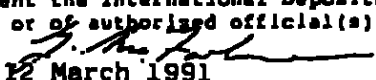


**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISM
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE**

INTERNATIONAL FORM

TO
Dr. Mary M. Bendig,
MRC Collaborative Centre,
1-3 Burtonhole Lane,
Mill Hill,
London. NW7 1AD
NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: Escherichia coli DH5α pPM-h1	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: NCIMB 40362
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: ☐ a scientific description ☒ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 12 February 1991 (date of the original deposit) ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: NCIMB Ltd., Address: 23 St Machar Drive, Aberdeen. AB2 1RY	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  Date: 12 March 1991

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

INTERNATIONAL FORM

TO
Dr. Mary M. Bendig,
MRC Collaborative Centre,
1-3 Burtonhole Lane,
Mill Hill,
London. NW7 1AD
NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:
Escherichia coli DH5 α PPM-k3	NCIMB 40366
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by:	
☐ a scientific description ☒ a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 12 February 1991 (date of the original deposit) ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: NCIMB Ltd.,	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):
Address: 23 St Machar Drive, Aberdeen. AB2 1RY	Date: 12 March 1991

¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary
authority was acquired.

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約〕

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

岸本 忠三

寄託者

あて名 ⑤ 584

殿

大阪府富田林市中野町3丁目5番31号

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

Issued pursuant to Rule 3.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

PMI

(受託番号)

微生物研究第 2998 号

(FERM BP- 2998)

II. 科学的性状及び分類学上の位置

I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

☐ 科学的性状

☒ 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 元年 7月12日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。

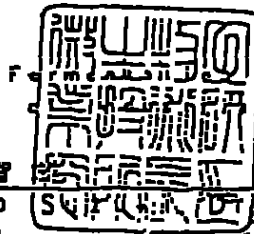
平成 元年 7月12日に寄託された微生物研究第 P- 10839 号より移置)

IV. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

名称:

Agency



Research Institute
Science and Technology

所長 鈴木智

Tomoo

DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号 305)

1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken

305, JAPAN

平成 2年 (1990) 7月 10日

DEPOSITOR
Name Tadamitsu Kishimoto

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

Address 5-31, Nakano-cho 3-chome,
Tondabayashi-shi,
Osaka 584

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the (Deposition Number)
DEPOSITOR: FMI

FERM BP-2998

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

a scientific description

* a proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the
microorganism identified under I above, which was received by it on
July 12, 1989 (Date of the original deposit)¹.

(Transferred from FERM P-10839 deposited on July 12, 1989.)

IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Fermentation Research Institute

Agency of Industrial Science and Technology

Director General Tomoo Suzuki

1-3, Higashi 1 chome, Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken, 305, Japan

July 10, 1990

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される。

issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称) 中外製薬株式会社
取締役社長 永山 治 殿
寄託者 あて名 〒 115
東京都北区浮間5丁目5番1号

1. 微生物の表示	
(寄託者が付した識別のための表示) Rat-mouse hybridoma MR16-1	(受託番号) FERM BP- 5875
2. 科学的性質及び分類学上の位置	
1 本の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。 国 科学的性質 国 分類学上の位置	
3. 受領及び受託	
本国際寄託当局は、平成 9 年 3 月 13 日 (原寄託日) に受領した1本の微生物を受託する。	
4. 移管請求の受領	
本国際寄託当局は、年 月 日 (原寄託日) に1本の微生物を受領した。 そして、年 月 日に原寄託よりブダペスト条約に基づく寄託への移管請求を受領した。	
5. 国際寄託当局	
通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 National Institute of Bioscience and Human-Technology 名称: Agency for Industrial Science and Technology 所長 大石 道夫 Michio Ohsaka, DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号305) 1-3, Higashi-Tsukuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN 平成 9 年 (1997) 3月13日	

Depositor
Name: CHUGAI SEIYAKU
KABUSHIKI KAISHA
Representative: Osamu Nagayama

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

Address: 5-1, Ukima 5-chome,
Kita-ku, Tokyo 115

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

1. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the
DEPOSITOR: Rat-mouse hybridoma MR16-1

(Deposition Number)

FERM BP-5875

2. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under 1 above was accompanied by:

- x a scientific description
- x a proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

3. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the micro-
organism identified under 1 above, which was received by it on
March 13, 1997 (Date of the original deposit)¹.

4. RECEIPT OF TRANSFER

This International Depositary Authority accepted microorganism
identified under 1 above, on _____ (Date of the
original deposit), and accepted a request for transfer to a
deposition under Budapest treaty from the original deposition,
on _____, (Transferred from FERM P _____ deposited
on _____)

5. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

National Institute of Bioscience and Human-Technology

Agency of Industrial Science and Technology

Director General Michio Oishi

1-3, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken, 305, Japan

March 13, 1997

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約〕

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い
発行される

Issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

摩本 忠三

寄託者

殿

あて名

☎ 584

大阪府富田林市中野町3丁目5番31号

I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

HB101-p1B1B5F2R

(受託番号)

微生物研究 2232 号

(FERM BP- 2232)

II. 科学的性質及び分類学上の位置

1個の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

☐ 科学的性質

☒ 分類学上の位置

III. 受領及び受託

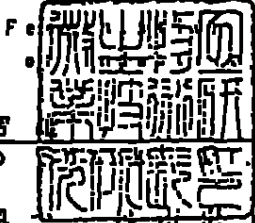
本国際寄託当局は 9日 (原寄託日) に受領した1個の微生物を受託する。

IV. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

名称:

Agency of



Research Institute
Science and Technology

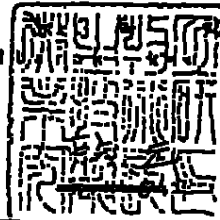
所長 鈴木智

Tomoo

DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県

1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi
305, JAPAN



便番号 305)

989) 1月 9日

DEPOSITOR
Name Tadamitsu Kishimoto

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

Address 5-31, Nakano-cho 3-chome,
Tondabayashi-shi,
Osaka 584

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this
page.

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the (Deposition Number)
DEPOSITOR: HB101-pIBBSF2R

FERM BP-2232

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

a scientific description

x a proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depositary Authority accepts the
microorganism identified under I above, which was received by it on
January 9, 1989 (Date of the original deposit)¹.

IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Fermentation Research Institute

Agency of Industrial Science and Technology

Director General Tomoo Suzuki

1-3, Higashi 1 chome, Tsukuba-shi,
Ibaraki-ken, 305, Japan

January 9, 1989

Extracto de P. folio 144

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 69,908
FECHA : SEPTIEMBRE 12 DE 2005

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Codificación : 85896786 00000000 Folio: 145
Fecha (HH): 2005-09-23 17:35:45
Trámite : 011 PCI-PATENTE 379 FASE NÚM. 401 PRESENCIAL
Dependencia: 2020 DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	31556010	12/09/2005	40,239,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	1
		TRANITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SOM: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Cdo 14778- 841-001-6

Fecha:

147
146

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
FERRERO EMILIO

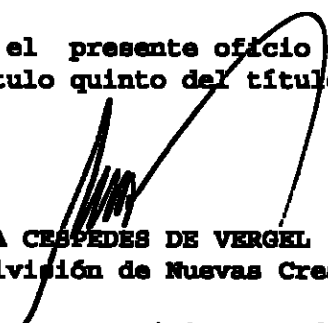
REFERENCIA	Radicación No.	5 96786
	Solicitud internacional	JP2004/002111
	Fecha inicio fase nacional	24/09/2005
	Trámite	11
	Evento	379
	Actuación	430
	Oficio No.	11093

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. Si fuere el caso, el solicitante debe adjuntar la traducción de los anexos del reporte de examen preliminar internacional (Art. 36.2.b) del tratado PCT.
2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente de los inventores a los solicitantes o a sus causantes. (Art. 26-k) Decisión 486.
3. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado por la sociedad Keio University, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPÉDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 25 NOV. 2005
adpal

25 NOV 2005