



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

05-109276

54. TITULO

METODOS PARA TRATAR ENFERMEDADES RELACIONADAS CON

INTERLEUKIN-6

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL

A61K39/505, A61P33/00

73. SOLICITANTE

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

DOMICILIO

Tokio, Japón.

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

22. BOGOTA, D.C.,

C.C. 438.019 de Usaquén,

26/10/2005

SS



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA Y COMERCIO
Radicación: 05105276 00000000 Folios: 143
Fecha (GPO): 2005-10-25 17:10:55 in
Trámite: 011 PCT-PATENT 379 FASE NNCI 411 PRESENCIAL
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS INVENCIONES

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☐ Capítulo I.

☒ Capítulo II.

2

**SOLICITANTE
(71)**

Nombre: **CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI
KAISHA**

sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Japón.

Dirección: 5-1, Ukiwa 5-chome,
Kita-ku, Tokio 1158543
Japón

Domicilio: Tokio
Japón

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
O APODERADO**

Nombre: **EMILIO FERRERO**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 36 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@camyo.com

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

1. **Osamu OKUDA**
Chugai Selyaku Kabushiki Kaisha,
1-9, Kyobashi 2-chome,
Chuo-ku, Tokio 1048301
Japón

1. **Ravinder Nath MAINI**
SW13 9EW, 151 Castelnau,
Barnes, Londres
Reino Unido

2. **Noriaki YOSHIDA**
Chugai Selyaku Kabushiki Kaisha,
1-9, Kyobashi 2-chome,
Chuo-ku, Tokio 1048301
Japón

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/JP2004/006211

Fecha: 28 de Abril 2004

Publicación Internacional No. WO2004/096273 A1

Fecha: 11 de Noviembre 2004

6

Título (54)

**METODOS PARA TRATAR ENFERMEDADES RELACIONADAS CON
INTERLEUKIN-6**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 39/505

A61K39/395; A61P37/00.

8

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

GB

(32) Fecha

28 de Abril 2003

(31) Número de Solicitud

0309619.5

9

Comprobante de pago No.: 05-78,312

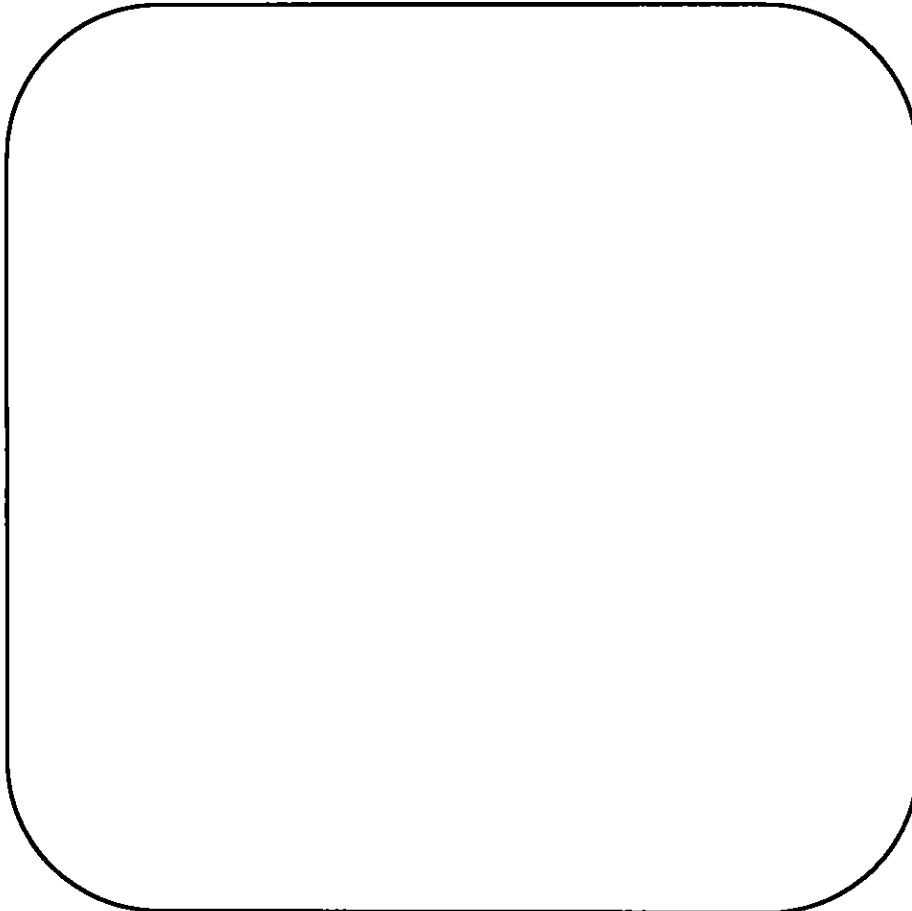
Fecha: 10 de Octubre 2005

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.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☐ 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.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☒ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ 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

11

FIGURA CARACTERÍSTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA :



C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ **Publicación Internacional WO 2004/096273 A1**

Descripción:

Páginas 40 en el idioma original

Páginas 44 en español

Reivindicaciones: Número (s) 80

Figuras: Número (s) _____

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 Publisher or republished.**
11. ☒ **Forma PCT/IB/332. Information Concerning Elected Offices Notified Of Their Election.**
12. ☐ **FORMA PCT/IB/345. Communication in cases for which no other form is applicable.**

13. ☐ **Forma PCT/IPEA/401. PCT Demand**
14. ☐ **Forma PCT/IPEA/402. Notification Of Receipt Of Demand By Competent International Preliminary Examining Authority.**
15. ☐ **Forma PCT/IPEA/408. Written Opinion.**
16. ☐ **Forma PCT/IPEA/416. Notification Of Transmittal Of The International Preliminary Examination Report.**
17. ☒ **Forma PCT/IPEA/409. Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
18. ☐ **Traducción Al Español Del Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
19. ☐ **Traducción Al Español De Los Anexos Presentados Junto Con El Informe Del Examen Preliminar Internacional.**
20. ☒ **Extracto de publicación.**

SWX

CAVELIER

179

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 48 N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostilla 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 Apostilla for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblem, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

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

14419
0280

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 PERDOMO, 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 PERDOMO, 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, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, 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 resumed again by the principal, the first or second alternate depending on the facts of the case where fact or its exercise will suffice. This exercise of the representation by the first, second or third alternate in their turn shall end at such time.

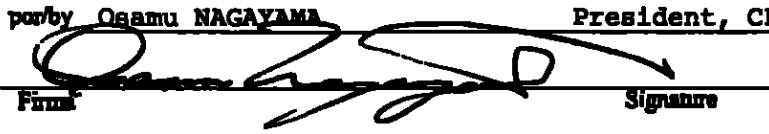
Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no 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; el 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 (confer) Power of Attorney to 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

5

promuevan. 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

COMO NOTARIO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA CONCORDA CON EL ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
25 OCT 2005
JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
NOTARIO

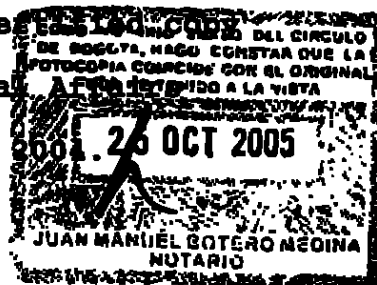
6
Registration No 561 of 2001

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 certificate of the company register issued by Tokyo Legal Bureau, Japanese Government, dated July 21,

Dated this 7th day of October, 2004



Norio Akiyama
Notary Public Norio Akiyama



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





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 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
Norio Akiyama



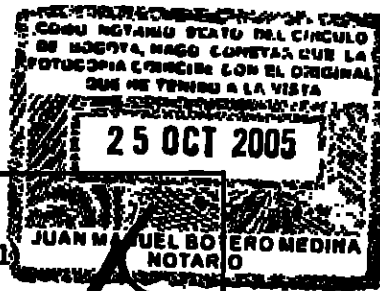
証 明

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

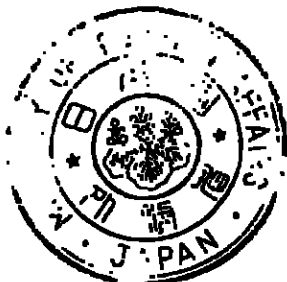


APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

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° 003170
9. Seal/stamp:
10. Signature



S. Hagiwara

Shinichi HAGIWARA

For the Minister for Foreign Affairs

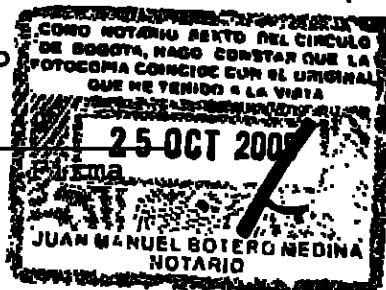
8

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 octubre 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
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999²

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
 NO HAY QUE CONSTAR EN LA
Jorge
 CON LA FIRMA REGISTRADA EN
 EL (ELLOS) EN ESTE NOTARIO
 15 OCT 2004



NO SE ASUME
 RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
 JUN OCT 15 P 12:46
UCS
 JEFE DE LEGALIZACIONES
 SANTIAGO DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
 EXTERIORES
 055123
Diego Vargas
 CUYA FIRMA APARECE EN EL
 DOCUMENTO DESEMPEÑA
 LAS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO
 DE BOGOTA, HAY QUE CONSTAR QUE LA
 FOTOCOPIA QUINCIDE CON EL ORIGINAL
 QUE HE TENIDO A LA VISTA
 25 OCT 2005
 JUAN MANUEL BOCERO MEDINA
 NOTARIO

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
11 November 2004 (11.11.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/096273 A1

- (51) International Patent Classification⁷: A61K 39/505, 39/395
- (21) International Application Number: PCT/JP2004/006211
- (22) International Filing Date: 28 April 2004 (28.04.2004)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 0309619.5 28 April 2003 (28.04.2003) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US): CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA [JP/JP]; 5-1, Uldma 5-chome, Kita-ku, Tokyo, 1158543 (JP).
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): OKUDA, Osamu [JP/JP]; c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, 1-9, Kyobashi 2-chome, Chuo-ku, Tokyo, 1048301 (JP). YOSHIDA, Noriaki [JP/JP]; c/o CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, 1-9, Kyobashi 2-chome, Chuo-ku, Tokyo, 1048301 (JP). MAINI, Ravinder, Nath [GB/GB]; SW13 9EW, 151 Castelnau, Barnes, London (GB).
- (74) Agents: AOKI, Atsushi et al.; A. AOKI, ISHIDA & ASSOCIATES, Toranomon 37 Mori Bldg., 5-1, Toranomon 3-chome, Minato-ku, Tokyo, 1058423 (JP).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, 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.
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:
- with international search report
 - before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS FOR TREATING INTERLEUKIN-6 RELATED DISEASES

(57) Abstract: A pharmaceutical composition for the treatment of interleukin-6 (IL-6) related diseases, comprising an interleukin-6 antagonist (IL-6 antagonist) and immunosuppressants. The IL-6 antagonist is preferably an antibody to an interleukin-6 receptor (IL-6R).

WO 2004/096273 A1

DESCRIPTION

METHODS FOR TREATING INTERLEUKIN-6 RELATED DISEASES

5

BACKGROUND OF INVENTION

1. Field of the Invention

10 The present invention relates to methods for the treatment of interleukin-6 (IL-6) related diseases by the combination of an interleukin-6 antagonist (IL-6 antagonist), particularly an antibody against interleukin-6 receptor (IL-6R) (anti-IL-6R antibody) with immunosuppressants and by administering the anti-IL-6R antibody at a high dose.

15

2. Related Art

IL-6 is a cytokine also termed B cell stimulating factor-2 (BSF2) or interferon β 2. IL-6 was discovered as a differentiation factor involved in activation of B lymphocyte lineage cells (Hirano, T. et al., Nature, 324:73-76, 1986), and after then it has been demonstrated that IL-6 is the multifunctional cytokine which affects functions of various cells (Akira, S. et al., Adv. in Immunology, 54:1-78, 1993). It has been reported that IL-6 induces maturation of T lymphocyte lineage cells (Lotz, M. et al., J. Exp. Med., 167:1253-1258, 1988).

25

IL-6 transmits its biological activity via two types of protein on cells. One is IL-6 receptor which is a ligand binding protein with molecular weight of about 80 kD, to which IL-6 binds (Taga, T. et al., J. Exp. Med., 166:967-981, 1987; Yamasaki, K. et al., Science, 241:825-828, 1987). IL-6 receptor also occurs as soluble IL-6 receptor mainly composed of its extracellular region, in addition to a membrane binding type which penetrates through cell membrane and expresses on the cell membrane.

30

35

International publication WO 92/19759 describes

various types of anti-IL-6R antibodies such as humanized anti-IL-6R antibodies and chimeric anti-IL-6R antibodies. WO 96/11020 describes the therapeutic agent for rheumatoid arthritis and the inhibitor of synovial cell growth of which primary ingredient is IL-6 antagonist such as anti-IL-6R antibody. WO 96/12503 describes the treatment of diseases attributed to IL-6 production, such as plasmacytosis, hyperimmunoglobulinemia, anemia, nephritis, cachexia, rheumatoid arthritis, Castleman's disease, and mesangial proliferative nephritis. WO 98/42377 describes protective/therapeutic agents of sensitized T cell related diseases such as multiple sclerosis, uveitis, chronic thyroiditis, delayed hypersensitivity, contact dermatitis and atopic dermatitis, of which active ingredient is anti-IL-6R antibody.

WO98/42377 describes the therapeutic agents of systemic erythematosus, of which active ingredient is anti-IL-6R antibody. WO99/47170 describes the therapeutic agents of Crohn's disease, of which active ingredient is anti-IL-6R antibody. WO00/10607 describes the therapeutic agents of pancreatitis, of which active ingredient is anti-IL-6R antibody. WO02/3492 describes the therapeutic agents of psoriasis, of which active ingredient is anti-IL-6R antibody. Additionally, WO02/080969 describes the therapeutic agents of juvenile idiopathic arthritis, of which active ingredient is anti-IL-6R antibody.

SUMMARY OF INVENTION

As described above, various preventive or therapeutic agents of which active ingredient is anti-IL-6R antibody have been known. However, it has not been known that synergistic effects can be obtained by the combination of anti-IL-6R antibody with immunosuppressants such as methotrexate (MTX) in the treatment of IL-6 related diseases, the immunosuppressant such as methotrexate (MTX) can reduce or prevent allergic reactions upon the treatment of rheumatoid arthritis with

anti-IL-6R antibody, and that anti-IL-6R antibody at a high dose can reduce or prevent allergic reactions upon the treatment of rheumatoid arthritis with anti-IL-6R antibody.

5 Therefore, the present invention provides a pharmaceutical composition for the treatment of IL-6 related disease, comprising an interleukin-6 antagonist (IL-6 antagonist) and immunosuppressants.

10 The invention also provides a pharmaceutical composition comprising immunosuppressants, for the effect enhancement on the use of an IL-6 antagonist for the treatment of IL-6 related disease.

15 The invention also provides a pharmaceutical composition comprising immunosuppressants, for the prevention or reduction of allergic reactions upon the treatment of IL-6 related diseases with the IL-6 antagonist.

20 The invention further provides a therapeutic agent for IL-6 related diseases to administer at a high dose, comprising an IL-6 antagonist.

 The invention further provides a pharmaceutical composition comprising an IL-6 antagonist at a high dose, for the prevention or reduction of allergic reactions upon the treatment of IL-6 related diseases.

25 The IL-6 antagonist is preferably an anti-IL-6R antibody. The anti-IL-6R antibody is preferably a monoclonal antibody against IL-6R. Preferably, the anti-IL-6R antibody is the monoclonal antibody against human IL-6R. Or, preferably, the anti-IL-6R antibody is the
30 monoclonal antibody against mouse IL-6R. Preferably, the anti-IL-6R antibody is a recombinant type antibody. Preferably, the human anti-IL-6R monoclonal antibody is, for example, PM-1 antibody. Preferably, the mouse anti-IL-6R monoclonal antibody is, for example, MR16-1
35 antibody. The antibody may be further a chimeric antibody, a humanized antibody or a human antibody against IL-6R. Specific preferable anti-IL-6R antibody

is, for example, humanized PM-1 antibody.

When combining the IL-6 antagonist, particularly the anti-IL-6R antibody with the immunosuppressant, the dosage of the IL-6 antagonist, particularly the anti-IL-6R antibody is, for example, in the case of intravenous infusion, from 0.02 to 150 mg/kg/4 weeks or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto, preferably from 0.5 to 30 mg/kg/4 weeks or the dosage showing the anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto, and more preferably from 2 to 8 mg/kg/4 weeks or the dosage showing the anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

When administering the IL-6 antagonist, particularly the anti-IL-6R antibody at a high dose, the dosage of the IL-6 antagonist, particularly the anti-IL-6R antibody is, for example, in the case of intravenous infusion, not less than 4 mg/kg/4 weeks or the dosage showing the anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto, preferably from 6 to 16 mg/kg/4 weeks or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto, and more preferably from 6 to 10 mg/kg/4 weeks or the dosage showing the anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

When MTX is used as the immunosuppressant, the dosage of MTX is, for example, from 1 to 100 mg/body/weeks or the dosage showing the MTX concentration in blood equivalent thereto, preferably from 4 to 50 mg/body/week or the dosage showing the MTX concentration in blood equivalent thereto, and particularly preferably from 10 to 25 mg/body/weeks or the dosage showing the MTX concentration in blood equivalent thereto.

The dosage showing the drug (e.g., anti-IL-6R antibody MTX) concentration in blood means a dosage giving an equivalent therapeutic effect, and even when the transition of the concentration in blood varies according to the administration method such as

intravenous injection and subcutaneous injection, it is regarded as the dosage showing the drug (e.g., anti-IL-6R antibody or MTX) concentration in blood so long as the therapeutic effect is equivalent.

5 Examples of the IL-6 related diseases include,

 Acute chronic inflammatory diseases and autoimmune diseases: nephritis, mesangial proliferative nephritis, Crohn's disease, ulcerative colitis, pancreatitis, juvenile idiopathic arthritis or systemic juvenile
10 idiopathic arthritis, vasculitis, Kawasaki disease, rheumatoid arthritis, systemic erythematosus, psoriasis, Sjogren syndrome, adult Still's disease;

 neoplastic diseases: multiple myeloma, Castleman's disease, malignant lymphoma, renal cancer;

15 infectious diseases: infection with HIV, infection with EBV;

 cachexia: cachexia

 others: plasmacytosis, hyperimmunoglobulinemia, anemia and so on, and are preferably rheumatoid
20 arthritis, plasmacytosis, hyperimmunoglobulinemia, anemia, nephritis, cachexia, multiple myeloma, Castleman's disease, mesangial proliferative nephritis, systemic erythematosus, Crohn's disease, pancreatitis, psoriasis, juvenile idiopathic arthritis or systemic
25 juvenile idiopathic arthritis.

 The pharmaceutical composition of the invention can be administered orally or parenterally and systemically or topically. For instance, intravenous injection such as drip infusion, intramuscular injection, intraperitoneal
30 injection, subcutaneous injection, suppository, colonic injection, oral enteric coating drug and the like can be selected, and the administration method can be appropriately selected depending on the age and condition of a patient. The upper and lower limits of the actual
35 dosage are affected by the frequency of administration, for example, the dosage per dose increases in the case of long administration interval whereas it decreases in the

case of short administration interval.

For the preferable dosage and administration method of the anti-IL-6 receptor antibody, for instance, the amount at an extent as the free antibody exists in blood is the effective dosage. As specific examples, there are methods to administer dividing one to several times, for example, according to an administration schedule of twice/week, once/week, once/two weeks, once/4 weeks, once/6 weeks, once/8 weeks and the like by the method of intravenous injection such as drip infusion and subcutaneous injection. The administration schedule can be adjusted such as extending the administration interval from twice/week or once/week to once/2 weeks, once/3 weeks, once/4 weeks, once/6 weeks and once/8 weeks with observing the disease condition and changes of laboratory data in blood.

When administered in combination with MTX, the dosage of the anti-IL-6R antibody is typically, for example, in the case of the rheumatoid arthritis treatment, the dosage more than 0.5 mg/kg per week or the dosage showing an equivalent or more anti-rheumatic effect. For instance, when the intravenous administration is carried out once four weeks, the dosage is from 0.02 to 150 mg/kg, preferably from 0.5 to 30 mg/kg, and more preferably from 2 to 8 mg/kg.

The anti-IL-6R antibody and the immunosuppressant are administered simultaneously or with a time interval.

The immunosuppressants also encompass anti-rheumatic agents, adrenocortical hormone agents and the like, and include, for example, the following drugs.

A. Immunosuppressants, anti-rheumatic agents, adrenocortical hormone agents

Immunosuppressants

Alkylating agents

Cyclophosphamide

Metabolic antagonists

Azathioprine, methotrexate, mizoribine

T cell activity inhibitors

Cyclosporine, tacrolimus

Anti-rheumatic agents:

Hydroxychloroquine, sulfasalazine, leflunomide,
5 etanercept, infliximab, adalimumab, D-penicillamine, oral
gold compound, injectable gold compound (intramuscular
injection), minocycline, sodium gold thiomalate,
auranofin, D-penicillamine, lobenzarit, bucillamine,
actarit;

10 Adrenocortical hormone agents:

Cortisone, hydrocortisones

Cortisone acetate, hydrocortisone,
hydrocortisone sodium phosphate, hydrocortisone
sodium succinate, fludrocortisone acetate

15 Prednisolone, prednisolones

Prednisolone, prednisolone sodium succinate,
prednisolone sodium phosphate, halopredone
acetate

Methyl prednisolones

20 Methyl prednisolone, methyl prednisolone
acetate, methyl prednisolone sodium succinate

Triamcinolones

Triamcinolone, triamcinolone acetate,
triamcinolone actinide

25 Dexamethasones

Dexamethasone, dexamethasone acetate,
dexamethasone sodium phosphate, dexamethasone
palmitate

Betamethasones

30 Betamethasone (betamethasone sodium phosphate),
betamethasone, betamethasone sodium phosphate

Paramethasones

Paramethasone acetate

35 The dosage of the immunosuppressant is, for example
when MTX is combined for the rheumatoid arthritis
treatment, for example in the case of orally
administering, from 1 to 100 mg/body per week, preferably

from 4 to 50 mg, and more preferably from 7.5 to 25 mg/body.

Also, a high dosage of the anti-IL-6R antibody means the dosage capable of preventing or reducing the allergic reaction, which is equal to or more than a minimum dosage effective for the treatment of IL-6 related diseases. For instance, in the rheumatoid arthritis treatment, when intravenous drip fusion is administered every four weeks, the dosage includes 4 mg/kg or more, preferably from 6 to 16 mg/kg, and more preferably from 6 to 10 mg/kg.

The above administration method, interval, and dosage are exemplifications of preferable examples, and the administration method, interval, and dosage which show similar therapeutic effects can be appropriately selected. For instance, it is possible to select the administration method, interval, and dosage which show the similar effects to those of the above preferable examples by measuring the concentrations of various medicines in blood. The invention includes the administration method, interval, and dosage which achieve the equivalent concentrations in blood to those of the above examples.

MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

The IL-6 antagonist used in the invention may be used without regard to its origin, type and form as long as it exhibits the preventive or therapeutic effect on IL-6 related diseases.

The IL-6 antagonists are substances which inhibit biological activity of IL-6. The IL-6 antagonists are preferably the substances having an inhibitory effect on the binding to either IL-6, IL-6R or gp130. The IL-6 antagonists include anti-IL-6 antibody, anti-IL-6R antibody, anti-gp130 antibody, modified IL-6, modified soluble IL-6R, or partial peptides of IL-6 or IL-6R, as well as low molecular substances which exhibit the similar activity thereto.

The anti-IL-6 antibody used in the invention can be

19
btained as polyclonal or monoclonal antibody using means known in the art. As the anti-IL-6 antibody used in the invention, the monoclonal antibody derived from mammalian animals is preferable. The monoclonal antibodies derived from mammalian animals include those in produced hybridomas, and those produced in host cells transf rmed with expression vector containing the antibody gene by gene engineering technique. This antibody inhibits the binding of IL-6 to IL-6 receptor by binding to IL-6 t block signaling of IL-6 biological activity into cells.

Such antibodies include MH166 (Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol., 18:951-956, 1988) and SK2 (Sato, K. et al., The 21st Proceedings of the Japanese Society for Immunology, 21:166, 1991).

Hybridomas producing the anti-IL-6 antibody can be made basically using the technology known in the art as follows. That is, the hybridomas can be made by performing immunization using IL-6 as a sensitized antigen according to the standard immunization method, fusing the resultant immunized cells to parent cells known in the art by the standard cell fusion method, and screening cells producing the monoclonal antibody by the standard screening method.

Specifically, the anti-IL-6 antibody can be made as follows. For instance, human IL-6 used as the sensitized antigen to obtain the antibody can be obtained using the genel amino acid sequence of IL-6 disclosed in Eur. J.Biochem., 168:543-550, 1987; J. Immunol., 140:1534-1541, 1988; or Agr. Biol. Chem., 54:2685-2688, 1990.

The gene sequence of IL-6 is inserted into the expression vector known in the art, which transforms appropriate host cells, subsequently, the target IL-6 protein is purified from the cells or the culture supernatant by the method known in the art, and the purified IL-6 protein can be used as the sensitized antigen. Also, the fusion protein of the IL-6 protein with the other protein may be used as the sensitized

antigen.

The anti-IL-6 receptor antibody used in the invention can be obtained as polyclonal or monoclonal antibody using means known in the art. As the anti-IL-6 receptor antibody used in the invention, the monoclonal antibody derived from mammalian animals is preferable. The monoclonal antibodies derived from mammalian animals include those in produced hybridomas, and those produced in host cells transformed with expression vector containing the antibody gene by gene engineering technique. This antibody inhibits the binding of IL-6 to IL-6 receptor by binding to IL-6 receptor to block signaling of IL-6 biological activity into cells.

Such antibodies include MR16-1 antibody (Tamura, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11924-11928, 1993), PM-1 antibody (Hirata, Y. et al., J. Immunol., 143:2900-2906, 1989), AUK-12-20 antibody, AUK64-7 antibody or AUK146-15 antibody (International Patent Application Publication No. WO 92-19759). Among them, the particularly preferable antibody includes PM-1 antibody.

The hybridoma cell line producing PM-1 antibody as PM-1 has been internationally deposited at International Patent Organism Depository (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki Pref.) on the basis of Budapest Treaty as FERM BP-2998 on July 12, 1989. The hybridoma cell line producing MR16-1 antibody as rat-mouse hybridoma MR16-1 has been internationally deposited at International Patent Organism Depository (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki Pref.) on the basis of Budapest Treaty as FERM BP-5875 on March 13, 1997.

Hybridomas producing the anti-IL-6 receptor monoclonal antibody can be made basically using the technology known in the art as follows. That is, the hybridomas can be made by performing immunization using IL-6 receptor as a sensitized antigen according to the standard immunization method, fusing the resultant

immunized cells to parent cells known in the art by the standard cell fusion method, and screening cells producing the monoclonal antibody by the standard screening method.

5 Specifically, the anti-IL-6 receptor antibody can be made as follows. For instance, human IL-6 receptors used as the sensitized antibody to obtain the antibody can be obtained by using IL-6 receptor gene/amino acid sequences disclosed in European Patent Application Publication No.
10 EP325474 and JP-A-3-155795, respectively.

 The IL-6 receptor protein has two types, i.e., one expressed on cells and one dissociated from the cell membrane (soluble IL-6 receptor)(Yasukawa, K. et al., J. Biochem., 108:673-676). The soluble IL-6 receptor is
15 substantially composed of an extracellular region of the IL-6 receptor, and is different from the membrane binding IL-6 receptor in lacking a transmembrane region or transmembrane and intracellular regions. Both IL-6
20 receptor proteins may be used as long as they are used as the sensitized antigen for the production of the anti-IL-6 receptor antibody used in the invention.

 The gene sequence of IL-6 receptor is inserted into the expression vector known in the art, which transforms appropriate host cells, subsequently, the target IL-6
25 receptor protein is purified from the cells or the culture supernatant by the method known in the art, and the purified IL-6 receptor protein can be used as the sensitized antigen. Also, the cells expressing IL-6
30 receptor and the fusion protein of the IL-6 receptor protein with the other protein may be used as the sensitized antigen.

 E. coli containing plasmid, pIBBSF2R including cDNA encoding human IL-6 receptor as HB101-pIBBSF2R has been internationally deposited at International Patent
35 Organism Depository (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki Pref.) on the basis of Budapest Treaty as the access No. FERM BP-2232 as of

January 9, 1989.

The anti-gp130 antibody used in the invention can be obtained as polyclonal or monoclonal antibody using means known in the art. As the anti-gp130 antibody used in the invention, the monoclonal antibody derived from mammalian animals is preferable. The monoclonal antibodies derived from mammalian animals include those in produced hybridomas, and those produced in host cells transformed with expression vector containing the antibody gene by gene engineering technique. This antibody inhibits the binding of IL-6/IL-6 receptor complex to gp130 by binding to gp130 to block signaling of IL-6 biological activity into cells.

Such antibodies include AM64 antibody (JP-A-3-219894), 4B11 antibody and 2H4 antibody (US 5571513), B-S12 antibody and B-P8 antibody (JP-A-8-291199).

Hybridomas producing the anti-gp130 monoclonal antibody can be made basically using the technology known in the art as follows. That is, the hybridomas can be made by performing immunization using gp130 as a sensitized antigen according to the standard immunization method, fusing the resultant immunized cells to parent cells known in the art by the standard cell fusion method, and screening cells producing the monoclonal antibody by the standard screening method.

Specifically, the monoclonal antibody can be made as follows. For instance, gp130 used as the sensitized antigen to obtain the antibody can be obtained by using the gp130 gene/amino acid sequences disclosed in European Patent Application Publication No. EP 411946.

The gene sequence of gp130 is inserted into the expression vector system known in the art, which transforms appropriate host cells, subsequently, the target gp130 protein is purified from the cells or the culture supernatant by the method known in the art, and the purified gp130 protein can be used as the sensitized antigen. Also, the cells expressing gp130 and the fusion

protein of the gp130 protein with the other protein may be used as the sensitized antigen.

5 Mammalian animals immunized with the sensitized antigen are not particularly limited, but preferably selected in consideration of compatibility with parent cells used for cell fusion. In general, rodent animals such as mouse, rat and hamster are used.

10 Immunization of the animal with the sensitized antigen is carried out according to the methods known in the art. As the general methods, it is carried out by injecting the sensitized antigen to the animal intraperitoneally or subcutaneously. Specifically, it is preferred that the sensitized antigen is appropriately diluted and suspended with PBS (phosphate-buffered
15 saline) or saline, which is mixed with an appropriate amount of standard adjuvant, e.g., Freund's complete adjuvant to be emulsified, and subsequently administered to the mammalian animal several times with an interval of 4 to 21 days. Also, an appropriate carrier can be used
20 upon the immunization with the sensitized antigen.

The animal is immunized in this way and it is confirmed that levels of the desired antibody are increased in serum. Subsequently, the immunized cells are removed from the mammalian animal, and are committed for
25 cell fusion. Preferable immunized cells committed for cell fusion particularly include spleen cells.

For myeloma cells of the mammalian animals as partner parent cells fused with the above immunized cells, cell lines already known in the art, e.g.,
30 P3X63Ag8.653 (Kearney, J. F. et al., J. Immunol., 123:1548-1550, 1979), P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology, 81:1-7, 1978), NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol., 6:511-519, 1976), MOC-11 (Margulies D.H. et al., Cell, 8:405-415, 1976),
35 SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature, 276:269-270, 1978), FO (de St. Groth, S.F. et al., J. Immunol. Methods, 35:1-21, 1980), S194 (Trowbridge, I.S. J. Exp. Med., 148:311-323,

1978), R210 (Galfre, G. et al., Nature, 277:131-133, 1979) are appropriately used.

5 The cell fusion of the above immunized cells with myeloma cells can be carried out basically according to the methods known in the art, e.g., Milstein's method (Kohler G. and Milstein C., Methods Enzymol., 73:3-46, 1981).

10 More specifically, the above cell fusion is performed, for example, in the standard nutrient culture medium in the presence of a cell fusion accelerator. As the cell fusion accelerator, for example, polyethyleneglycol (PEG), Sendai virus (HVJ) and the like are used, and an auxiliary agent such as dimethylsulfoxide can be further added/used as desired in
15 order to increase the fusion efficiency.

A use ratio of the immunized cells to the myeloma cells is preferably, for example, 1 to 10 folds of the immunized cells to the myeloma cells. As media used for the above cell fusion, the use of RPMI 1640 medium, MEM
20 medium suitable for growth of the myeloma cell line, and the other standard media used for this type of cell culture is possible, and further serum supplement such as feral calf serum (FCS) can be combined.

For the cell fusion, the target fused cells
25 (hybridomas) are formed by thoroughly mixing the above immunized cells with the myeloma cells at the given amounts in the above medium, adding PEG solution, e.g., PEG solution with average molecular weight of about 1000 to 6000 prewarmed at 37°C at a standard concentration of
30 30 to 60% (w/v), and mixing. Subsequently, a cell fusion agent and the like which are not preferable for the growth of the hybridomas can be removed by repeating the manipulation of sequentially adding the appropriate medium and removing the supernatant by centrifuge.

35 The hybridomas are selected by culturing in the standard selection medium, e.g., HAT medium (medium containing hypoxanthine, aminopterin and thymidine). The

culture in the HAT medium is continued for typically from several day to several weeks, sufficient time period until cells other than the target hybridomas (non-fused cells) die out. Then, the standard limiting dilution method is performed, and the hybridomas producing the target antibody are screened and cloned.

Also in addition to obtaining the above hybridoma by immunizing the animal other than human with the antigen, desired human antibody having binding activity to the desired antigen or cells expressing the antigen can be obtained by sensitizing human lymphocytes with the antigen protein or the cells expressing the antigen in vitro, and fusing the sensitized B lymphocytes with human myeloma cells, e.g., U266 (see JP-B-1-59878). Moreover, the antigen or antigen expressing cells may be administered to transgenic animals having repertoire of human antibody gene to obtain the desired human antibody according to the method described above (See International Patent Application Publication Nos. WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735).

The hybridoma producing the monoclonal antibody made in this way can be cultured in the standard culture medium, and also can be stored in liquid nitrogen for a long time.

In order to obtain the monoclonal antibody from the hybridomas, employed is the method where the hybridomas are cultured according to the standard method and the monoclonal antibody is obtained as its culture supernatant, or the method where the hybridomas are propagated by administering to the compatible mammalian animal therewith and the monoclonal antibody is obtained as its ascites. The former method is suitable for obtaining the antibody with a high purity, and the latter method is suitable for producing the antibody at a large scale.

For instance, the production of the hybridoma

producing the anti-IL-6 receptor antibody can be carried out by the method disclosed in JP-A-3-139293. The method where hybridomas producing PM-1 antibody internationally deposited at International Patent Organism Depository (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki Pref.) as FERM BP-2998 on July 12, 1989 on the basis of Budapest Treaty are injected intraperitoneally to BALB/c mouse to obtain the ascites and PM-1 antibody is purified from this ascites can be carried out. Also, the method where the present hybridomas are cultured in the appropriate medium, for example, RPMI 1640 medium, hybridoma SFM medium (supplied from GIBCO-BRL), PFHM-II medium (supplied from GIBCO-BRL) containing 10% fetal calf serum and 5% BM-Condimed H1 (supplied from Boehringer Mannheim) and PM-1 antibody is purified from its culture supernatant can be carried out.

In the invention, as the monoclonal antibody, it is possible to use recombinant type antibody produced by cloning the antibody gene from the hybridoma, inserting the gene into an appropriate vector, introducing this into host cells, and using gene engineering technology (see, for example, Borrebaeck, C.A.K. and Larrick, J.M., Therapeutic Monoclonal Antibodies, published in the United Kingdom by Macmillan Publishers Ltd., 1990).

Specifically, mRNA encoding the variable (V) region of the antibody is isolated from the cells producing the target antibody, e.g., hybridomas. For the isolation of mRNA, total RNA is prepared by the methods known in the art, e.g., guanidine ultracentrifuge method (Chirgwin, J.M. et al., Biochemistry, 18:5294-5299, 1979), AGPC method (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem., 162:156-159, 1987), and mRNA is prepared by the use of mRNA Purification Kit (supplied from Pharmacia). Also, mRNA can be directly prepared by the use of QuickPrep mRNA Purification Kit (supplied from Pharmacia).

cDNA of the antibody V region is synthesized from the resultant mRNA using reverse transcriptase. The

synthesis of cDNA can be carried out using AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit and the like. Also, 5'-Ampli FINDER RACE kit (supplied from Clontech) and 5'-RACE method using PCR (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:8998-9002, 1988; Belyavsky A. et al., Nucleic Acids Res., 17:2919-2932, 1989) can be used to synthesize and amplify cDNA. The target DNA fragment is purified from the resultant PCR product, and ligated to the vector DNA. Further, a recombinant vector is made by this, which is introduced into E. coli, and colonies are selected to prepare the desired recombinant vector. The base sequence of the target DNA is confirmed by the method known in the art, e.g., deoxy method.

15 If the DNA encoding the V region of the target antibody is obtained, this is ligated to DNA encoding the constant (C region) region of the desired antibody, and then it is incorporated into the expression vector. Or the DNA encoding the V region of the antibody may be
20 incorporated into the expression vector containing the C region of the antibody.

 In order to produce the antibody used in the invention, the antibody gene is incorporated into the expression vector so as to express under the expression
25 regulation regions such as enhancer and promoter as described later. Next, host cells can be transformed with this expression vector to express the antibody.

 In the invention, artificially modified gene recombinant antibodies, e.g., chimeric antibody,
30 humanized antibody and human antibody can be used for the purpose of reducing allogenic antigenicity for human. These modified antibodies can be made using the known methods.

 The chimeric antibody can be obtained by ligating
35 the DNA encoding the antibody V region obtained as above to the DNA encoding the human antibody C region and incorporating this into expression vector to be

introduced to host to produce (see European Patent Application Publication NO. EP 125023, International Patent Application Publication No. WO 92/19759). Using these known methods, the chimeric antibody useful for the invention can be obtained.

For example, the plasmids containing DNA encoding the V regions of the L and H chains of the PM-1 chimeric antibody were named pPM-k3 and pPM-h1, respectively, and E. coli having these plasmids have been internationally deposited at National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria Limited (23 St. Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Scotland, United Kingdom) as NCIMB 40366 and NCIMB 40362, respectively on February 12, 1991 on the basis of Budapest Treaty.

The humanized antibodies are also referred to as reshaped human antibodies, are those in which the complementarity determining region (CDR) of the antibody of the mammalian animal other than human, e.g., mouse is transplanted in the complementarity determining region of the human antibody, and its general gene recombinant method has been known (see European Patent Application Publication NO. EP 125023, International Patent Application Publication No. WO 92/19759).

Specifically, the DNA sequence designed to link the CDR of the mouse antibody to the framework region (FR) of the human antibody is synthesized by PCR from several oligonucleotides made to have an overlapping portion at the terminus. The resultant DNA is ligated to the DNA encoding the human antibody C region, then it is incorporated into the expression vector, which is introduced into the host to produce the humanized antibody (see European Patent Application Publication NO. EP 239400, International Patent Application Publication No. WO 92/19759).

As FR of the human antibody ligated via the CDR, those are selected where the complementarity determining region forms a good antigen binding site. Amino acids in

the framework region of the antibody variable region may be substituted as needed such that the complementarity determining region of the reshaped human antibody forms the proper antigen binding site (Sato, K. et al., Cancer Res., 53:851-856, 1993).

The human antibody C region is used for the chimeric antibody and humanized antibody. The human antibody C region includes C γ , and for example, C γ 1, C γ 2, C γ 3 or C γ 4 can be used. The human antibody C region may be modified to improve stability of the antibody or the production thereof.

The chimeric antibody is composed of the variable region of the antibody derived from the mammalian animal other than human and the C region derived from the human antibody. The humanized antibody is composed of the complementarity determining region the antibody derived from the mammalian animal other than human and the framework region and the C region derived from the human antibody. Therefore, these have reduced antigenicity in the human body and thus are useful as the antibody used in the invention.

Preferable specific examples of the humanized antibody used in the invention include humanized PM-1 antibody (see International Patent Application Publication No. WO 92-19759).

Also, as the methods to obtain the human antibody, the technology to obtain the human antibody by panning using human antibody library is known in addition to the methods described above. For example, the variable region of the human antibody can be expressed on the surface of phages as a single strand antibody (scFv) by the phage display method, and the phages bound to the antigen can be selected. When the gene of the selected phages is analyzed, the DNA sequence encoding the variable region of the human antibody bound to the antigen can be determined. If the DNA sequence of scFv bound to the antigen is demonstrated, the sequence can be made by an

appropriate expression vector to obtain the human antibody. These methods have been already well-known, and it is possible to cite WO 92101047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438, and WO 95/15388.

The antibody gene constructed as described above can be expressed and obtained by the methods known in the art. In the case of the mammalian cells, the antibody gene can be expressed by the DNA in which commonly useful promoter, the antibody gene to be expressed, and poly A signal 3' downstream therefrom are functionally bound, or by the vector containing them. For instance, promoter/enhancer can include human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer.

Also, as the other promoter/enhancer capable of being used for the expression of the antibody used in the invention, the viral promoter/enhancer of retrovirus, polyoma virus, adenovirus, simian virus 40(SV40), and the promoter/enhancer derived from the mammalian cells human elongation factor 1 α (HEF1 α) can be used.

For instance, the expression can be performed according to Mulligan et al.'s method (Mulligan, R. C. et al., Nature, 277:108-114, 1979) in the case of using SV40 promoter/enhancer, or Mizushima et al.'s method (Mizushima, S and Nagata, S., Nucleic Acids Res., 18:5322, 1990) in the case of using HEF1 α promoter/enhancer.

In the case of E. coli, the gene can be expressed by functionally binding commonly useful promoter, a signal sequence for antigen secretion and the antibody gene to be expressed. For instance, the promoters can include lacZ promoter and araB promoter. Ward et al.'s method (Ward, E. S. et al., Nature, 341:544-546, 1989; Ward, E. S. et al., FASEB J., 6:2422-2427, 1992) and Better et al.'s method (Better, M. et al., Science, 240:1041-1043, 1988) can be used in the cases of using lacZ promoter and

araB pr m ter, respectively.

As the signal sequence for the secretion of antibody, pelB signal sequence (Lei, S. P. et al., Bacteriol., 169:4379-4383, 1987) can be used in the case of the production in periplasm of E. coli. The antibody produced in the periplasm is isolated, and subsequently used by appropriately refolding the antibody structure (see, for example, WO 96/30394).

Those derived from SV40, polyoma virus, adenovirus, bovine papilloma virus (BPV) can be used as a replication origin. Additionally, for the amplification of gene c py number in the host cell system, the expression vector can include aminoglycoside phosphotransferase (APH) gene, thymidine kinase (TK) gene, E. coli xanthine guanine phosphoribosyl transferase (Ecogpt) gene, dihydrofolate reductase (dhfr) gene and the like as selection markers.

For the production of the antibody used in the invention, an optional production system can be used. There are in vitro and in vivo systems of the production for making the antibody. The production system in vitro include the production system using eukaryotic cells and the production system using prokaryotic cells.

In the cases of using eukaryotic cells, there are the production systems using animal cells, plant cells, or fungus cells. As the animal cells, (1) mammalian cells, e.g., CHO, COS, myeloma, BHK (baby hamster kidney), HeLa, Vero, etc., (2) amphibian cells, e.g., oocytes of Xenopus, or (3) insect cells, e.g., sf9, sf21, Tn5, etc. are known. As plant cells, the cell derived from Nicotiana tabacum is known and this can be cultured as callus. As fungus cells, yeast, for example, genus Saccharomyces, e.g., Saccharomyces cerevisiae, and Filamentous, for example, genus Aspergillus, e.g., Aspergillus niger are known.

In the case of using prokaryotic cells, there are the production systems using bacterial cells. As the bacterial cells, E. coli and Bacillus subtilis are known.

The antibody can be obtained by introducing the target antibody gene into these cells by transformation and culturing the transformed cells in vitro. The culture is carried out according to the methods known in the art.
5 For instance, DMEM, MEM, RPMI 1640 and IMDM can be used as the medium, and the serum supplement such as fetal calf serum (FCS) can be also combined. The antibody may be produced in vivo by transferring the cells in which the antibody gene is introduced into a peritoneal cavity
10 of the animal.

On the other hand, the production systems in vivo include the production systems using animals and the production systems using plant cells. In the case of using animal cells, there are the production system using
15 mammalian animals and insects.

As the mammalian animals, a goat, swine, sheep, mouse, cattle and the like can be used (Vicki Glaser, Spectrum Biotechnology Applications, 1993). Also, as insects, a silk worm can be used. In the case of using
20 plants, for example, tobacco can be used.

The antibody gene is introduced into these animals or plants, the antibody is produced in the body of the animal or plant, and is collected. For example, the antibody gene is prepared as a fusion gene by inserting
25 in a midstream of the gene encoding the protein inherently produced in milk such as goat β casein. The DNA fragment containing the fusion gene inserted the antibody gene is injected into goat embryo, which is transferred in a female goat. The desired antibody is
30 obtained from the milk of a transgenic goat born from the goat which received the embryo or progenies thereof. Appropriate hormones may be used for the transgenic goat in order to increase an amount of the milk containing the desired antibody (Ebert, K. M. et al., Bio/Technology,
35 12:699-702, 1994).

In the case of using silk worms, the silk worms are infected with baculovirus inserted the target antibody

gene, and the desired antibody is obtained from body fluid of these silk worms (Maeda, S. et al., Nature, 315:592-594, 1985). Moreover, in the case of using tobacco, the target antibody gene is inserted into plant expression vector, e.g., pMON 530, and this vector is introduced into bacteria such as *Agrobacterium tumefaciens*. The tobacco, such as *Nicotiana tabacum*, is infected with these bacteria, and the desired antibody is obtained from leaves of this tobacco (Julian, K. C., Ma, et al., Eur. J. Immunol., 24:131-138, 1994).

When the antibody is produced in the production system in vitro or in vivo as described above, the DNA encoding the antibody heavy chain (H chain) or light chain (L chain) may be separately incorporated into the expression vectors, which may simultaneously transform the host, or the DNA encoding the H chain and L chain are incorporated into a single expression vector, which may transform the host (see International Patent Application Publication No. WO 94-11523).

The antibody used in the invention may be fragments of the antibody or modification thereof as long as the antibody is suitably used. For instance, the fragments of the antibody include, for example, Fab, F(ab')₂, Fv, or single chain Fv (scFv) where Fv of the H and L chains are linked by an appropriate linker.

Specifically, the antibody is treated with enzyme, such as papain, pepsin, to generate the antibody fragments, or the gene encoding the antibody fragment is constructed, and this is introduced into the expression vector, which is expressed in an appropriate host cells (see, for example, Co, M. S. et al., J. Immunol., 152:2968-2976, 1994; Better, M. & Horwitz, A. E., Methods in Enzymology, 178:476-496, 1989; Plueckthun, A. & Skerra, A., methods in Enzymology, 178:476-496, 1989; Lamoyi, E., Methods in Enzymology, 121:652-663, 1989; Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology, 121:663-66, 1989; Bird, R. E. et al., TIBTECH, 9:132-137, 1991).

34

By ligating the H chain V region to the L chain V region, scFv is obtained. In this scFv, the H chain V region and the L chain V region are preferably linked via a linker, preferably a peptide linker (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988). The H chain V region and the L chain V region in scFv may be derived from any of those described as the above antibody. As the peptide linker which links the V regions, used is, for example, a given single chain peptide composed of 12 to 19 amino acid residues.

DNA encoding scFv is obtained by amplifying the DNA portion encoding the desired amino acid sequence among DNA encoding the H chain or H chain V region and L chain or L chain V region of the above antibody, which are used as templates using primers which define the both ends thereof by PCR method, then further by amplifying DNA encoding the peptide linker portion and the both ends thereof combining a pair of primers which define to be linked to the H and L chains.

Also, once the DNA encoding scFv is made, the expression vector containing them, and the host transformed with the expression vector can be obtained according to the standard methods, and scFv can be obtained using the host according to the standard methods.

For these antibody fragments, their genes can be obtained, expressed and produced by the hosts as with the above. "Antibody" referred to in the invention includes these antibody fragments.

As modification of the antibody, it is also possible to use the antibody bound to various molecules such as polyethyleneglycol (PEG). "Antibody" referred to in the invention includes these antibody modification. In order to obtain such antibody modifications, they can be obtained by giving chemical modification to the obtained antibody. These methods have been already established in this field.

The antibody produced and expressed as the above can be isolated from inside and outside of cells and the host, and purified to be homogenous. The isolation and purification of the antibody used in the invention can be carried out by affinity chromatography. The column used in the affinity chromatography includes, for example, protein A column and protein G column. Carriers used for the protein A column include Hyper D, POROS, Sepharose F. F. and the like. The other isolation/purification methods used for normal proteins can be used, and the methods are not limited at all.

For example, the antibody used in the invention can be isolated and purified by appropriately selecting and combining chromatography other than the above affinity chromatography, filter, ultrafiltration, salting out, dialysis and so on. Examples of chromatography include ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, gel filtration and the like. Such chromatography can be applied for HPLC (high performance liquid chromatography). Also reverse phase HPLC may be used.

Measurement of concentrations of the antibody obtained above can be carried out by the measurement of absorbance or by ELISA. That is, in the case of the measurement of the absorbance, the antibody is appropriately diluted with PBS(-) followed by measuring the absorbance at 280 nm, and the concentration is calculated by 1 mg/ml as 1.35 OD. In the case by ELISA, the measurement can be carried out as follows. That is, 100 μ l of goat anti-human IgG (supplied from TAG) diluted at 1 μ g/ml with 0.1 M bicarbonate buffer (pH 9.6) is added to a 96-well plate (supplied from Nunc), and is incubated overnight at 4°C to immobilize the antibody. After blocking, 100 μ l of the appropriately diluted antibody used in the invention or a sample containing the antibody, or human IgG (supplied from Cappel) as the standard is added, and incubated at room temperature for

one h ur.

After washing, 100 μ l of alkaline phosphatase labeled anti-human IgG (supplied from Bio Source) diluted at 5000 folds is added and incubated at room temperature for one hour. After washing, a substrate solution is added followed by the incubation, and subsequently, the absorbance at 405 nm is measured using Microplate Reader Model 3550 (supplied from Bio-Rad) to calculate the concentration of the target antibody.

Modified IL-6 used in the invention is substances having binding activity to IL-6 receptor and which do not transmit the biological activity of IL-6. That is, since the modified IL-6 does not transmit the biological activity of IL-6 although it binds to IL-6 receptor competitively with IL-6, it blocks signal transduction by IL-6.

The modified IL-6 is made by introducing variants by substituting amino acid residues in the amino acid sequence of IL-6. IL-6 which is a source of the modified IL-6 can be obtained from any origin, but it is preferably human IL-6 in consideration of its antigenicity.

Specifically, the modification of IL-6 is carried out by forecasting its secondary structure of IL-6 amino acid sequence using the molecular modeling program known in the art, e.g., WHATIF (Vriend et al., Mol. Graphics, 8:52-56, 1990) and further by evaluating effects of amino acid residues to be substituted on the whole protein. After determining suitable amino acid residues to be substituted, the gene encoding the modified IL-6 is obtained by introducing the variants by the conventional PCR method such that the amino acids are substituted using the vector containing the base sequence encoding human IL-6 gene as the template. The modified IL-6 can be obtained by incorporating this into the appropriate vector as needed and following to the above methods for the expression, production and purification of the

recombinant antibody.

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

Partial peptides of IL-6 or partial peptides of IL-6 receptor used in the invention have binding activity to IL-6 receptor or IL-6, respectively, and are substances which do not transmit the biological activity of IL-6.

That is, the partial peptide of IL-6 or the partial peptide of IL-6 receptor specifically inhibits the binding of IL-6 to IL-6 receptor by binding to and capturing IL-6 receptor or IL-6, respectively.

Consequently, since they do not transmit the biological activity of IL-6, they block the signal transduction by IL-6.

The partial peptide of IL-6 or the partial peptide of IL-6 receptor is the peptide composed of partial or entire amino acid sequence involved in the binding of IL-6 to IL-6 receptor in the amino acid sequence of IL-6 or IL-6 receptor. Such a peptide is composed of typically from 10 to 80, preferably from 20 to 50, and more preferably from 20 to 40 amino acid residues. The partial peptide of IL-6 or the partial peptide of IL-6 receptor can be made by defining the region involved in the binding to IL-6 or IL-6 receptor in the amino acid sequence of IL-6 or IL-6 receptor and synthesizing its partial or entire amino acid sequence by the methods commonly known, e.g., gene engineering technique or peptide synthesis methods.

In order to make the partial peptide of IL-6 or the partial peptide of IL-6 receptor by the gene engineering technique, it can be obtained by inserting the DNA sequence encoding the desired peptide into the expression vector and following to the above expression, production and purification methods of the recombinant antibody.

In order to prepare the partial peptide of IL-6 r

the partial peptide of IL-6 receptor by the peptide synthesis method, it is possible to use the methods typically used in peptide synthesis, for example, the solid phase synthesis method or liquid phase synthesis method.

Specifically, the synthesis can be carried out according to Zoku Iyakuhin, Kaihatu Vol. 14 Peptide Gosei, (Ed., Yajima, H., Hirokawa Shoten, 1991). As the solid phase synthesis method, used is, for example, the method where the peptide chain is extended by binding an amino acid corresponding to the C terminus of the peptide to be synthesized to a support which is insoluble in an organic solvent, and alternately repeating a reaction in which one amino acid is sequentially condensed in the direction from the C to N terminus in amino acids of which α -amino group and side chain functional groups are protected with appropriate protecting groups and a reaction in which the protecting group of α -amino group is eliminated in the amino acids or peptide attached to the resin. The solid phase synthesis methods are broadly classified into Boc method and Fmoc method depending on the types of protecting groups used.

After the target peptide is synthesized in this way, deprotection reaction and cleavage reaction of the peptide chain from the support are carried out. In the cleavage reaction of the peptide chain, hydrogen fluoride or trifluoromethane sulfonate and TFA can be typically used in Boc method and Fmoc method, respectively. In Boc method, the above protected peptide resin is treated with hydrogen fluoride in the presence of anisole. Then, the elimination of the protecting group and the cleavage from the support are carried out to recover the peptide. This is lyophilized to yield the crude peptide. On the other hand, in Fmoc method, for example, in TFA, the deprotection reaction and the cleavage reaction of the peptide chain from the support can be carried out by the

same manipulation as the above.

The resultant crude peptide can be isolated and purified by applying on HPLC. The elution can be performed under an optimal condition using a water-acetonitrile solvent typically used for the purification of protein. Fractions corresponding to peaks in a profile of the resultant chromatography are collected and lyophilized. The peptide fractions purified in this way are identified by analysis of molecular weights by mass spectrometry, amino acid composition analysis or amino acid sequence analysis.

The specific examples of the partial peptides of IL-6 and IL-6 receptor are disclosed in JP-A-2-188600, 7-324097, and 8-311098, and US patent 5210075.

The pharmaceutical compositions of the invention may be those containing pharmaceutically acceptable carriers and additives depending on their administration pathways. Examples of such carriers and additives include water, pharmaceutically acceptable organic solvents, collagen, polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, carboxyvinyl polymer, sodium carboxymethylcellulose, sodium polyacrylate, sodium arginate, water-soluble dextran, sodium carboxymethyl starch, pectin, methyl cellulose, ethyl cellulose, xanthane gum, gum arabic, casein, gelatin, agarose, diglycerin, propyleneglycol, polyethylene glycol, petrolatum, paraffin, stearyl alcohol, stearic acid, human serum albumin (HSA), mannitol, sorbitol, lactose, acceptable surfactants as pharmaceutical additives and the like. The additives used are selected appropriately from the above or in combination depending on their formulation, but are not limited thereto.

Examples

The present invention is specifically described below by examples and reference examples, but the invention is not limited thereto.

Example 1:

MRA is a recombinant humanised anti-human interleukin-6 receptor monoclonal antibody of the IgG1 sub-class that inhibits the function of the cytokine interleukin-6 (IL-6). In early studies in Japan and Europe, MRA showed promise in the treatment of rheumatoid arthritis and was tolerated well.

This was a large, Phase II trial of MRA to determine the optimum dose of MRA given alone and in combination with methotrexate for the treatment of rheumatoid arthritis. The potential efficacy of repeated intravenous doses of MRA, both as monotherapy and in combination with methotrexate, were assessed in patients with active rheumatoid arthritis despite of the treatment with methotrexate for a specified period of time and compared to methotrexate monotherapy. The efficacy, safety and tolerability of MRA were assessed.

Methods:

Subjects: Patients with rheumatoid arthritis diagnosed based on the 1987 disease classification of the American College of Rheumatology (ACR), of at least 6 months duration were enrolled. Patient must have active disease and had an inadequate response to, or disease flare on MTX given for at least 6 months at a dose of at least 12.5 mg weekly or 10 mg weekly in the case of intolerance.

Study design: a double-blind, randomized, parallel group study by central randomization method

Dosage and Administration: Seven groups: 0 mg/kg (placebo) + MTX, 2 mg/kg MRA + MTX, 4 mg/kg MRA + MTX, 8 mg/kg MRA + MTX, 2 mg/kg MRA + MTX placebo, 4 mg/kg MRA + MTX placebo, and 8 mg/kg MRA + MTX placebo. MRA or placebo administration is given by intravenous infusion, at 4-week intervals. MTX or MTX placebo administration is given orally, once weekly, at 10-25 mg/week.

Study Method: The assigned dose was administered by intravenous infusion, four times in total at 4-week intervals, and efficacy and safety were evaluated at 2-

week intervals up to 16 weeks, and follow-up observation was done at 20 weeks. The primary endpoint for efficacy was the rate of ACR 20 at 16 weeks (4 weeks after the last dose). Secondary endpoints included rates of ACR 50 and ACR 70 at 16 weeks (4 weeks after the last dose).

ACR improvement criteria: The cases where among the following 7 items, the number of swelling joints and the number of pain joints are improved by 20% or more and improvement by 20% or more is observed in three out of the remaining five items are determined as 20% or more improvement in ACR criteria. Further, 50% and 70% improvement cases indicate the patient cases where the above 20% improved parts are improved by 50% and 70%, respectively.

- (1) Number of swelling joints
- (2) Number of tender joints
- (3) Pain assessment by a patient
- (4) Global assessment of disease activity by a patient
- (5) Global disease activity by a physician
- (6) Assessment of physical function by a patient
- (7) CRP or ESR

Table 1

	2 mg/kg MRA	4 mg/kg MRA	8 mg/kg MRA	MTX
ACR 20	30.8%	61.1%	62.7%	40.8%
ACR 50	5.8%	27.8%	41.2%	28.6%
ACR 70	1.9%	5.6%	15.7%	16.3%
	2 mg/kg MRA+MTX	4 mg/kg MRA+MTX	8 mg/kg MRA+MTX	
ACR 20	64.0%	63.3%	73.5%	
ACR 50	32.0%	36.7%	53.1%	
ACR 70	14.0%	12.2%	36.7%	

Statistically significantly higher ACR 20 improvement rate was observed in all groups except the MRA alone 2 mg/kg group compared to the control group. In the MRA 8 mg/kg + MTX group, ACR 50 and 70 improvement rate were 53.1% and 36.7%, respectively, which were statistically significantly higher than those of the control group which were 28.6% and 16.3%, respectively.

In the MRA alone groups, statistically significant dose dependency was observed in ACR 20 improvement rate. Also, for ACR50 and ACR70 improvement rate, the statistically significant dose dependent response was observed in both MRA alone and MTX-combined groups.

Reduction of Swollen Joint Count (Table 2)

The mean swollen joint count was similar across all the treatment groups at baseline.

There was a cumulative reduction in the mean swollen joint count from baseline with increasing duration of exposure in all seven treatment groups. The mean reduction in the swollen joint count in the MRA 8 mg/kg group was statistically significant compared with the reduction in the MTX group ($p=0.010$). At Week 16, the mean difference (95% CI) between the MRA 8 mg/kg group and the MTX group was -2.31 ($-4.07, -0.55$). There was a statistically significant linear dose-relationship between the MRA monotherapy groups ($p<0.001$). The mean reduction in swollen joint count in the MRA 8 mg/kg + MTX group was statistically significant compared with the reduction in the MTX group ($p<0.001$). The mean difference (95% CI) between the MRA 8 mg/kg + MTX group and the MTX group was -3.62 ($-5.39, -1.84$). There was a statistically significant linear dose-relationship between the MRA combination therapy groups ($p=0.004$).

43

Table 2

	2 mg/kg MRA	4 mg/kg MRA	8 mg/kg MRA	MTX
Baseline: N	52	54	51	49
Mean±SD	11.6±4.6	11.1±4.4	12.2±5.2	12.7±4.2
Change from Baseline: Week 16 N	42	43	43	39
Mean±SD	-4.5±5.7	-5.8±4.1	-8.4±4.6	-5.7±6.1
	2 mg/kg MRA+MTX	4 mg/kg MRA+MTX	8 mg/kg MRA+MTX	
Baseline: N	50	49	49	
Mean±SD	11.9±4.3	11.9±3.9	11.8±3.9	
Change from Baseline: Week 16 N	46	42	44	
Mean±SD	-6.2±4.6	-6.8±5.4	-9.4±4.0	

Among 359 enrolled patients, the safety evaluation sets, the full analysis sets, and PPS (per protocol set) were 359, 354, and 307, respectively. Total 359 patients were enrolled, 299 completed the study, and the 60 were withdrawn. Among the withdrawn patients, 33 were due to adverse events, one was due to complication with the other disease, seven were due to adverse events, 7 were due to the use of drugs with prohibited concomitant use, five were due to withdrawal of informed consent, one was due to lost to follow up, and 22 were due to lack of efficacy (including multiple reasons).

Among serious adverse events of which causal relationship could not be denied, five cases of infection were reported. That is, one patient with foot abscess and osteomyelitis in the 2 mg/kg MRA group, one patient with chest infection and pleurisy, one patient with septicaemia in the 8 mg/kg MRA + MTX group, one patient with septicaemia in the 8 mg/kg MRA + MTX group, and one patient with joint infection in the 8 mg/kg MRA + MTX group, were reported. In addition to them, five cases of hypersensitivity were reported as serious adverse events of which causal relationship could not be denied that is, four patients of hypersensitivity in the 2 mg/kg MRA

24
44

gr up and ne patient f hypersensitivity in the 4 mg/kg MRA group were reported. All of these events of hypersensitivity occurred in no combination with MTX after the 3rd or 4th MRA administration.

5 Concerning the laboratory data values for hepatic functions, although the elevation of ALT and AST levels were observed as a result of MRA use, such elevations were equivalent to those observed in the other patients with rheumatoid arthritis. The increase of the laboratory
10 data relating to lipids (total cholesterol, HDL cholesterol and triglyceride) was observed in the MRA groups. However, there was no overall change in Atherogenic Index.

 Slight transient decrease of neutrophil count
15 occurred in some patients. The clinically significant changes of the parameters for disease activity, i.e., the decreases of CRP and ESR and the elevation of hemogl bin were observed in a dose dependent manner.

Infusion reaction

20 An infusion reaction was defined as an adverse event occurring within 24 hours of study drug administration. The number of patients experiencing an infusion reaction in each treatment group suggested a possible inverse dose-response for MRA.

25 Anti-MRA antibody

 The development of anti-MRA antibodies was examined. None occurred at the 8 mg/kg treatment groups (monotherapy or combination with MTX). At 2 or 4 mg/kg treatment groups, the number of incidents was less in
30 groups in combination with MTX than MRA monotherapy groups.

Results

 A clear dose-response was observed for MRA monotherapy and for MRA combined with methotrexate. The
35 effectiveness of MRA to treat patients with rheumatoid arthritis was confirmed for both MRA monotherapy and for MRA combined with methotrexate. Also, safety of MRA was

confirmed in both MRA monotherapy and for MRA combined with methotrexate.

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

5 The soluble IL-6 receptor was made by the PCR method using plasmid, pBSF2R.236 containing cDNA encoding IL-6 receptor obtained according to Yamasaki et al.'s method (Yamasaki, K. et al., Science, 241:825-828, 1988). The plasmid, pBSF2R.236 was digested with a restriction
10 enzyme, SphI to obtain IL-6 receptor cDNA, which was then inserted into mp18 (supplied from Amersham). Variants were introduced into the IL-6 receptor cDNA in PCR method by in vitro mutagenesis system (supplied from Amersham) using synthetic oligoprimers designed to introduce a stop
15 codon into the cDNA of IL-6 receptor. This manipulation introduced the stop codon at position 345 of the amino acid to give the cDNA encoding the soluble IL-6 receptor.

 The soluble IL-6 receptor cDNA was ligated to the plasmid pSV (supplied from Pharmacia) to afford the
20 plasmid pSVL344 in order to express the cDNA in CHO cells. The soluble IL-6 receptor cDNA digested with HindIII-SalI was inserted into the plasmid pECEdhfr containing cDNA of dhfr to give CHO cell expression plasmid pECEdhfr344.

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

 The selected CHO cells were screened by the limiting
35 dilution method, and a single clone of CHO cells was obtained. This CHO clone was amplified with methotrexate

at the concentration of 20 nM to 200 nM to obtain CHO cell line 5E27 which produces the human soluble IL-6 receptor. CHO cell line 5E27 was cultured in Iscove's modified Dulbecco medium (IMDM, supplied from Gibco) containing 5% FBS. The culture supernatant was collected, and the concentration of the soluble IL-6 receptor in the culture supernatant was measured by ELISA. As a result, it was affirmed that the soluble IL-6 receptor was present in the culture supernatant.

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

BALB/c mouse was immunized with 10 µg of recombinant IL-6 (Hirano, T. et al., Immunol. Lett., 17:41, 1988) along with Freund's complete adjuvant, and the immunization was continued every one week until anti-IL-6 antibody was detected in serum. Immunized cells were removed from local lymph nodes and fused with myeloma cell line, P3U1 using polyethyleneglycol 1500. Hybridomas were selected according to Oi et al's method (Selective Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) using HAT medium, and the hybridoma producing anti-human IL-6 antibody was established.

IL-6 binding assay was carried out as follows for the hybridomas producing anti-human IL-6 antibody. That is, a flexible polyvinyl 96-well microplate (supplied by Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA) was coated with 100 µl of goat anti-mouse Ig (10 µl/ml; supplied from Cooper Biomedical Inc., Malvern, PA) in 0.1 M carbonate-hydrogen carbonate buffer (pH 9.6) at 4°C overnight. Then, the plate was treated with 100 µl of PBS containing 1% of bovine serum albumin (BSA) for 2 hours at room temperature.

This was washed with PBS, subsequently 100 µl of the hybridoma culture supernatant was added to each well, and incubated at 4°C overnight. The plate was washed, then

¹²⁵I labeled recombinant IL-6 was added to each well to be at 2000 cpm/0.5 ng/well, the plate was washed, and subsequently radioactivity in each well was measured by a gamma counter (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA). Consequently, 32 out of 216 hybridoma clones were positive in the IL-6 binding assay. Among these clones, finally stable MH166.BSF2 was obtained. The anti-IL-6 antibody MH166 produced by the hybridoma has a subtype of IgG1κ.

Then, neutralization activity of MH166 antibody for the growth of hybridomas was examined using IL-6 dependent mouse hybridoma clone MH60.BSF2. MH60.BSF2 cells were dispensed at 1×10^4 /200 µl/well, a sample containing MH166 antibody was added thereto followed by being cultured for 48 hours, and 0.5 µCi/well of ³H thymidine (New England Nuclear, Boston, MA) was added. After an additional 6 hours' culture, the cells were placed on glass filter paper, and treated using an automatic harvester (Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan). Rabbit anti-IL-6 antibody was used as the control.

As a result, MH166 antibody inhibited ³H thymidine uptake of MH60.BSF2 cells induced by IL-6 in a dose dependent manner. This demonstrated that MH166 antibody neutralized the activity of IL-6.

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

Anti-IL-6 receptor antibody MT18 made by Hirano et al.'s method (Hirano, Y. et al., J. Immunol., 143:2900-2906, 1989) was bound to Sepharose 4B (supplied from Pharmacia Fine Chemicals; Piscataway, NJ) activated by CNBr according to the attached formulation to purify IL-6 receptor (Yamasaki, K. et al., Science, 241:825-828, 1988). Human myeloma cell line, U266 cells were solubilized with 1 mM of p-para-aminophenylmethane sulfonylfluoride hydrochloride (supplied from Wako

Chemicals) containing 1% of digitonin (supplied from Wako Chemicals), 10 mM of ethanolamine (pH 7.8) and 1.5 M of NaCl (digitonin buffer), and mixed with MT18 antibody bound to Sepharose 4B beads. Subsequently, the beads were washed with the digitonin buffer six times, and rendered as partially purified IL-6 receptor for immunization.

BALB/c mouse was immunized with the above partially purified IL-6 receptor obtained from 3×10^8 U266 cells every 10 days four times, and subsequently hybridomas were made by the standard method. Binding activity to IL-6 receptor was examined in the hybridoma culture supernatants from growth positive wells by the following method. U266 cells at 5×10^7 were labeled with ^{35}S -methionine (2.5 mCi), and solubilized with the above digitonin buffer. The solubilized U266 cells were mixed with 0.04 ml volume of MT18 antibody bound to Sepharose 4B beads, subsequently washed with the digitonin buffer six times, then ^{35}S -methionine labeled IL-6 receptor was eluted with 0.25 ml of the digitonin buffer (pH 3.4), and neutralized with 0.025 ml of 1M Tris (pH 7.4).

The hybridoma culture supernatant (0.05 ml) was mixed with 0.01 ml of Protein G Sepharose (supplied from Pharmacia). After washing, the Sepharose was incubated with 0.005 ml of the ^{35}S -methionine labeled IL-6 receptor solution prepared above. Immunoprecipitate was analyzed by SDS-PAGE, and the hybridoma culture supernatants which reacted with IL-6 receptor were examined. Consequently, a reaction positive hybridoma clone, PM-1 (FERM BP-2998) was established. The antibody produced by the hybridoma, PM-1 has a subtype of IgGk.

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

Boston, MA).

U266 cells at 4×10^5 were cultured with 70%(v/v) of the hybridoma PM-1 culture supernatant and 14000 cpm of ^{125}I -labeled IL-6. A sample (70 μl) was layered on 300 μl of FCS in a 400 μl microfuge polyethylene tube, and centrifuged followed by measuring radioactivity on the cells.

Consequently, the antibody produced by the hybridoma PM-1 was demonstrated to inhibit the binding of IL-6 to IL-6 receptor.

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

A monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor was prepared by the method described in Saito, T. et al., J. Immunol., 147:168-173, 1991.

CHO cells which produce mouse soluble IL-6 receptor were cultured in IMDM medium containing 10% FCS, and the mouse soluble IL-6 receptor was purified from the culture supernatant using an affinity column where the anti-mouse IL-6 receptor antibody RS12 (See the above Saito, T. et al.) was fixed onto Affigel 10 gel (supplied from Biorad).

The resultant mouse soluble IL-6 receptor (50 μg) was mixed with Freund's complete adjuvant, which was injected into peritoneal cavity of a Wistar rat. After two weeks, additional immunization was started with Freund's incomplete adjuvant. On the 45th day, spleen cells of the rat were removed, and 2×10^8 cells were fused with 1×10^7 mouse myeloma P3U1 cells by the standard method using 50% of PEG1500 (supplied from Boehringer Mannheim) followed by screening hybridomas in HAT medium.

The hybridoma culture supernatants were added to a plate coated with rabbit anti-rat IgG antibody (supplied from Cappel), and subsequently the mouse soluble IL-6 receptor was reacted. Then, the hybridomas producing the

antibody against the mouse soluble IL-6 receptor were screened by ELISA method using rabbit anti-mouse IL-6 receptor antibody and alkaline phosphatase labeled sheep anti-rabbit IgG. The hybridoma clone in which the production of the antibody was affirmed was subcloned twice, and a single hybridoma clone was obtained. This clone was named MR16-1.

Neutralization activity of the antibody produced by this hybridoma was examined for signal transduction of mouse IL-6 by uptake of ^3H thymidine using MH60.BSF2 cells (Matsuda, T. et al., J. Immunol., 18:951-956, 1988). MH60.BSF2 cells were prepared to be 1×10^4 cells/200 μl /well in a 96-well plate. To this plate, 10 pg/ml of mouse IL-6 and 12.3 to 1000 ng/ml of MR16-1 antibody or RS12 antibody were added, then cultured at 37°C for 44 hours at 5% CO_2 , and subsequently 1 μCi /well of ^3H thymidine was added. 4 hours later, the uptake of ^3H thymidine was measured. Consequently, MR16-1 antibody suppressed uptake of ^3H thymidine of MH60.BSF2 cells.

Accordingly, the antibody produced by the hybridoma MR16-1 (FERM BP-5875) was demonstrated to inhibit the binding of IL-6 to IL-6 receptor.

CLAIMS

1. A pharmaceutical composition for the treatment of IL-6 related diseases, comprising an interleukin 6 antagonist (IL-6 antagonist) and immunosuppressants.

5 2. A pharmaceutical composition comprising immunosuppressants, for effect enhancement on the use of IL-6 antagonist for the treatment of IL-6 related diseases.

10 3. A pharmaceutical composition comprising immunosuppressants, for the reduction or prevention of allergic reactions upon the treatment of IL-6 related diseases with an IL-6 antagonist.

4. A therapeutic agent for the administration at high doses, comprising an IL-6 antagonist.

15 5. A pharmaceutical composition comprising a high dose of IL-6 antagonist, for the reduction or prevention of allergic reactions upon the treatment of IL-6 related diseases.

20 6. The pharmaceutical composition according to any one of claims 1 to 5, wherein said IL-6 antagonist is an anti-interleukin-6 receptor antibody (IL-6R antibody).

7. The pharmaceutical composition according to claim 6, wherein said IL-6R antibody is a monoclonal antibody against IL-6R.

25 8. The pharmaceutical composition according to claim 6 or 7, wherein said anti-IL-6R antibody is a monoclonal antibody against human IL-6R.

30 9. The pharmaceutical composition according to claim 6 or 7, wherein said anti-IL-6R antibody is a monoclonal antibody against mouse IL-6R.

10. The pharmaceutical composition according to any one of claims 6 to 9, wherein said anti-IL-6R antibody is a recombinant antibody.

35 11. The pharmaceutical composition according to claim 8, wherein said human anti-IL-6R monoclonal antibody is PM-1 antibody.

12. The pharmaceutical composition according to

claim 9, wherein said mouse IL-6R monoclonal antibody is MR16-1 antibody.

13. The pharmaceutical composition according to any one of claims 6 to 12, wherein said anti-IL-6R antibody is a chimera antibody, a humanized antibody or a human type antibody against IL-6R.

14. The pharmaceutical composition according to claim 13, wherein said humanized antibody against IL-6R is humanized PM-1 antibody.

15. The pharmaceutical composition according to any one of claims 1 to 14, wherein said IL-6 related diseases are rheumatoid arthritis, plasmacytosis, hyperimmunoglobulinemia, anemia, nephritis, cachexia, multiple myeloma, Castleman's disease, mesangial proliferative nephritis, systemic lupus erythematosus, Crohn's disease, ulcerative colitis, pancreatitis, psoriasis, juvenile idiopathic arthritis or systematic juvenile idiopathic arthritis, vasculitis and Kawasaki disease.

16. The pharmaceutical composition according to any one of claims 1 to 3 and claims 6 to 15, which is said pharmaceutical composition comprising the immunosuppressant or said pharmaceutical composition comprising the antibody and the immunosuppressant, wherein a dosage of anti-IL-6R antibody is from 0.02 to 150 mg/kg/4 weeks or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

17. The pharmaceutical composition according to claim 16, wherein the dosage of anti-IL-6R antibody is from 0.5 to 30 mg/kg/4 weeks or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

18. The pharmaceutical composition according to claim 17, wherein the dosage of anti-IL-6R antibody is from 2 to 8 mg/kg/4 weeks or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

19. The pharmaceutical composition according to any

one of claims 4 to 15, which is said therapeutic agent for the treatment of IL-6 related diseases for the administration at high doses, comprising the anti-IL-6R antibody or said pharmaceutical composition comprising high doses of the anti-IL-6R antibody, wherein the dosage of anti-IL-6R antibody is 4 mg/kg/4 weeks or more or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

20. The pharmaceutical composition according to claim 19, wherein the dosage of anti-IL-6R antibody is from 6 to 16 mg/kg/4 weeks or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

21. The pharmaceutical composition according to claim 20, wherein the dosage of anti-IL-6R antibody is from 6 to 10 mg/kg/4 weeks or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

22. The pharmaceutical composition according to any one of claims 1 to 3 and claims 6 to 21, wherein said immunosuppressant is methotrexate (MTX).

23. The pharmaceutical composition according to claim 22, wherein the dosage of said MTX is from 1 to 100 mg/body/week.

24. The pharmaceutical composition according to claim 23, wherein the dosage of said MTX is from 4 to 50 mg/body/week.

25. The pharmaceutical composition according to claim 24, wherein the dosage of said MTX is from 7.5 to 25 mg/body/week.

26. The pharmaceutical composition according to any one of claims 1 to 3 and claims 6 to 25, for simultaneously administering said anti-IL-6 antibody and said immunosuppressant.

27. The pharmaceutical composition according to any one of claims 1 to 3 and claims 6 to 25, for administering said anti-IL-6 antibody and said immunosuppressant with time interval.

28. A use of an interleukin-6 antagonist (IL-6

antagonist) and immunosuppressants for the production of a pharmaceutical composition for the treatment of IL-6 related diseases.

5 29. A use of an IL-6 antagonist for the production of a pharmaceutical composition comprising immunosuppressants, for the effect enhancement on the use of the IL-6 antagonist for the treatment of IL-6 related diseases.

10 30. A use of an IL-6 antagonist for the production of a pharmaceutical composition comprising immunosuppressants, for the reduction or prevention of allergic reactions upon the treatment of IL-6 related diseases with the IL-6 antagonist.

15 31. A use of an IL-6 antagonist for the production of a therapeutic agent of IL-6 related diseases for the administration at high doses, comprising the IL-6 antagonist.

20 32. A use of an IL-6 antagonist for the production of a pharmaceutical composition comprising anti-IL-6R antibody at high doses for reduction or prevention of allergic reactions upon the treatment of IL-6 related diseases.

25 33. The use according to any one of claims 28 to 32, wherein said IL-6 antagonist is an anti-interleukin-6 receptor antibody (IL-6R antibody).

34. The use according to any one of claims 28 to 33, wherein said IL-6R antibody is a monoclonal antibody against IL-6R.

30 35. The use according to any one of claims 28 to 34, wherein said anti-IL-6R antibody is a monoclonal antibody against human IL-6R.

36. The use according to any one of claims 28 to 34, wherein said anti-IL-6R antibody is a monoclonal antibody against mouse IL-6R.

35 37. The use according to any one of claims 28 to 36, wherein said anti-IL-6R antibody is a recombinant antibody.

38. The use according to claim 35, wherein said human anti-IL-6R monoclonal antibody is PM-1 antibody.

39. The use according to claim 36, wherein said mouse anti-IL-6R monoclonal antibody is MR16-1 antibody.

5 40. The use according to any one of claims 32 to 39, wherein said anti-IL-6R antibody is a chimera antibody, a humanized antibody or a human type antibody against IL-6R.

10 41. The use according to claim 40, wherein said humanized antibody against IL-6R is humanized PM-1 antibody.

15 42. The use according to any one of claims 21 to 41, wherein said IL-6 related diseases are rheumatoid arthritis, plasmacytosis, hyperimmunoglobulinemia, anemia, nephritis, cachexia, multiple myeloma, Castleman's disease, mesangial proliferative nephritis, systemic lupus erythematosus, Crohn's disease, pancreatitis, psoriasis, juvenile idiopathic arthritis or systematic juvenile idiopathic arthritis.

20 43. The use according to any one of claims 28 to 30 and claims 33 to 42, which is said use for the production of the pharmaceutical composition comprising the immunosuppressant or the pharmaceutical composition comprising anti-IL-6 antibody and the immunosuppressant, 25 wherein a dosage of anti-IL-6R antibody is from 0.02 to 150 mg/kg/4 weeks or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

30 44. The use according to claim 43, wherein the dosage of anti-IL-6R antibody is from 0.5 to 30 mg/kg/4 weeks or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

35 45. The use according to claim 44, wherein the dosage of anti-IL-6R antibody is from 2 to 8 mg/kg/4 weeks or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

46. The use according to any one of claims 31 to 45, which is said use for the production of therapeutic

agent for the treatment of IL-6 related diseases for the administration at high dose, comprising the anti-IL-6R antibody or said pharmaceutical composition comprising high doses of the anti-IL-6R antibody, wherein the dosage of anti-IL-6R antibody is 4 mg/kg/4 weeks or more or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

47. The use according to claim 46, wherein the dosage of anti-IL-6R antibody is from 6 to 16 mg/kg/4 weeks or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

48. The use according to claim 47, wherein the dosage of anti-IL-6R antibody is from 6 to 10 mg/kg/4 weeks or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

49. The use according to any one of claims 28 to 30 and claims 33 to 48, wherein said immunosuppressant is methotrexate (MTX).

50. The pharmaceutical composition according to claim 49, wherein the dosage of said MTX is from 1 to 100 mg/body/week.

51. The pharmaceutical composition according to claim 50, wherein the dosage of said MTX is from 4 to 50 mg/body/week.

52. The pharmaceutical composition according to claim 51, wherein the dosage of said MTX is from 7.5 to 25 mg/body/week.

53. The use according to any one of claims 28 to 30 and claims 34 to 52, for simultaneously administering said anti-IL-6 antibody and said immunosuppressant.

54. The use according to any one of claims 28 to 30 and claims 34 to 52, for administering said anti-IL-6 antibody and said immunosuppressant with time interval.

55. A method comprising administering an IL-6 antagonist and immunosuppressants to a patient requiring such a treatment in the method for the treatment of IL-6 related diseases.

56. A method for the effect enhancement on the use of an IL-6 antagonist for the treatment of IL-6 related diseases, comprising administering immunosuppressants and an IL-6 antagonist to a patient requiring such a treatment.

57. A method for the reduction or prevention of allergic reactions upon the treatment of IL-6 related diseases with an IL-6 antagonist, comprising administering immunosuppressants and an IL-6 antagonist to a patient requiring such a treatment.

58. A method comprising administering an IL-6 antagonist anti-IL-6R antibody at a high dose to a patient requiring such a treatment in the method for the treatment of IL-6 related diseases with a high dose administration of an IL-6 antagonist.

59. A method for the reduction or prevention of allergic reaction upon the treatment of IL-6 related diseases, comprising administering a high dose administration of an IL-6 antagonist to a patient requiring such a treatment.

60. The method according to any one of claims 55 to 59, wherein said IL-6 antagonist is an anti-IL-6R antibody.

61. The method according to any one of claims 55 to 59, wherein said anti-IL-6R antibody is a monoclonal antibody against human IL-6R.

62. The method according to any one of claims 55 to 59, wherein said anti-IL-6R antibody is a monoclonal antibody against mouse IL-6R.

63. The method according to any one of claims 55 to 62, wherein said anti-IL-6R antibody is a recombinant antibody.

64. The method according to claim 61, wherein said human anti-IL-6R monoclonal antibody is PM-1 antibody.

65. The method according to claim 62, wherein said mouse anti-IL-6R monoclonal antibody is MR16-1 antibody.

66. The method according to any one of claims 59 to

64, wherein said anti-IL-6R antibody is a chimera antibody, a humanized antibody or a human type antibody against IL-6R.

5 67. The method according to claim 66, wherein said humanized antibody against IL-6R is humanized PM-1 antibody.

10 68. The method according to any one of claims 55 to 67, wherein said IL-6 related diseases are rheumatoid arthritis, plasmacytosis, hyperimmunoglobulinemia, anemia, nephritis, cachexia, multiple myeloma, Castleman's disease, mesangial proliferative nephritis, systemic lupus erythematosus, Crohn's disease, pancreatitis, psoriasis, juvenile idiopathic arthritis, or systematic juvenile idiopathic arthritis.

15 69. The method according to any one of claims 55 to 57 and claims 60 to 68, which is said method for the treatment wherein the immunosuppressant, or anti-IL-6R antibody and the immunosuppressant are administered, wherein a dosage of anti-IL-6R antibody is from 0.02 to 20 150 mg/kg/4 weeks or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

25 70. The method according to claim 69, wherein the dosage of anti-IL-6R antibody is from 0.5 to 30 mg/kg/4 weeks or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

71. The method according to claim 70, wherein the dosage of anti-IL-6R antibody is from 2 to 8 mg/kg/4 weeks or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

30 72. The method according to any one of claims 58 to 68, which is said method for the treatment of IL-6 related diseases or said method for the treatment wherein a high dose of anti-IL-6R antibody is administered comprising administering the high dose of anti-IL-6R 35 antibody, wherein the dosage of anti-IL-6R antibody is 4 mg/kg/4 weeks or more or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

73. The method according to claim 72, wherein the dosage of anti-IL-6R antibody is from 6 to 16 mg/kg/4 weeks or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

5 74. The method according to claim 73, wherein the dosage of anti-IL-6R antibody is from 6 to 10 mg/kg/4 weeks or the dosage showing an anti-IL-6R antibody concentration in blood equivalent thereto.

10 75. The method according to any one of claims 55 to 57 and claims 60 to 74, wherein said immunosuppressant is methotrexate (MTX).

76. The method according to claim 75, wherein the dosage of said MTX is from 1 to 100 mg/body/week.

15 77. The method according to claim 76, wherein the dosage of said MTX is from 4 to 50 mg/body/week.

78. The method according to claim 77, wherein the dosage of said MTX is from 7.5 to 25 mg/body/week.

20 79. The method according to any one of claims 55 to 57 and claims 60 to 78, for simultaneously administering said anti-IL-6R antibody and said immunosuppressant.

80. The use according to any one of claims 55 to 57 and claims 60 to 78, for administering said anti-IL-6R antibody and said immunosuppressant with time interval.

ABSTRACT

5 A pharmaceutical composition for the treatment of
interleukin-6 (IL-6) related diseases, comprising an
interleukin-6 antagonist (IL-6 antagonist) and
immunosuppressants. The IL-6 antagonist is preferably an
antibody to an interleukin-6 receptor (IL-6R).

DESCRIPCION

METODOS PARA TRATAR ENFERMEDADES RELACIONADAS CON **INTERLEUKIN-6**

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

1. Campo de la Invención

La presente invención se relaciona con métodos para el tratamiento de enfermedades relacionadas con interleukin-6 mediante la combinación de un antagonista de interleukin-6 (antagonista IL-6), particularmente un anticuerpo contra el receptor interleukin-6 (IL-6R) (anticuerpo anti-IL-6R) con inmunosupresores y por administración del anticuerpo anti-IL-6R en altas dosis.

2. Arte relacionado

El IL-6 es una citokina también denominada célula B factor-2 estimulante (BSF2) o interferon β 2. El IL-6 fue descubierto como un factor de diferenciación involucrado en la activación de células progenitoras de linfocitos B (Hirano T, et al., Nature, 324: 73-76, 1986), y después de ello ha sido demostrado que la IL-6 es una citokina multifuncional que afecta las funciones de varias células (Akira, S. Et al., Adv. In Immunology, 54: 1-78, 1993). Se ha reportado que el IL-6 induce maduración de las células progenitoras de linfocitos T (Lotz, M. et al., J. Exp. Med., 167: 1253-1258, 1988).

El IL-6 transmite su actividad biológica a través de dos tipos proteínas en las células. Una es el receptor IL-6 el cual es una proteína fijadora ligante con un peso molecular de cerca de 80 kD, a la cual el IL-6 se fija (Taga, T. Et al., J. Exp. Med., 166: 967-828, 1987). El receptor IL-6 también aparece como un receptor IL-6 soluble compuesto principalmente de su región extracelular, en adición a un tipo fijador de membrana que penetra a través de la membrana de la célula y se expresa en la membrana de la célula.

La publicación internacional WO 92/19759 describe varios tipos de anticuerpos anti-IL-6R tales como los anticuerpos anti-IL-6R humanizados y los anticuerpos anti-IL-6R quiméricos. La WO 96/110220 describe el agente terapéutico para la artritis reumatoide y el inhibidor de crecimiento de célula sinovial del cual el principal ingrediente es el antagonista IL-6 tal como el anticuerpo anti-IL-6R. La WO 96/12503 describe el tratamiento de enfermedades atribuidas a la producción de IL-6, tales como nefritis, caquexia, artritis reumatoide , enfermedad del ganadero y nefritis proliferativa mesangial. La WO 98/42377 describe agentes terapéuticos/protectores de enfermedades relacionadas con células T sensibilizadas tales como múltiplo esclerosis, uveítis, tiroiditis crónica, hipersensitividad demorada, dermatitis de contacto y dermatitis atópica, de las cuales el ingrediente activo es el anticuerpo anti IL-6R.

La WO 98/42377 describe los agentes terapéuticos de eritematosa sistémica, de la cual el ingrediente activo es el anticuerpo anti IL-6R. La WO 99/47170 describe el agente terapéutico de la enfermedad de Crohn, del cual el agente activo es el anticuerpo anti IL-6R. La WO 00/10607 describe el agente terapéutico de la pancreatitis, del cual el agente activo es el anticuerpo anti-IL-6R. La WO 02/3492 describe el agente terapéutico de la soriasis , del cual el agente activo es el anticuerpo anti-IL-6R. Adicionalmente, La WO 02/080969 describe el agente terapéutico de la artritis idiopática juvenil , del cual el agente activo es el anticuerpo anti-IL-6R.

RESUMEN DE LA INVENCION

Como se describió antes, varios agentes preventivos o terapéuticos de los cuales el agente activo es el anticuerpo anti-IL-6R han sido conocido. Sin embargo, no se ha conocido los efectos sinérgicos que pueden ser obtenidos de la combinación de anticuerpos anti-IL-6R con inmunosupresores como metotrexato (MTX) puede

reducir o prevenir reacciones alérgicas a los tratamientos de artritis reumatoide con anticuerpo anti-IL-6R, y que el anticuerpo anti-IL-6R en una alta dosis puede reducir o prevenir reacciones alérgicas a los a los tratamientos de artritis reumatoide con anticuerpo anti- IL-6R.

En consecuencia, la presente invención provee una compuesto farmacéutico para el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL- 6, que incorpora un antagonista de interlukin-6 (antagonista IL-6) e inmunosupresores.

La invención también provee un compuesto farmacéutico que incluye inmunosupresores, con el propósito de ampliar la utilidad de un antagonista IL-6 para el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6.

La invención también provee una composición farmacéutica que incorpora imnosupresores , para la prevención o reducción de reacciones alérgicas a los tratamientos de enfermedades relacionadas con IL-6 con antagonistas IL-6.

La invención provee adicionalmente un agente terapéutico para enfermedades relacionadas con IL-6 para administrar en dosis altas, que incluye un antagonista IL-6.

El antagonista IL-6 es preferiblemente un anticuerpo anti-IL-6R. El anticuerpo anti-IL-6R es preferiblemente un anticuerpo monoclonal contra IL-6R. Preferiblemente, el anticuerpo anti-IL-6R es el anticuerpo monoclonal contra el IL-6R humano. O, preferiblemente, el anticuerpo anti-IL-6R es el anticuerpo monoclonal contra el IL-6R de ratón. Preferiblemente, el anticuerpo anti-IL-6R es un tipo de anticuerpo recombinado. Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal anti-IL-R6 humano es, por ejemplo, anticuerpo PM-1. Preferiblemente, el anticuerpo monoclonal anti-IL-R6 de ratón es, por ejemplo, el anticuerpo MR16-1. El anticuerpo puede ser

además un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano contra IL-6R. Un anticuerpo anti-IL-6R específico preferido es, por ejemplo, el anticuerpo humanizado PM-1.

Cuando se combinan el antagonista IL-6, particularmente el anticuerpo anti-IL-6R con el inmunosupresor, la dosificación del antagonista IL-6, particularmente el anticuerpo anti-IL-6R es, por ejemplo, en el caso de infusiones intravenosas, de 0.02 a 150 mg/kg/ 4 semanas o la dosificación que muestre en la sangre una concentración equivalente a ella del anticuerpo anti-IL-6R, preferiblemente de 2 a 8 mg/kg/ 4 semanas o la dosificación que muestre en la sangre una concentración equivalente a ella del anticuerpo anti-IL-6R

Cuando se administra el antagonista IL-6, particularmente el anticuerpo anti-IL-6R en una dosis alta, la dosificación del antagonista IL-6, particularmente el anticuerpo anti-IL-6R es, por ejemplo, en el caso de infusiones intravenosas, no es menos de 4 mg/ kg/ 4 semanas o la dosificación que muestre en la sangre una concentración equivalente a ella del anticuerpo anti-IL-6R, preferiblemente de 6 a 16 mg/kg/ 4 semanas o la dosificación que muestre en la sangre una concentración equivalente a ella del anticuerpo anti-IL-6R, y más preferiblemente de 6 a 10 16 mg/kg/ 4 semanas o la dosificación que muestre en la sangre una concentración equivalente a ella del anticuerpo anti-IL-6R.

Cuando MTX es usado como un inmunosupresor la dosificación de MTX es, por ejemplo, de 1 a 100 mg/cuerpo/semanas o la dosificación que muestre concentraciones en la sangre equivalente a ella de MTX, preferiblemente de 4 a 50 mg/cuerpo/semanas o la dosificación que muestre concentraciones en la sangre equivalente a ella de MTX, y particularmente preferida de 10 a 25 mg/cuerpo/semanas o la dosificación que muestre concentraciones en la sangre equivalente a ella de MTX.

La dosificación que muestra la concentración de droga (es decir, anticuerpo anti-IL-6R, MTX) en la sangre significa una dosis que tiene un efecto terapéutico equivalente, y aún cuando la transición de la concentración en la sangre varía de acuerdo al método de administración tal como inyección intravenosa e inyección subcutánea, es considerada como la dosificación que muestra la concentración de droga (es decir, anticuerpo anti-IL-6R o MTX) en la sangre hasta tanto el efecto terapéutico sea equivalente.

Los ejemplos de enfermedades relacionadas con IL-6 incluyen, enfermedades inflamatorias crónicas agudas y enfermedades autoinmunes: nefritis, nefritis proliferativa mesangial, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, pancreatitis, artritis idiopática juvenil o artritis idiopática juvenil sistémica, vasculitis, enfermedad de kawasaki, artritis reumatoide, eritomatosis sistémica, soriasis, síndrome de sjogren, enfermedad de adultos de Still; enfermedades neoplásicas, mieloma múltiple, enfermedad del ganadero, linfoma maligno, cáncer renal; enfermedades infecciosas: infección con HIV, infección con EBV;

Caquexia:caquexia

Otras. Plasmacitosis, hiperinmunoglobulinemia, anemia y así, y son preferiblemente artritis reumatoide, plasmacitosis, hiperinmunoglobulinemia, anemia, nefritis, caquexia, mieloma múltiple, enfermedad del ganadero, nefritis proliferativa mesangial, eritomatosis sistémica, enfermedad de Crohn, pancreatitis, soriasis, artritis idiopática juvenil o artritis idiopática juvenil sistémica.

El compuesto farmacéutico de la invención puede ser administrado oralmente o parenteralmente y sistemáticamente o tópicamente. Por ejemplo, inyección intravenosa tal como infusión por goteo, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, supositorio, inyección colonica, droga con cubierta entérica oral y similares pueden ser seleccionados, y el método de administración puede ser adecuadamente seleccionado dependiendo de la edad y

la condición del paciente. Los límites superiores e inferiores de la dosificación real están afectados por la frecuencia de la administración, por ejemplo, la dosificación por dosis se incrementa en el caso de largos intervalos de administración mientras que se disminuye en el caso de cortos intervalos de administración.

Para la dosificación preferida y el método de administración del anticuerpo anti-IL-6 receptor, por ejemplo, la cantidad que en forma extendida exista del anticuerpo libre en la sangre es la dosis efectiva. Como ejemplos específicos, hay métodos para administración dividiéndola en una a muchas, por ejemplo, de acuerdo con un programa de administración de dos veces/semana, una vez a la semana, una vez /dos semanas, una vez/ 4 semanas, una vez/ 6 semanas, una vez/ 8 semanas y similares por el método de la inyección intravenosa tal como la infusión por goteo y la inyección subcutánea. El programa de administración puede ser ajustado extendiendo el intervalo de administración de dos veces/semana o una vez a la semana a una vez /dos semanas, una vez/ 3 semanas una vez/ 4 semanas, una vez/ 6 semanas y una vez/ 8 semanas con la observación de la condición del paciente y los cambios en los datos de laboratorio de la sangre.

Cuando se administra en combinación con MTX , la dosificación de el anticuerpo anti-IL-6R es típicamente, por ejemplo, en el casos de los tratamientos de la artritis reumatoide, es de mas de 0.5 mg/kg por semana o la dosis que muestre un efecto equivalente o mas anti-reumático. Por ejemplo, cuando la administración intravenosa es realizada una vez en cuatro semanas, la dosificación es de 0.2 a 150 mg/kg, preferiblemente de 0.5 a 30 mg/kg, y mas preferiblemente de 2 a 8 mg/kg.

El anticuerpo anti-IL-6R y el inmunosupresor son administrados simultáneamente o con un intervalo de tiempo.

El inmunosupresor también involucra agentes anti-reumáticos, agentes hormonas adrenocorticales y similares, e incluyen, por ejemplo, las siguientes drogas.

A. Inmunosupresores, agentes anti-reumáticos,

Agentes hormonas adrenocorticales

Inmunosupresores

Agentes alquilantes

Ciclofosfamida

Antagonistas metabólicos

Azatioprina, metotrexato, mizoribina.

Inhibidores de actividad de células T

Ciclosporina, tacrolimus

Agentes anti-reumáticos:

Hidroxiclороquina, sulfasalazina, leflunomida, etanercept, infliximab, adalimumab, penicilamina-D, compuestos de oro oral, compuestos de oro inyectable (inyección intramuscular), minociclina, tiomalato de oro sódico, auronofina, penicelamina-D, lobenzarit, bucilamina, actarit;

Agentes hormona adrenocorticales

Cortisona, hidrocortisona

Fosfato sódico de hidrocortisona, succinato sódico de hidrocortisona, acetato de fludhidrocortisona

Prednisolona, prednisolones

Prednisolona, succinato sódico de prednisolona, fosfato sódico de prednisolona, acetato de halopredona.

Metil prednisolonas

Metil prednisolona, acetato de metil prednisolona, succinato sódico de metil prednisolona

Triamcinolonas

Triamcinolona, acetato de triamcinolona, actinida de triamcinolona

Dexametasonas

Dexametasona , acetato de dexametasona, fosfato sódico de dexametasona, palmitato de dexametasona.

Betametasonas

Betametasona (fosfato sódico de betametasona) betametasoba, fosfato sódico de betametasona

Parametasonas

Acetato de parametasona

La dosificación de inmunosupresores es, por ejemplo cuando MTX es combinada para un tratamiento de artritis reumatoide, por ejemplo en el caso de una administración oral, de 1 a 100 mg/ cuerpo por semana, preferiblemente de 4 a 50 mg, y más preferiblemente de 7.5 a 25 mg /cuerpo.

También, una alta dosificación del anticuerpo anti-IL-6R significa la dosificación capaz de prevenir o reducir la reacción alérgica, la cual es igual o mayor a la dosis mínima efectiva para el tratamiento de enfermedades relacionados con IL-6. Por ejemplo, en el tratamiento de artritis reumatoide, cuando una fusión por goteo intravenoso es administrada cada cuatro semanas, la dosis implica 4 mg/kg o más, preferiblemente de 6 a 16 mg/kg, y más preferiblemente de 6 a 10 mg/kg.

El método de administración anterior, intervalo, y dosificación son muestras de ejemplos preferidos, y el método de administración, intervalo, y dosificación que muestre efectos terapéuticos similares puede ser adecuadamente seleccionado. Por ejemplo, es posible seleccionar el método de administración, intervalo, y dosificación que muestre efectos similares a los de los ejemplos preferidos anteriores mediante la medición de la concentración de las distintas medicinas en la sangre. La invención incluye el método de administración, intervalo y dosificación que alcance la concentración equivalente en la sangre de los ejemplos anteriores.

METODO PARA LLEVAR A CABO EL INVENTO

El antagonista IL-6 usado en la invención puede ser usado sin consideración a su origen, tipo y forma mientras que exhiba los efectos preventivos y terapéuticos sobre las enfermedades relacionadas con IL-6.

Los antagonistas IL-6 son sustancias que inhiben la actividad biológica de IL-6. Los antagonistas IL-6 son preferiblemente sustancias que tienen un efecto inhibidor sobre la fijación de cualquiera IL-6, IL-6R o gp130. Los antagonistas IL-6, incluyen el anticuerpo anti-IL-6R, o las péptidas parciales de IL-6 o IL-6R, así como sustancias de bajo molecular que exhiben una actividad similar a ellos.

El anticuerpo anti-IL-6R usado en la invención puede ser obtenidos como anticuerpos policlonales o monoclonales usando los métodos conocidos en el arte. Así el anticuerpo anti-IL-6 usado en la invención, es el anticuerpo monoclonal derivado de animales mamíferos. Los anticuerpos monoclonales derivados de animales mamíferos incluyen aquellos en hibridomas producidos, y aquellos producidos en células anfitrionas transformadas con vectores de expresión que contienen el gen del anticuerpo mediante técnicas de ingeniería genética. Este anticuerpo inhibe la fijación de IL-6 a IL-6 receptor mediante la fijación a IL-6 al bloque señalador de actividad biológica de IL-6 dentro de células.

Tales anticuerpos incluye MH166 (Matsuda, T et al, Eur. J. Immunol., 18: 951-956, 1988) y SK2 (Sato, K. Et al., The 21 st Proceedings of The Japanes Society for Immunology, 21:166,1991).

Los hibridomas que producen el anticuerpo anti-IL-6 pueden se preparados básicamente mediante la tecnología conocida en el arte como sigue a continuación. Esto es, los hibridomas pueden ser elaborados realizando

inmunización usando IL-6 como un antígeno sensitizado de acuerdo al método estándar de inmunización, fusionando las células inmunizadas resultantes a células parentales conocido en el arte como el método de fusión de células estándar, y separando las células que producen el anticuerpo monoclonal por el método estándar de separación.

Específicamente, el anticuerpo anti-IL-6 puede ser hecho como sigue. Por ejemplo, el IL-6 humano usado como el antígeno sensitizado para obtener el anticuerpo puede ser obtenido usando la secuencia amino ácida del gen de IL-6 expuesta en Eur. J. Biochem., 168: 543 –550, 1987; J. Immunol., 140:1534-1541, 1988; o Agr. Biol. Chem., 54:2685-2688, 1990.

La secuencia del gen de IL-6 es insertada en el vector de expresión conocido en el arte, que transforma las células anfitrionas apropiadas, subsecuentemente, la proteína IL-6 objetivo puede ser usada como un antígeno sensitizado. También, la proteína de fusión de la proteína de IL-6 con la otra proteína puede ser usada como el antígeno sensitizado.

El anticuerpo receptor anti-IL-6 usado en la invención puede ser obtenido como un anticuerpo policlonal o monoclonal usando medios conocidos en el arte. Como el anticuerpo receptor anti-IL-6 usado en la invención, el anticuerpo monoclonal derivado de los animales mamíferos es el preferido. El anticuerpo monoclonal derivado de los mamíferos incluye aquellos en hibridomas producidos, y aquellos producidos en células anfitrionas transformadas con vectores de expresión que contienen el gen del anticuerpo por técnicas de ingeniería genética. Este anticuerpo inhibe la fijación de IL-6 al receptor IL-6 mediante la fijación a un receptor IL-6 al bloque señalador de actividad biológica de IL-6 en las células.

Tales anticuerpos incluyen el anticuerpo MR16-1 (Tamura, T. Et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11924-11928, 1993), el anticuerpo PM-1 (Hirata, Y. et al., J. Immunol., 143: 2900-2906, 1989), el anticuerpo AUK-12-20, el anticuerpo AUK64-7 o el anticuerpo AUK146-15 (Publicación de Aplicación Internacional de Patente No WO 92-19759). Entre ellos, el anticuerpo preferido incluye el anticuerpo PM-1.

La línea de células de hibridoma que produce el anticuerpo PM-1 como PM-1 ha sido internacionalmente depositada en el Depósito de Organismos de Patentes Internacionales (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki Pref.) con base en el Tratado de Budapest como FERM BP-2998 en julio 12, 1989. La línea de células de hibridoma que produce MR16-1 ha sido internacionalmente depositada en el Depósito de Organismos de Patentes Internacionales (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki Pref.) con base en el Tratado de Budapest como FERM BP- 5875 en marzo 13 12, 1997.

Los hibridomas que producen el anticuerpo monoclonal receptor anti-IL-6 pueden ser hechos básicamente usando la tecnología conocida en el arte como sigue. Esto es, los hibridomas pueden ser hechos realizando inmunización usando el receptor IL-6 como un antígeno sensitizado de acuerdo al método estándar de inmunización, fusión de las células inmunizadas resultantes a células parentales conocido en el arte como el método estándar de fusión de células, separando las células que producen el anticuerpo monoclonal por el método estándar de separación.

Específicamente, el anticuerpo receptor anti-IL-6 puede ser hecho como sigue. Por ejemplo, receptores IL-6 humanos usados como anticuerpos sensitizados para obtener el anticuerpo pueden ser obtenidos usando secuencias amino ácidas/ gen

receptor IL-6 expuestas en La Publicación de Aplicación de Patentes Europea No EP325474 y JP-A-3-155795, respectivamente.

La proteína del receptor IL-6 tiene dos tipos, es decir, uno expresado en las células y otro disociado de la membrana de la célula (receptor IL-6 soluble) (Yasukawa, K. Et al., J. Biochem., 108:673-676). El receptor IL-6 soluble esta sustancialmente compuesto de una región extracelular del receptor IL-6, y es diferente del receptor IL-6 fijador de membrana en cuanto que carece de una región transmembrana o regiones transmembrana e intracelulares. Ambas proteínas receptor IL-6 pueden ser usadas siempre que sean usadas como el antígeno sensitizado para la producción del anticuerpo receptor anti-IL-6 usado en la invención.

La secuencia genética del receptor IL-6 es insertada dentro del vector de expresión conocido en el arte, el cual transforma las células anfitrionas apropiadas, subsecuentemente, la proteína receptor IL-6 objetivo es purificada de otras células o del flotante del cultivo por métodos conocidos en el arte, y la proteína receptor IL-6 purificada puede ser usada como un antígeno sensitizado. También, las células que expresan el receptor IL-6 y la proteína de fusión de la proteína receptor IL-6 con la otra proteína pueden ser usadas como antígeno sensitizado.

El E.coli que contiene plasmido, pIBBSF2R que incluye cDNA que codifica el receptor IL-6 humano como HB101-pIBBSF2R ha sido internacionalmente depositado en el Depósito de Organismos de Patentes Internacionales (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki Pref.) con base en el Tratado de Budapest como FERM BP-2232 en junio 19, 1988.

El anticuerpo anti-gp130 usado en la invención puede ser obtenido como un anticuerpo policlonal o monoclonal usando medios conocidos en el arte. Del anticuerpo anti-gp130 usado en la invención, el anticuerpo monoclonal derivado de los animales mamíferos es el preferido incluyendo aquellos en hibridomas producidos, y aquellos producidos en células anfitrionas transformadas con vectores de expresión que contienen el gen del anticuerpo mediante técnicas de ingeniería genética. Este anticuerpo inhibe la fijación IL-6/complejo receptor IL-6 a gp130 mediante la fijación a gp130 al bloque señalador de actividad biológica de IL-6 en la células.

Tales anticuerpos incluyen anticuerpo AM64 (JP-A-3-219894), el anticuerpo 4B11 y el anticuerpo 2H4 (US 5571513), el anticuerpo B-S12 y el anticuerpo B-P8 (JP-A-8-291199).

Los hibridomas que producen el anticuerpo monoclonal anti-gp130 pueden ser hechos básicamente usando la tecnología conocida en el arte como sigue. Esto es los hibridomas pueden ser hechos realizando inmunización usando gp130 como un antígeno sensitizado de acuerdo con el método estándar de inmunización, fusión de las células inmunizadas resultantes a células parentales conocido en el arte como el método estándar de fusión de células, separando las células que producen el anticuerpo monoclonal por el método estándar de separación.

Específicamente, el anticuerpo monoclonal puede se hecho como sigue. Por ejemplo, el gp130 usado como el antígeno sensitizado para obtener el anticuerpo puede ser obtenido usando las secuencias amino del gene gp130 expuesta en la Publicación de Aplicaciones de Patente Europea No EP 411946.

La secuencia genética del gp130 es insertada en el sistema vector de expresión conocido en el arte, el cual trasforma las células anfitrionas apropiadas.

subsecuentemente, la proteína gp130 objetivo es purificada de células o del flotante del cultivo por métodos conocidos en el arte, y la proteína gp130 purificada puede ser usada como un antígeno sensitizado. También, las células que expresan gp130 y la proteína de fusión de la proteína gp130 con la otra proteína pueden ser usadas antígenos sensitizados.

Mamíferos inmunizados con el antígeno sensitizados no son particularmente limitados, pero preferiblemente seleccionados en consideración a la compatibilidad con las células parentales usadas para la fusión de células. En general lo roedores tales como ratones, ratas y hamsters son usados.

La inmunización de los animales con el antígeno sensitizado es realizada de acuerdo a métodos conocidos en el arte. Como método general, se realiza inyectando el antígeno sinsetizado al animal intraperitonealmente o subcutáneamente. Específicamente, es preferido que el antígeno sensitizado sea apropiadamente diluido y suspendido con PBS (solución salina amortiguadora de fosfato) o solución salina, la cual es mezclada con una cantidad apropiada de adyuvante estándar, es decir, adyuvante completo de Freund para ser emulsificado y subsecuentemente administrado al mamífero varias veces con un intervalo de 4 a 21 días. También, un vehículo apropiado puede ser usado para la inmunización con el antígeno sensitizado.

El animal es inmunizado en esta forma y se confirma que los niveles del anticuerpo deseado son incrementados en el suero. Subsecuentemente, las células inmunizadas son removidas del mamífero, y son comprometidas para la fusión celular. Preferiblemente las células inmunizadas comprometidas para la fusión celular incluyen particularmente células del bazo.

Para las células de mieloma de los mamíferos como células parentales socias fusionadas con las células inmunizadas arriba, líneas de células ya conocidas en el arte, es decir, P3X63Ag8.653 (Kearly, J.F. et al., J. Immunol., 123: 1548-1550, 1979), P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology, 81:1-7, 1978), NS-1 (Kohler, G. And Milstein, C., Eur. J. Immunol., 6:511-519, 1976), MOC-11 (Margulies D.H et al., Cell, 8:405-415, 1976), SP2/0 /Shulman, M. et al., Nature , 276: 269-270, 1978), FO (de St. Groth, S.F. et al., J. Immunol., Methods, 35:1-21, 1980), S194 (Trowbridge, I.S J. Exp. Med. 148:311-323, 1978), R210 (Galfre, G. Et al., Nature, 277:131-133, 1979) son usadas apropiadamente.

La fusión celular de las células inmunizadas arriba con células de mieloma puede ser realizada básicamente de acuerdo a los métodos conocidos en el arte, es decir, Método de Milstein (Kohler G. and Milstein C., Methods Enzymol., 73:3-46, 1981).

Mas específicamente, la fusión celular anterior es realizada, por ejemplo, en el medio nutriente de cultivo estándar en la presencia de un acelerador de fusión de células. Como acelerador de fusión de células, por ejemplo, son usados polietilenoglicol (PEG), virus Sendai (HVJ) y similares, y un agente auxiliar tal como dimetilsulfoxido puede ser adicionalmente adicionado/usado como se desee con el propósito de incrementar la eficiencia de la fusión.

Una razón usada de células inmunizadas a células de mieloma es preferiblemente, por ejemplo, 1 a 10 veces de células inmunizadas a células de mieloma. Como medio usado para la anterior fusión celular, el uso de medio RPMI 1640, medio MEM adecuado para el crecimiento de la línea de células de mieloma y otros medios estándar usados para este tipo de cultivo de células es posible, y suplemento adicional de suero tal como el suero de feto de ternero (FSC) puede ser combinado.

Para la fusión celular, las células fusionadas objetivo (hibridomas) son formadas por una rigurosa mezcla de las células inmunizadas arriba con las células de mieloma en las cantidades dadas en el medio de arriba, adicionando solución PEG, es decir, solución PEG con un peso molecular promedio de cerca de 1000 a 6000 precalentada a 37 °C en una concentración estándar de 30 a 60 % (w/v), y mezclado. Subsecuentemente, un agente de fusión celular y similares los cuales no son preferidos para el crecimiento de los hibridomas pueden ser removidos mediante la repetición de la manipulación de secuencialmente adicionar el medio apropiado y remover el flotante por centrifugado.

Los hibridomas son seleccionados mediante cultivo en un medio de selección estándar, es decir, medio HAT (medio que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo en el medio HAT es mantenido típicamente de varios días a varias semanas, suficiente periodo de tiempo hasta que las celdas distintas de los hibridomas objetivo (células no-fusionadas) se mueren. Luego el método de dilución estándar es realizado, y los hibridomas que producen el anticuerpo objetivo son separados y clonados.

También en adición a la obtención del hibridoma de arriba por inmunización animal diferente a la humana con el antígeno, los anticuerpos humanos deseados que tienen actividad fijadora del antígeno deseado o células que expresan el antígeno pueden ser obtenidas por sensitización de linfocitos humanos con la proteína antígeno o las células que expresan el antígeno in vitro, y fusionando los B linfocitos sensitizados con células de mieloma humano, por ejemplo, U266 (ver JP-B-159878). Mas aún, el antígeno o las células que expresan el antígeno pueden ser administrada a animales transgénicos que tienen un repertorio de genes de anticuerpos humanos para obtener el anticuerpo humano deseado de acuerdo al método descrito arriba (Ver Publicaciones de Patentes Internacionales



Nos. WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94702602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735).

El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal hecho de esta manera puede ser cultivado en un medio de cultivo estándar, y también puede ser almacenado en nitrógeno líquido por una largo tiempo.

Con el propósito de obtener el anticuerpo monoclonal de los hibridomas, es empleado el método donde los hibridomas son cultivados de acuerdo al método estándar y el anticuerpo monoclonal es obtenido como el flotante del cultivo, o el método donde los hibridomas son propagados por administración de ellos a mamíferos compatibles y el anticuerpo monoclonal es obtenido como sus ascitas. El primer método es adecuado para obtener el anticuerpo con alta pureza, y el último método es adecuado para producir el anticuerpo a gran escala.

Por ejemplo, la producción del hibridoma que producen el anticuerpo receptor anti-IL-6 puede ser realizada por el método expuesto en JP-A-3-139293. El método donde las hibridomas que producen el anticuerpo PM-1 internacionalmente depositado en el Depósito de Organismos de Patentes Internacionales (AIST Tsukuba Central 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba-shi, Ibaraki Pref.) como FERM BP-2998 en julio 12, 1989, con base en el Tratado de Budapest son inyectadas intraperitonealmente a ratón BALB/c para obtener las ascitas y el anticuerpo PM-1 es purificado de estas ascitas puede ser realizado. También, el método donde los hibridomas presentes son cultivadas en el medio apropiado, por ejemplo, medio RPMI 1640, medio SFM hibridoma (suministrado por GIBCO-BRL), medio PFHM-II (suministrado por GIBCO-BRL) que contiene 10% de suero de feto de ternero y 5% de BM-condimed H1 (suministrado por Boehringer Mannheim) y el anticuerpo PM-1 es purificado del flotante del cultivo puede ser realizado.

En la invención, como el anticuerpo monoclonal, es posible usar anticuerpos del tipo recombinado producidos por clonación del gen del anticuerpo de los hibridomas, insertando el gen en el vector apropiado, introduciéndolo en la anfitriona y utilizando tecnología de ingeniería genética (ver, por ejemplo, Borebaeck, C.A.K. and Larrick, J.M., *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, publicado en el Reino Unido por Macmillan Publishers Ltd., 1990).

Específicamente, mRNA que incorpora la región variable (V) del anticuerpo es aislado de las células que producen el anticuerpo objetivo, es decir, las hibridomas. Para el aislamiento de mRNA, RNA total es preparada por los métodos conocidos en el arte, es decir, el método ultracentrífugo guanidina (Chirgwin, J.M. et al., *Biochemistry*, 18: 5294-5299, 1979), el método AGPC (Chomczynski, P. Et al., *Anal. Biochem.*, 162: 156-159, 1987) y el mRNA es preparado mediante el uso del equipo de Purificación de mRNA (suministrado por Pharmacia). También, mRNA puede ser directamente preparado por el usos del equipo de purificación de mRNA QuickPrep (suministrado por Pharmacia).

cDNA de la región V del anticuerpo es sintetizado del mRNA resultante de usar transcriptasa reversa. La síntesis de cDNA puede ser realizada usando el Equipo de Síntesis de cDNA de Primer-Strand de Transcriptasa Reversa AMV y similares. También, el equipo 5' Ampli-FINDER RACE (suministrado por Clontech) y el 5'- Método RACE usando PCR (Frohman, M. A eta al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85:8998-9002, 1998; Belyavsky A et al., *Nucleic Acids Res.*, 17:2919-2932, 1989) pueden ser usados para sintetizar y amplificar cDNA. El fragmento de DNA objetivo es purificado del producto resultante PCR, y lagado al vector DNA. Además, un vector de recombinante es hecho para esto, el cual es introducido en el E. Coli, y las colonias son seleccionadas para preparar el vector recombinante. La secuencia base del DNA objetivo es confirmada por un método conocido en el arte, es decir, el método deoxi.

Si el DNA que codifica la región V del anticuerpo objetivo es obtenida, esta es ligada a DNA que codifica la región constante (región C) del anticuerpo deseado, y luego es incorporado en el vector de expresión. O el DNA que codifica la región V del anticuerpo puede ser incorporada dentro del vector de expresión que contiene la región C del anticuerpo.

Para producir el anticuerpo usado en la invención, el gen del anticuerpo es incorporado dentro del vector de expresión hasta que se exprese bajo las regiones de regulación de expresión como un amplificador y promotor como se describe más tarde. Luego, las células anfitrionas pueden ser transformadas con este vector de expresión para expresar el anticuerpo.

En la invención, anticuerpos recombinados de genes modificados artificialmente, es decir, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos humanos pueden ser usados para el propósito de reducir la antigenicidad alogénica de humanos. Estos anticuerpos modificados pueden ser hechos usando los métodos conocidos.

Los anticuerpos quiméricos pueden ser obtenidos por ligazón del DNA que codifica la región V del anticuerpo obtenida como arriba al DNA que codifica la región C del anticuerpo humano e incorporando esto dentro del vector de expresión para ser introducido a un anfitrión para producir (ver Publicación de Aplicación de Patentes Europea No EP 125023, Publicación de Aplicación de Patentes Internacionales No WO 92/19759). Usando estos métodos conocidos, el anticuerpo quimérico útil para la invención puede ser producido.

Por ejemplo, los plasmidos que contienen DNA que codifica las regiones V de las cadenas L y H del anticuerpo quimérico Pm-1 fueron nombradas pPM-k3 y pPM-

h1, respectivamente, y el E. Coli que tiene estos plásmidos ha sido internacionalmente depositado en la Colección Nacional de Industria, Alimentos y Bacterias Marinas Limited (23 St. Marchar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Scotland, United Kingdom) como NCIMB 40366 y NCIMB 40362, respectivamente en febrero 12, 1991 en base al Tratado de Budapest.

Los anticuerpos humanizados son también referidos como anticuerpos humanos reformados, son aquellos en los cuales la región determinante complementaria (CDR) del anticuerpo de mamíferos diferentes a humanos, ejemplo, ratón es transplantado en la región determinante complementaria del anticuerpo humano, y su método general de recombinación genética ha sido conocido (ver Publicación de Aplicación de Patentes Europea No EP 125023, Publicación de Aplicación de Patentes Internacionales No WO 92/19759).

Específicamente, la secuencia de DNA diseñada para unir el CDR del anticuerpo del ratón a la región marco (FR) del anticuerpo humano es sintetizada por PCR de numerosos oligonucleótidos hechos para tener una región de translapo en el terminal. El DNA resultante es ligado al DNA que codifica la región C del anticuerpo humano, luego es incorporada en el vector de expresión, el cual es introducido en el anfitrión para producir el anticuerpo humanizado (ver Publicación de Aplicación de Patentes Europea No EP 239400, Publicación de Aplicación de Patentes Internacionales No WO 92/19759).

Como FR del anticuerpo humano ligado vía el CDR aquellos son seleccionados donde las regiones determinantes complementarias forman un buen sitio de fijación de antígenos. Los amino ácidos en la región marco de la región variable del anticuerpo pueden ser sustituidos como sea necesario tal que la región determinante complementaria del anticuerpo humano reformado forme un sitio de fijación de antígeno adecuado (sato, K et al., Cancer Res., 53: 851-856, 1993).

La región C del anticuerpo humano es usada para el anticuerpo quimérico y el anticuerpo humanizado. La región C del anticuerpo humano incluye Cy, y por ejemplo, Cy₁, Cy₂, Cy₃ o Cy₄ pueden ser usadas. La región C del anticuerpo humano puede ser modificada para mejorarla estabilidad del anticuerpo o la producción de él.

El anticuerpo quimérico esta compuesto de la región variable del anticuerpo derivado de los mamíferos diferentes a los humanos y la región C derivada del anticuerpo humano. El anticuerpo humanizado esta compuesto de la región determinante complementaria del anticuerpo derivado de los mamíferos diferentes a los animales y la región marco y la región C derivada del anticuerpo humano. En consecuencia, estos han reducido la antigenicidad en el cuerpo humano y así son útiles como el anticuerpo usado en la invención.

Ejemplos específicos preferidos del anticuerpo humano usado en la invención incluyen el anticuerpo PM-1 humanizado (ver Publicación de Aplicación de Patentes Internacionales No WO 92-19759).

También, como métodos para obtener el anticuerpo humano, la tecnología para obtener el anticuerpo humano por panning usando las bibliotecas de anticuerpos humanos es conocida en adición a los métodos descritos arriba. Por ejemplo, la región variable del anticuerpo humano puede ser expresada sobre la superficie de phages como un anticuerpo de cadena simple (scFv) por el método del desplegado phage, y la fijada del phage al antígeno puede ser seleccionada. Cuando el gen del phage seleccionado es analizado, la secuencia de DNA que codifica la región variable del anticuerpo humano fijada al antígeno puede ser determinada. Si la secuencia de DNA del scFv fijado al antígeno es demostrada, la secuencia puede ser hecha por un vector de expresión adecuado para obtener el

anticuerpo humano. Estos métodos han sido ya bien conocidos y es posible citar WO 92101047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11263, WO 93/19172, WO 95/01438 Y WO 95/15398.

El gen del anticuerpo construido como se describió arriba puede ser expresado y obtenido por los métodos conocidos en el arte. En el caso de células de mamíferos, el gen del anticuerpo puede ser expresado por el DNA que es comúnmente un promotor útil, el gen del anticuerpo a ser expresado, y la señal Poli A 3' corriente abajo en consecuencia son funcionalmente fijados, o por el vector que los contiene. Por ejemplo, el promotor/ amplificador puede incluir el promotor /amplificador temprano inmediato citomegalovirus humano.

También, como el otro promotor/amplificador capaz de ser usado para la expresión del anticuerpo usado en la invención el promotor/amplificador viral de retrovirus, virus polioma, adenovirus, virus simian 40(SV40), y el promotor/amplificador derivados del factor de elongación humano de células mamíferas 1 α (HEF1 α) puede ser usado.

Por ejemplo, la expresión puede ser realizada de acuerdo al método de Mulligan et al (Mulligan, R. C et al., Nature, 277: 108-114, 1979) en el caso de usar promotor /amplificador SV40, o el método de Mizushima et al (Mizushima, S and Nagat, S., Nucleic Acids Res., 18:5322, 1980) en el caso de usar el promotro/amplificador HEF1 α .

En el caso de E. Coli, el gen puede ser expresado mediante la fijación funcional de un promotor comúnmente usado, una secuencia señal para la secreción de antígeno y el gen del antígeno a ser expresado. Por ejemplo, los promotores pueden incluir promotor lacZ y promotor araB. El método de Ward et al (Ward, E. S et al., Nature, 341:544-546, 1989); Ward, E. S et al., FASEB J., 6:2422-2477,

1992) y el método de Better et al (Better, M. et al, Science, 240;1041-1043, 1988) pueden ser usados en los casos de usar promotor lacZ y promotor araB respectivamente.

Como la secuencia señal para la secreción de anticuerpo, la secuencia señal pelB (Lei, S.P et al., Bacteril., 169:4379-4383, 1987) puede ser usada en el caso de la producción en periplasma de E. coli. El anticuerpo producido en el periplasma es aislado, y subsecuentemente usado mediante la redoblada apropiada de la estructura del anticuerpo (ver, por ejemplo, WO 96/30394).

Esos derivados de SV40, virus polio, adenovirus, virus papiloma de bovino (BPV) pueden ser usados como un origen de replicación. Adicionalmente, para la amplificación del número de copia del gen en el sistema de la célula anfitriona, el vector de expresión puede incluir gen de fosfotransferasa aminoglicosida (APH), gen de kinasa timidina (TK), gen de transferasa fosforibosil guanina xantina de E. Coli, gen de reductasa (dhfr) dihidrofolato y similares como marcadores de selección.

Para la producción del anticuerpo usado en la invención un sistema de producción opcional puede ser usado. Hay sistemas de producción in vitro y en vivo para hacer el anticuerpo. El sistema de producción in vitro incluye el sistema de producción que usa celdas eucariotas y el sistema de producción que usa células prokariotas.

En el caso de usar células eucariotas, hay los sistemas de producción que usan células de animales, células de plantas o células de hongos. Como células de animales, (1) células de mamíferos, es decir, CH, COS, mieloma, BHK (riñón de hamster bebé), Hela, Vero, etc., (2) células de anfibios, por ejemplo, oocitos de xenopus, o (3) células de insectos, por ejemplo, sf9, sf21, Tn5, etc son conocidas.

Como células de plantas, las células derivadas del *Nicotiana tabacum* es conocida y esto puede ser cultivado como callos. Como células de hongos, levadura, por ejemplo, genus *Saccharomyces* por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, y Filamentos, por ejemplo, genus *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus niger* es conocido.

En el caso de usar células prokarióticas, hay sistemas de producción que usan células de bacterias. Como células de bacterias, *E. Coli* y *Bacillus subtilis* son conocidas.

El anticuerpo puede ser obtenido introduciendo el gen anticuerpo objetivo dentro de estas células por transformación y cultivo de la célula transformada en vitro. El cultivo es realizado de acuerdo con los métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, DMEM, MEM, RPMI 160 y IMDM pueden ser usados como el medio, y el suplemento de suero como el suero de feto de ternero (FCS) puede ser también combinado. El anticuerpo puede ser producido en vivo transfiriendo las células en las cuales el gen del anticuerpo es introducido dentro de la cavidad peritoneal del animal.

De otra parte, los sistemas de producción en vivo incluyen los sistemas de producción que usan animales y los sistemas de producción que usan células de plantas. En el caso de usar células animales, hay sistemas de producción que usan células de mamíferos e insectos.

Como los animales mamíferos, un chivo, cerdo, oveja, ratón, ganado vacuno y similares pueden ser usados (Vicki Glase, Spectrum Biotechnology Applications, 1993) También, como insectos, un gusano de seda puede ser usado. En el caso de usar plantas, por ejemplo, el tabaco puede ser usado.

El gen del anticuerpo es introducido dentro de estos animales o plantas, el anticuerpo es producido en el cuerpo del animal o planta, y es recogido. Por ejemplo, el gen del anticuerpo es preparado como un gen de fusión insertando en la zona media del gen que involucra la proteína producida inherentemente en la leche tal como la caseína β del chivo. El fragmento de DNA que contiene el gen de fusión insertado en el gen de anticuerpo es inyectado dentro de un embrión de chivo, el cual es transferido a una chiva hembra. El anticuerpo deseado es obtenido de la leche del chivo transgénico nacido de la chiva que recibió el embrión o las progenies de ellos.

Hormonas apropiadas pueden ser usadas para el chivo transgénico para incrementar la cantidad de leche que contiene el anticuerpo deseado (Ebert, K. M et al., *Bio/Technology*, 12:699-702, 1994).

En el caso de usar gusanos de seda, los gusanos de seda son infectados con baculovirus insertado en el gen del anticuerpo objetivo, y el anticuerpo deseado es obtenido de los fluidos del cuerpo de estos gusanos de seda (Maeda, S et al., *Nature*, 315:592-594, 1985). Mas aún, en el caso de usar tabaco, el gen del anticuerpo objetivo es insertado dentro de vectores de expresión de la planta, por ejemplo, pMOM 530, y este vector es introducido dentro de bacterias tales como *Agrobacterium tumefaciens*. El tabaco, tal como el *Nicotiana tabacum*, es infectado con estas bacterias , y el anticuerpo deseado es obtenido de las hojas de este tabaco (Julian, K. C., Ma, et al., *Eur. J. Immunol.*, 24:131-138, 1994).

Cuando el anticuerpo es producido en el sistema de producción in vitro o en vivo como se describió arriba, el DNA que codifica la cadena pesada del anticuerpo (cadena H) o la cadena ligera (cadena L) puede ser separadamente incorporado dentro del vector de expresión, el cual puede simultáneamente transformar el anfitrión, o el DNA que codifica la cadena H y la cadena L son incorporados dentro

de un vector de expresión singular, el cual puede transformar el anfitrión (ver Publicación de Aplicación de Patentes Internacionales No. WO 94-11523).

El Anticuerpo usado en la invención puede ser fragmentos del anticuerpo o modificaciones de el hasta tanto el anticuerpo sea adecuado para el uso. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo incluye, por ejemplo, Fab, $F(ab')^2$, Fv, o Fv de cadena singular (scFv) donde Fv de las cadenas H y L son unidos por una unión apropiado.

Específicamente, el anticuerpo es tratado con enzimas, tales como papaína, pepsina, para generar los fragmentos de anticuerpo, o el gen que incluye el fragmento de anticuerpo es construido, y este es introducido dentro del vector de expresión, el cual es expresado en un células anfitrionas adecuadas (ver, por ejemplo, Co, M. S, et al., J. Immunol., 152:2698-2976, 1994; Better, M. & Horwitz, A. E., Methods in Enzymology, 178:476-496, 1989; Pkueckthun, A & Skerra, A., methods in Enzymology, 121:652-663, 1989; Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology, 121:663-66, 1989; Bird, R. E, et al., TIBETECH, 9:132-137, 1991).

Ligando la región V de la cadena H a la región V de la cadena L, se obtiene scFV. En este scFV, la región V de la cadena H y la región V de la cadena L son preferiblemente unidos a través de una unión, preferiblemente una unión péptido (Huston, J. S et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883, 1988). La región V de la cadena H y la región V de la cadena L en scFV pueden ser derivadas de cualquiera de los anticuerpos descritos arriba. Como la unión péptido que une las regiones V, se usa, por ejemplo, una péptido de cadena singular dada compuesta 12 a 19 residuos de amino ácidos.

El DNA que codifica scFV es obtenido por amplificación de la porción de DNA que codifica la secuencia amino ácida deseada en el DNA que codifica la cadena H o

la región V de la cadena H y la cadena L o la región V de la cadena L del anticuerpo anterior, los cuales son usados como plantillas usando primers que definen los dos extremos de ellos por el método de PCR, luego además por amplificación del DNA que codifica la porción de unión péptido y los dos extremos de ellos combinando un par de primers definidos para ser unidos a las cadenas H y L.

Tan bien, una vez el DNA que codifica el scFV es hecho, el vector de expresión que los contiene, y el anfitrión transformado con el vector de expresión pueden ser obtenidos de acuerdo con métodos estándar, y scFV puede ser obtenido usando el anfitrión de acuerdo a métodos estándar.

Para estos fragmentos de anticuerpo, sus genes pueden ser obtenidos, expresados y producidos por los anfitriones como con los de arriba. El "anticuerpo" al que hace referencia en la invención incluye estos fragmentos de anticuerpo.

Como modificación del anticuerpo, es también posible usar el anticuerpo fijado a varias moléculas tales como polietilenglicol (PEG). El "anticuerpo" al que se refiere esta invención incluye estos anticuerpos modificados, ellos pueden ser obtenidos mediante modificaciones químicas al anticuerpo obtenido. Estos métodos han ya sido establecidos en el arte.

El anticuerpo producido y expresado como arriba puede ser aislado desde el interior y exterior de células y el anfitrión, y purificado para que sea homogéneo. El aislamiento y purificación del anticuerpo usado en la invención puede ser realizado por cromatografía de afinidad. La columna usada en la cromatografía de afinidad incluye, por ejemplo, columna de proteína A y columna de proteína G. Los vehículos usados para la columna de proteína A incluyen Hyper D, POROS,

Sepharose F.F y similares. Los otros métodos de aislamiento/purificación usados para proteínas normales pueden ser usados, y los métodos no son limitados de ninguna manera.

Por ejemplo, el anticuerpo usado en la invención puede ser aislado y purificado seleccionando apropiadamente y combinando cromatografía diferente de la anterior cromatografía de afinidad, filtro, ultrafiltración, precipitación salina (salting out) y diálisis y así. Ejemplos de cromatografía incluyen cromatografía de intercambio de iones, cromatografía hidrofóbica, filtración de gel y similares. Tal cromatografía puede ser aplicada para HPLC (cromatografía líquida de alto desempeño). También HPLC de fase reversa puede ser usada.

Mediciones de las concentraciones del anticuerpo obtenido anteriormente pueden ser realizadas por la medición de la absorbancia o por ELISA. Esos es, en el caso de mediciones de absorbancia, el anticuerpo es apropiadamente diluido con PSB (-) seguido de mediciones de absorbancia a 280 nm, y la concentración es calculada por 1 mg/ml como 1.35 OD. En el caso de ELISA, la medición puede ser realizada como sigue. Eso es, 100 μ l de IgD anti-humano de chivo (suministrado por TAG) diluido a 1 μ g/ml con 0.1 bicarbonato amortiguadora (pH 9.6) es adicionada a un plato de 96 columnas (Suministrado por Nunc), y es incubado de un día para otro a 4 °C para inmovilizar el anticuerpo. Después de bloqueado, 100 μ l del anticuerpo usado en la invención diluido apropiadamente o una muestra que contenga el anticuerpo, o IgG humano (suministrado por Cappel) como el estándar es adicionado, e incubado a temperatura ambiente por una hora.

Después de lavado, 100 μ l de IgG anti-humano marcado de fosfatasa alcalina (suministrado por Bio Source) diluido a 5000 veces es adicionado e incubado a temperatura ambiente por una hora. Después de lavado , una solución sustrato es adicionada seguida por la incubación, y subsecuentemente, la absorbancia a 405

nm es medida usando Un Lector de Microplato Modelo 3550 (suministrado por Bio-Rad) para calcular la concentración del anticuerpo objetivo.

El IL-6 modificado usado en la invención es una sustancia que tiene actividad de fijación al receptor IL-6 y el cual no transmite la actividad biológica de IL-6. Esto es, puesto que el IL-6 modificado no transmite la actividad biológica de IL-6 aunque el se fija al receptor IL-6 competitivamente con IL-6, el bloquea la transducción de señal por IL-6.

El IL-6 modificado es hecho por la introducción de variantes por la sustitución de residuos amino ácidos en la secuencia de amino ácidos de IL-6. El IL-6 que es la fuente del IL-6 modificado puede ser obtenido de cualquier origen, pero es preferible el IL-6 humano en consideración a su antigenicidad-

Específicamente, la modificación de IL-6 es realizada prediciendo la estructura secundaria de la secuencia amino ácida de IL-6 usando los programas de modelamiento molecular conocidos en el arte., por ejemplo, WHATIF (Vriend et al, Mol. Graphics, 8:52-56, 1990) y además por evaluación de los efectos de los residuos de amino ácidos a ser sustituidos en la totalidad de la proteína. Después de determinar los residuos de amino ácidos adecuados a ser sustituidos, el gen que codifica el IL-6 modificado es obtenido introduciendo las variantes por el método PCR convencional así que los amino ácidos son sustituidos usando el vector que contiene la secuencia base que incluye el gen IL-6 humano como plantilla. El IL-6 modificado puede ser obtenido por la incorporación de este dentro del vector apropiado como sea necesario y siguiendo los métodos anteriores para la expresión, producción y purificación del anticuerpo recombinado.

Ejemplos específicos de los IL-6 modificados son expuestos en Brankenhoff et al, J. Biol. Chem., 269:86-93, 1994 y Savino et al, EMBO J., 13:1357-1367, 1994, WO 96/18648 y WO/96/17869.

Péptidos parciales de IL-6 o péptidos parciales de receptor IL-6 usadas en la invención tienen una actividad fijadora al receptor IL-6 o IL-6, respectivamente, y son sustancias que no transmiten la actividad biológica de IL-6. Esto es, el péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial de receptor IL-6 específicamente inhiben la fijación de IL-6 al receptor IL-6 por fijación a y captura de receptor IL-6 o IL-6 respectivamente.

Consecuentemente, puesto que ellos no transmiten la actividad biológica de IL-6, ellos bloquean la transducción de señal por IL-6.

El péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial de receptor IL-6 es el péptido compuesta de la secuencia amino ácida parcial o completa envuelta en la fijación de IL-6 al receptor IL-6 en la secuencia amino ácida de IL-6 o de receptor IL-6. Tal péptido esta compuesto típicamente de 10 a 80, preferiblemente de 20 a 50, y más preferiblemente de 20 a 40 residuos de amino ácidos. El péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial de receptor IL-6 puede ser hecho definiendo la región envuelta en la fijación a IL-6 o al receptor IL-6 en la secuencia amino ácida del IL-6 o del receptor IL-6 y sintetizando su secuencia amino ácida parcial o total por los métodos comúnmente conocidos, por ejemplo, técnicas de ingeniería genética o métodos de síntesis de péptidos.

Para hacer el péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial de receptor IL-6 por las técnicas de ingeniería genética, puede ser obtenido por inserción de la secuencia de DNA que codifica el péptido deseado dentro del vector de expresión y

siguiendo los métodos de expresión, producción y purificación anteriores para el anticuerpo recombinado.

Para preparar el péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor IL-6 por el método de síntesis de péptido, es posible el método típicamente usado en la síntesis de péptido, por ejemplo, el método de síntesis de fase sólida o el método de síntesis de fase líquida.

Específicamente, la síntesis puede ser realizada de acuerdo a Zoku Iyakuin, Kaihatu Vol. 14 Peptide Gosei, (Ed., Yajima, H., Hirokawa Shote, 1991). Como método de fase sólida usado, es, por ejemplo, el método donde la cadena de péptido es extendida por fijación de un amino ácido correspondiente a la terminal C del péptido a ser sintetizado a un soporte que es insoluble en un solvente orgánico, y alternativamente repitiendo una reacción en la cuál un amino ácido es secuencialmente condensado en la dirección de terminal C a N en amino ácidos de los cuales el grupo α -amino y los grupos funcionales de cadena lateral son protegidos con grupos de protección adecuados y una reacción en la cuál el grupo protector de α -amino es eliminado en los amino ácidos o péptidos anexos a la resina. Los métodos de síntesis de fase sólida son en general clasificados en Método Boc y Método Fmoc dependiendo del tipo de grupos protectores usados.

Después de que el péptido objetivo es sintetizado en esta forma, reacciones de desprotección y reacciones de separación de la cadena de péptido del soporte son realizadas. En la reacción de separación del cadena de péptido, fluoruro de hidrógeno o sulfonato de trifluorometano y TFA pueden ser típicamente usados en el método Boc y el método Fmoc, respectivamente. En el método Boc, la resina de péptido protegida atrás es tratada con fluoruro de hidrógeno en la presencia de anisola. Luego, la eliminación del grupo protector y la separación del soporte son realizadas para recuperar el péptido. Este es liofilizado para obtener el péptido

crudo. De otra parte, en el método Fmoc, por ejemplo, en TFA, la reacción de desprotección y la reacción de separación del soporte de la cadena de péptido pueden ser realizadas por la misma manipulación que antes.

El péptido crudo resultante puede ser aislado y purificado por aplicación de HPLC. La elución puede ser realizada bajo una condición óptima usando un solvente agua-acetonitrilo típicamente usado para la purificación de proteína. Las fracciones correspondientes a picos en el perfil de la cromatografía resultante son recogidas y liofilizadas. Las fracciones de péptido purificadas en esta manera son identificadas por análisis de los pesos moleculares por espectrometría de masas, análisis de composición de amino ácidos o análisis de secuencia de amino ácidos.

Los ejemplos específicos de los péptidos parciales de IL-6 y receptor IL-6 son expuestos en JP-A-2-188600, 7-324097, y 8-311098, y la Patente US 5210075.

Los compuestos farmacéuticos de la invención pueden ser aquellos que contienen los vehículos farmacéuticamente aceptables y aditivos dependiendo de las formas de administración. Ejemplos de tales vehículos y aditivos incluyen agua, solventes orgánicos farmacéuticamente aceptables, colageno, alcohol polivinil, polivinilpirrolidona, polímero de carboxivinil, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilato de sodio, arginato de sodio, dextran soluble en agua, almidón de carboximetil sódico, pectina, metil celulosa, etil celulosa, goma xantana, goma arábica, caseína, gelatina, agarosa, diglicerina, propilenglicol, polietileno glicol, petrolatum, parafina, alcohol estearil, ácido esteárico, albúmina de suero humano (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, surfactantes adecuados como aditivos farmacéuticos y los similares. Los aditivos usados son seleccionados apropiadamente de los de arriba o en combinación dependiendo de su formulación, pero no están limitados a ellos.

Ejemplos

La presente invención es específicamente descrita a continuación mediante ejemplos y ejemplos de referencia, pero la invención no se limita a ellos:

Ejemplo 1

MRA es un anticuerpo monoclonal Interleukin-6 anti-humano humanizado recombinado de la subclase IgG1 que inhibe la función del Interleukin-6 citokina (IL-6). En estudios previos en Japón y Europa, MRA se mostró promisorio en el tratamiento de artritis reumatoide y fue bien tolerado.

Esto fue un gran ensayo de fase II de MRA para determinar la dosis óptima de MRA suministrada sola y en combinación con metotrexato para el tratamiento de artritis reumatoide. La eficiencia potencial de dosis intravenosas repetidas de MRA, ambas, como monoterapia y en combinación con metotrexato, fueron evaluadas en pacientes con artritis reumatoide activa a pesar del tratamiento con metotrexato por un período determinado de tiempo y comparada con monoterapia de metotrexato. La eficacia, seguridad y tolerabilidad de MRA fue evaluada.

Métodos:

Sujetos: pacientes con artritis reumatoide diagnosticada con base en la Clasificación de Enfermedades de 1987 del American College of Rheumatology (ACR), de al menos 6 meses de duración fueron enrolados. Los pacientes debían tener la enfermedad activa y tener una respuesta inadecuada a, o incomodidad con la enfermedad por MTX suministrado por al menos 6 meses a una dosis de al menos 12.5 mg semanalmente o 10 mg semanalmente en el caso de intolerancia.

Diseño del Estudio: cierre-doble, aleatorio, grupo de estudio paralelo por el método aleatorio central.

Dosificación y Administración: siete grupos: 0 mg/kg (placebo) + MTX, 2 mg/kg MRA + MTX, 4 mg/kg MRA + MTX, 8 mg/kg MRA + MTX, 2 mg/kg MRA + MTX

placebo, 4 mg/kg MRA + MTX placebo y 8 mg/kg MRA + MTX placebo. La administración de MRA o placebo es por infusión intravenosa, con 4 semanas de intervalo. La administración de MTX o MTX placebo es oral, una vez a la semana, a 10 –25 mg/semana.

Método de Estudio: La dosis asignada fue administrada por infusión intravenosas, cuatro veces en total a intervalos de cuatro semanas, y la eficiencia y seguridad fueron evaluadas a intervalos de 2 semanas hasta 16 semanas, y observaciones de seguimiento fueron hechas a las 20 semanas, El principal punto culminante para eficacia fue la tasa de ACR 20 a 16 semanas (4 semanas después de la última dosis). Puntos culminantes secundarios incluyen tasas de ACR 50 y ACR 70 a 16 semanas (4 semanas después de la última dosis).

Criterios de mejoramiento de ACR: Los casos donde entre los siguientes 7 ítems, el número de articulaciones y el número de articulaciones adoloridas son mejoradas en un 20% o mas y el mejoramiento del 20% o más es observado en tres de los cinco ítems remanentes son definidos como 20% o mas de mejoría en los criterios. Además, 50% y 70% casos de mejora indican los casos de pacientes donde el anterior 20% de partes mejoradas son mejoradas en un 50% y 70% respectivamente.

- (1) Numero de articulaciones inflamadas
- (2) Número de articulaciones sensibles
- (3) Evaluación del dolor por el paciente.
- (4) Evaluación global de la actividad de la enfermedad por el paciente.
- (5) Actividad global de la enfermedad por el médico
- (6) Evaluación de la función física por el paciente
- (7) CRP o ESR

Tabla 1

	2mg/kg MRA	4 mg/kg MRA	8 mg/kg MRA	MTX
ACR 20	30.8%	61.1%	62.7%	40.8%

ACR 50	5.8%	27.8%	41.2%	28.6 %
ACR 70	1.9%	5.6%	15.7%	16.3%
	2mg/kg MRA + MTX	4 mg/kg MRA +MTX	8 mg/kg MRA + MTX	
ACR 20	64.0%	63.3%	73.5%	
ACR 50	32.0%	36.7%	53.1%	
ACR 70	14.0%	12.2%	36.7%	

Mas altas tasas de mejoramiento ACR 20 estadísticamente significativas fueron observadas en todos los grupos excepto el grupo de 2 mg/kg de solo MRA comparado con el grupo de control. En el grupo de 8 mg/kg de MRA +MTX, la tasa de mejoramiento ACR 50 y 70 fueron 53.1 y 36.7 respectivamente, los cuales fueron estadísticamente significativamente mas altos que los del grupo de control que fueron 28.6 y 16.3%, respectivamente.

En los grupos de solo MRA , una dependencia en la dosis estadísticamente significativa fue observada en la rata de mejoramiento de ACR 20. También para las tasas de mejoramiento ACR 50 y 70, la respuesta estadísticamente significativa dependiente de la dosis fue observada en ambos grupos solo MRA y MTX-combinado.

Reducción de Conteo de Articulaciones Inflamadas (Tabla 2)

El conteo de articulaciones inflamadas promedio fue similar a través de todos los grupos de tratamiento en el punto de línea base.

Hubo una reducción acumulativa en el conteo de articulaciones inflamadas desde el punto de línea base con el incremento de la duración de la exposición en todos los siete grupos. La reducción media en el conteo de articulaciones inflamadas en el grupo 8 mg/kg de MRA fue estadísticamente significativo comparado con la reducción en el grupo MTX ($p=0.10$). En la semana 16, la diferencia promedio (

95% CI) entre el grupo de 8 mg/kg de MRA y el grupo de MTX fue -2.31 (-4.07 , -0.55). Hubo una estadísticamente significativa relación lineal con la dosis entre los grupos de monoterapia de MRA ($p<0.001$). La diferencia promedio (95% CI) entre el grupo de 8 mg/kg de MRA +MTX y el grupo MTX fue -3.62 (-5.39 , -1.84). Hubo una estadísticamente significativa relación lineal con la dosis entre los grupos de terapia combinada de MRA ($p=0.004$)

Tabla 2

	2mg/kg MRA	4 mg/kg MRA	8 mg/kg MRA	MTX
Línea base N	52	54	51	49
Promedio $\pm$ SD	11.6 $\pm$ 4.6	11.1 $\pm$ 4.4	12.2 $\pm$ 5.2	12.7 $\pm$ 4.2
Cambio desde la Lín. Base Semana 16 N	42	43	43	39
Promedio $\pm$ SD	-4.5 $\pm$ 5.7	-5.8 $\pm$ 4.1	-8.4 $\pm$ 4.6	-5.7 $\pm$ 6.1
	2mg/kg MRA + MTX	4 mg/kg MRA +MTX	8 mg/kg MRA + MTX	
Línea base N	50	49	49	
Promedio $\pm$ SD	11.9 $\pm$ 4.3	11.9 $\pm$ 3.9	11.8 $\pm$ 3.9	
Cambio desde la Lín. Base Semana 16 N	46	43	43	
Promedio $\pm$ SD	-6.2 $\pm$ 5.7	-6.8 $\pm$ 5.4	-9.4 $\pm$ 4.0	

Entre los 359 pacientes enrolados, los puntajes de las evaluaciones de seguridad, por análisis completo y PPS (por protocolo) fueron 359, 354 y 307 , respectivamente. En total 350 pacientes fueron enrolados, 299 completaron el estudio, y 60 fueron retirados. Entre los pacientes retirados, 33 lo fueron por eventos adversos, uno fue debido a complicación con la otra enfermedad, siete fueron debidos a eventos adversos, 7 fueron debidos a uso de drogas con de uso concomitante prohibido, cinco fueron debidos a retiro de consentimiento informado, uno fue debido a perdida de seguimiento, y 22 fueron debidas a ausencia de eficacia (que incluye múltiples razones).

Entre los eventos adversos serios de los cuales relaciones de causalidad no podía ser negada, cinco casos de infección fueron reportados. Esto es, un paciente con un absceso en el pie y osteomielitis en el grupo de 2 mg/kg de MRA, un paciente con infección del pecho y pleuresía, un paciente con septicemia en el grupo 8 mg/kg de MRA +MTX, y un paciente con infección de articulaciones en el grupo de 8 mg/kg de MRA + MTX, fueron reportados. En adición a ellos, cinco casos de hipersensibilidad fueron reportados como eventos adversos serios de los cuales relaciones de causa no podían ser negadas, esto es cuatro pacientes de hipersensibilidad en el grupo de 2 mg/kg de MRA. grupo y un paciente de hipersensibilidad en el grupo de 4 mg/kg MRA fue reportado. Todos estos eventos de hipersensibilidad ocurrieron sin combinación de MTX después de la 3ª o 4ª administración de MRA.

Referente a los valores de los datos de laboratorio para funciones hepáticas, aunque la elevación de los niveles de ALT y AST fueron observados como resultado del uso de MRA, estas elevaciones fueron equivalentes a aquellas observadas en los otros pacientes con artritis reumatoide. El incremento de los datos de laboratorio relativo a los lípidos (colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos) fue observado en los grupos MRA. No obstante, no hubo cambio total en el Índice Aterogénico.

Un suave descenso transitorio del conteo de neutrófilos ocurrió en algunos pacientes. Los cambios clínicamente significativos de los parámetros para la actividad de la enfermedad, por ejemplo, la reducción de CRP y ESR y la elevación de la hemoglobina fueron observados bajo de manera dependiente de la dosis.

Reacción de Infusión

Una reacción de infusión fue definida como un evento adverso que ocurre dentro de las 24 horas de la administración de la droga en estudio. El número de pacientes que experimentaron una reacción de infusión en cada grupo de tratamiento sugiere una posible respuesta inversa a la dosis para MRA.

Anticuerpo anti-MRA

El desarrollo de anticuerpos de anti-MRA fue examinado. Ninguno ocurrió en los grupos de tratamiento a 8 mg/kg (monoterapia o combinación con MTX). En los grupos de tratamiento a 2 o 4 mg/kg, el número de incidentes fue menor en los grupos en combinación con MTX que en los grupos de monoterapia MRA.

Una clara respuesta a la dosis fue observada para monoterapia MRA y para MRA combinada con metotrexato. La efectividad de MRA para tratar pacientes con artritis reumatoide fue confirmada para ambas monoterapia MRA y para MRA combinada con metotrexato. Además, la seguridad de MRA fue confirmada en ambas monoterapia MRA y para MRA combinada con metotrexato.

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

El receptor soluble IL-6 fue hecho por el método PCR utilizando plásmido, pBSF2R.236 que contiene cDNA que codifica el receptor IL-6 obtenido de acuerdo con el método de Yamasaki y otros (Yamasaki, K. et. al., Science, 241:825-828, 1988). El plásmido, pBSF2R.236 fue digerido con una enzima de restricción, Sph1 para obtener el cDNA del receptor IL-6, el cual fue entonces insertado dentro de mp18 (suministrado por Amersham). Fueron introducidas variantes dentro del cDNA del receptor IL-6 en el método PCR por el sistema de mutagenesis in vitro (suministrado por Amersham) utilizando oligoprimers sintéticos diseñados para introducir un codón de pare dentro del cDNA del receptor IL-6. Esta manipulación introdujo el codón de pare en la posición 345 del amino ácido para obtener el cDNA que codifica el receptor soluble IL-6.

El cDNA del receptor IL-6 soluble fue ligado al plásmido pSV (suministrado por Pharmacia) para poder disponer del plásmido pSVL344 para expresar el cDNA en células CHO. El cDNA del receptor IL-6 soluble digerido con HindIII-Sall fue insertado dentro del plásmido pECEdhfr que contiene cDNA de dhfr para obtener la expresión celular CHO del plásmido pECEdhfr344.

Por el método de la precipitación del fosfato de calcio (Chen, C. et al., Mol. Cell Biol., 7:2745-2751, 1987), 10 µg del plásmido pECEdhfr344 fue transfectado dentro de la línea de células dhfr-CHO DXB-11 (Urlaub, G. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216-4220, 1980). Las células transfectadas CHO fueron cultivadas por 3 semanas en medio αMEM seleccionado conteniendo 1 mM de glutamina, 10 % de FCS dializado, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin sin nucleósido.

Las células CHO seleccionadas fueron separadas por el método de dilución limitante, y fue obtenido un solo clon de células CHO. Este clon de CHO fue amplificado con metotrexato a la concentración de 20 nM a 200 nM para obtener la línea de células CHO 5E27 la cual produce el receptor IL-6 humano soluble. La línea de células CHO 5E27 fue cultivada en medio Dulbecco de Iscove modificado (IMDM, suministrado por Gibco) conteniendo 5 % de FBS. En el flotante del cultivo fue recogido, y la concentración del receptor IL-6 soluble en el flotante del cultivo fue medida por ELISA. Como un resultado, fue afirmado que el receptor soluble IL-6 estaba presente en el flotante del cultivo.

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

El ratón BALB/c fue inmunizado con 10 µg de IL-6 recombinado (Hirano, T. et al., Immunol. Lett., 17:41, 1988) junto con adyuvante de Freund completo, y la inmunización se continuó cada semana hasta que el anticuerpo anti-IL-6 fue detectado en el suero. Las células inmunizadas fueron removidas de los nodos

linfáticos locales y fundidos con la línea de células mieloma, P3U1 usando polietilenoglicol 1500. Los hibridomas fueron seleccionados de acuerdo con el método de Oi y otros (Selective Methods in Cellular Immunology W. H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) usando medio HAT, y fue establecido el hibridoma que produce anticuerpo IL-6 anti humano.

El ensayo de fijación de IL-6 fue llevado a cabo como sigue para los hibridomas que producen anticuerpo IL-6 anti humano. Es decir, un microplato flexible de polivinil de 96-tubos (suministrado por Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA) fue cubierto con 100 μ l de Ig de cabra anti ratón (10 μ l/ml; suministrado por Cooper Biomedical Inc., Malvern, PA) en una solución de amortiguación carbonatada de carbonato-hidrogeno 0.1 M (pH 9.6) a 4°C de un día para otro. A continuación, el plato fue tratado con 100 μ l de PBS que contiene 1 % de albumina de suero bovino (BSA) por 2 horas a temperatura ambiente.

Este fue lavado con PBS, seguidamente fue adicionado 100 μ l del flotante del cultivo de hibridoma a cada tubo, e incubado a 4 °C de un día para otro. El plato fue lavado, entonces IL-6 recombinado rotulado 125 I fue adicionado a cada tubo para estar a 2000 cpm/0.5 ng/tubo, el plato fue lavado, y a continuación la radioactividad en cada tubo fue medida con un contador gamma (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA). Por consiguiente, 32 de los 216 clones de hibridoma fueron positivos en el ensayo de fijación de IL-6. Entre estos clones finalmente el MH166.BSF2 estable fue obtenido. El anticuerpo anti-IL-6 MH166 producido por el hibridoma tiene un subtipo de IgG1k.

En seguida, la actividad de neutralización del anticuerpo MH166 para el crecimiento de hibridomas fue examinada utilizando clon MH60.BSF2 de hibridoma de ratón dependiente de IL-6. Las células MH60.BSF2 fueron dispensadas a 1×10^4 /200 μ l/tubo, una muestra que contiene anticuerpo MH166

fue agregada a ello seguida por un cultivo de 48 horas, y 0.5 μCi /tubo de timidina ^3H (New England Nuclear, Boston, MA) fue agregado. Después de un cultivo adicional de 6 horas, las células fueron puestas en papel de filtro de vidrio, y tratadas utilizando un cosechador automático (Labo Mash Science Co., Tokyo, Japan). Anticuerpo anti IL-6 de conejo fue utilizado como control.

Como resultado, el anticuerpo MH166 inhibió la toma de timidina ^3H de las células MH60.BSF2 inducidas por IL-6 en una manera dependiente de la dosis. Esto demuestra que el anticuerpo MH166 neutralizó la actividad de IL-6.

Ejemplo de Referencia 3. Preparación de anticuerpo receptor IL-6 anti humano

El anticuerpo receptor anti-IL-6 MT18 hecho por el método de Hirano y otros (Hirano, Y. et al., J. Immunol., 143:2900-2906, 1989) fue fijado a Sefarosa 4B (suministrada por Pharmacia Fine Chemicals; Piscataway, NJ) activado con CNBr de acuerdo con la formulación adjunta para purificar el receptor IL-6. (Yamasaki, K. et al., Science, 241:825-828, 1988). La línea de células de mieloma humano, células U266 fueron solubilizadas con 1 mM de clorhidrato de p-para-aminofenilmetano sulfonilfluoruro (suministrado por Wako Chemicals) que contiene 1% de digitonina (suministrado por Wako Chemicals), 10 mM de etanolamina (pH 7.8) y 1.5 M de NaCl (amortiguador de digitonina), y mezclado con el anticuerpo MT18 fijado a cuentas de Sefarosa 4B. Seguidamente, las cuentas fueron lavadas con el amortiguador de digitonina 6 veces, y devueltas como receptor IL-6 parcialmente purificado para inmunización.

El ratón BALB/c fue inmunizado con el anterior receptor IL-6 parcialmente purificado obtenido de 3×10^9 células U266 cada 10 días 4 veces, y seguidamente hibridomas fueron hechos por el método estándar. La actividad fijadora al receptor IL-6 fue examinada en flotante del cultivo de hibridoma a partir del crecimiento de tubos positivos por el siguiente método. Células U266 a 5×10^7 fueron marcadas

con ^{35}S -metionina (2.5 mCi), y solubilizadas con la anterior solución amortiguadora de digitonina. Las células U266 solubilizadas fueron mezcladas con un volumen de 0.04 ml de anticuerpo MT18 fijadas a cuentas de Sefarosa 4B, seguidamente lavadas con la solución amortiguadora de digitonina seis veces, en seguida el receptor IL-6 marcado con ^{35}S -metionina fue eluida con 0.25 ml de la solución amortiguadora de digitonina (pH 3.4), y neutralizada con 0.025 ml de Tris 1M (pH 7.4).

El flotante del cultivo de hibridoma (0.05 ml) fue mezclado con 0.01 ml de Proteína G Sefarosa (suministrada por Pharmacia). Después de lavado, la Sefarosa fue incubada con 0.005 ml de solución del receptor IL-6 marcado con ^{35}S -metionina preparado arriba. El inmunoprecipitado fue analizado por SDS-PAGE, y el flotante del cultivo de hibridoma que reaccionó con el receptor IL-6 fue examinado. En consecuencia, un clon de hibridoma de reacción positiva, PM-1 (FERM BP-2988) fue establecido. El anticuerpo producido por el hibridoma, PM-1 tiene un subtipo de IgGk.

La actividad inhibitoria del anticuerpo producida por el hibridoma PM-1 fue examinada por la fijación de IL-6 al receptor humano IL-6 utilizando la línea de células de mieloma humano, U266. El IL-6 recombinado humano fue preparado a partir de *E. coli* (Hirano, T. et al., *Immunol. Lett.*, 17:41-45, 1988), y marcadas con ^{125}I (Taga, T. et al., *J. Exp. Med.*, 166:967-981, 1987) por el reagente Bolton-Hunter (New England Nuclear, Boston, MA)

Células U266 a 4×10^5 fueron cultivadas con 70% (v/v) del flotante del cultivo de hibridoma PM-1 y 14000 cpm de IL-6 marcado ^{125}I . Una muestra (70 μl) fue extendida sobre 300 μl de FCS en un tubo de polietileno de microfugado de 400 μl , y centrifugado seguido por la medición de la radioactividad en las células.

En consecuencia, se demostró que el anticuerpo producido por el hibridoma PM-1 inhibe el enlace de IL-6 al receptor IL-6.

Ejemplo de Referencia 4. Preparación de anticuerpo receptor IL-6 anti ratón

Un anticuerpo monoclonal contra el receptor IL-6 de ratón fue preparado por el método descrito en Saito, T y otros, J. Immunol., 147:168-173, 1991.

Células CHO las cuales producen receptor IL-6 soluble de ratón fueron cultivadas en medio IMDM que contiene 10% de FCS, y el receptor IL-6 soluble de ratón fue purificado del flotante del cultivo utilizando una columna de afinidad donde el anticuerpo de receptor IL-6 anti ratón RS12 (Ver la anterior Saito, T y otros) fue fijado sobre Affigel 10 gel (suministrado por Biorad).

El receptor IL-6 soluble de ratón resultante (50 µg) fue mezclado con adyuvante completo de Freund, el cual fue inyectado dentro de la cavidad peritoneal de una rata Wistar. Después de dos semanas, se comenzó inmunización adicional con adyuvante incompleto de Freund. En el día 45^{avo}, fueron removidas células del bazo de la rata, y 2×10^8 células fueron fusionadas con 1×10^7 células de mieloma de ratón P3U1 por el método estándar utilizando 50% de PEG1500 (suministrado por Boehringer Mannheim) seguido por la separación de hibridomas en medio HAT.

El flotante del cultivo de hibridoma fue adicionado a un plato cubierto con anticuerpo IgG anti ratón de conejo (suministrado por Cappel), y a continuación fue reaccionado el receptor IL-6 soluble de ratón. Posteriormente, los hibridomas que producen el anticuerpo contra el receptor IL-6 soluble de ratón fueron separados por el método ELISA utilizando anticuerpo receptor IL-6 anti ratón de conejo y IgG anti conejo de oveja fosfatasa alcalina marcado. El clon de hibridoma

104

en el cual la producción del anticuerpo fue afirmada fue subclonado dos veces, y se obtuvo un clon de hibridoma solo. Este clon fue denominado MR16-1.

La actividad de neutralización del anticuerpo producido por este hibridoma fue examinada por transducción de señal de IL-6 de ratón por la toma de timidina ^3H utilizando células MH60.BSF2 (Matsuda, T. et al., J. Immunol., 18:951-956, 1988). Las células MH60.BSF2 fueron preparadas para estar 1×10^4 células/200 μl /tubo en un plato de 96 tubos. A esta bandeja, fue agregado 10 pg/ml de IL-6 de ratón y 12.3 a 1000 ng/ml de anticuerpo MR16-1 o anticuerpo RS12, después cultivada a 37°C por 44 horas a 5% de CO_2 , luego de lo cual fue adicionado $1\mu\text{Ci}$ /tubo de timidina ^3H . 4 horas más tarde, fue medida la toma de timidina ^3H . En consecuencia, el anticuerpo MR16-1 suprimió la toma de timidina ^3H de las células MH60.BSF2.

De acuerdo con lo anterior, se demostró que el anticuerpo producido por el hibridoma MR16-1 (FERM BP-5875) inhibe la fijación de IL-6 al receptor IL-6

101

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6, que comprende un antagonista de interleukin 6 (antagonista IL-6) e inmunosupresores.
2. Una composición farmacéutica que comprende inmunosupresores, para mejorar el efecto en el uso de antagonista IL-6 para el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6.
3. Una composición farmacéutica que comprende inmunosupresores, para la reducción o prevención de reacciones alérgicas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6 con un antagonista IL-6.
4. Un agente terapéutico para la administración a dosis altas, que incorpora un antagonista IL-6.
5. Una composición farmacéutica que comprende dosis altas de antagonista IL-6, para la reducción o prevención de reacciones alérgicas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el mencionado antagonista IL-6 es un anticuerpo receptor anti-interleukin-6 (anticuerpo IL-6R).
7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el mencionado anticuerpo IL-6R es un anticuerpo monoclonal contra IL-6R.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, en donde el mencionado anticuerpo anti-IL-6R es un anticuerpo monoclonal contra IL-6R humano.
9. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, en donde el mencionado anticuerpo anti IL-6R es un anticuerpo monoclonal contra IL-6R de ratón.

10. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde el mencionado anticuerpo anti IL-6R es un anticuerpo recombinado.
11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el mencionado anticuerpo monoclonal anti IL-6R humano es el anticuerpo PM-1.
12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el mencionado anticuerpo monoclonal IL-6R de ratón es el anticuerpo MR16-1.
13. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, en donde el mencionado anticuerpo anti IL-6R es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de tipo humano contra IL-6R.
14. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el mencionado anticuerpo humanizado contra IL-6R es el anticuerpo PM-1 humanizado.
15. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde las mencionadas enfermedades relacionadas con IL-6 son artritis reumatoide, plasmocitosis, hiperinmunoglobulinemia, anemia, nefritis, caquexia, mieloma múltiple, enfermedad del ganadero, nefritis proliferativa mesangial, lupus eritomatoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, pancreatitis, soriasis, artritis idiopática juvenil o artritis idiopática juvenil sistemática, vasculitis y enfermedad de Kawasaki.
16. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y las reivindicaciones 6 a 15, en las cuales la mencionada composición farmacéutica que contiene inmunosupresores o la mencionada composición farmacéutica que contiene el anticuerpo y el inmunosupresor, donde una dosificación de anticuerpo anti-IL-6R es desde 0.02 a 150 mg/kg/4 semanas o la dosificación que muestre una concentración de anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.

107

17. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la dosificación de anticuerpo anti-IL-6R es desde 0.5 a 30 mg/kg/4 semanas o la dosificación que muestre una concentración del anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.
18. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la dosificación de anticuerpo anti-IL-6R es de 2 a 8 mg/kg/4 semanas o la dosificación que muestre una concentración de anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.
19. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 15, la cual es considerada agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6 por la administración en altas dosis, que incluye el anticuerpo anti-IL-6R o la mencionada composición farmacéutica que incluye altas dosis del anticuerpo anti-IL-6R, en donde la dosificación del anticuerpo anti-IL-6R es 4 mg/kg/4 semanas o más o la dosificación que muestre una concentración del anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.
20. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 19, en donde la dosificación de anti cuerpo anti-IL-6R es desde 6 a 16 mg/kg/4 semanas o la dosificación o la dosificación que muestre una concentración de anticuerpo anti IL-6R en la sangre equivalente a eso.
21. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 20, en donde la dosificación de anti cuerpo anti-IL-6R es desde 6 a 10 mg/kg/4 semanas o la dosificación que muestre una concentración de anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.
22. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y reivindicaciones 6 a 21, en donde el mencionado inmunosupresor es metotrexato (MTX).
23. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 22, en donde la dosificación del mencionado MTX es desde 1 a 100 mg/cuerpo/semana.

108

24. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 23, en donde la dosificación del mencionado MTX es desde 4 a 50 mg/cuerpo/semana.
25. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 24, en donde la dosificación del mencionado MTX es de 7.5 a 25 mg/cuerpo/semana.
26. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y reivindicaciones 6 a 25, para administración simultánea del mencionado anticuerpo anti-IL-6 y el mencionado inmunosupresor.
27. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y las reivindicaciones 6 a 25, para administración del mencionado anticuerpo anti-IL-6 y el mencionado inmunosupresor con intervalo de tiempo.
28. El uso de un antagonista de interleukin-6 (antagonista IL-6) e inmunosupresores para la producción de una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6.
29. El uso de un antagonista IL-6 para la producción de una composición farmacéutica que incluye inmunosupresores, para mejorar el efecto en el uso de el antagonista IL-6 para el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6.
30. El uso de un antagonista IL-6 para la producción de una composición farmacéutica que incluye inmunosupresores, para la reducción o prevención de reacciones alérgicas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6 con el antagonista IL-6.
31. El uso de un antagonista IL-6 para la producción de un agente terapéutico de enfermedades relacionadas con IL-6 para la administración en altas dosis, que incluye el antagonista IL-6.
32. El uso de un antagonista IL-6 para la producción de una composición farmacéutica que incluye el anticuerpo anti IL-6 en altas dosis para la

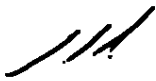
109

reducción o prevención de reacciones alérgicas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6.

33. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32, donde el mencionado antagonista IL-6 es un anticuerpo receptor anti-interleukin-6 (anticuerpo IL-6R).
34. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 33, en donde el mencionado anticuerpo IL-6R es un anticuerpo monoclonal contra IL-6R.
35. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 34, en donde el mencionado anticuerpo IL-6R es un anticuerpo monoclonal contra IL-6R humano.
36. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 34, en donde el mencionado anticuerpo IL-6R es un anticuerpo monoclonal contra IL-6R de ratón.
37. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 36, en donde el mencionado anticuerpo IL-6R es un anticuerpo recombinado.
38. El uso de acuerdo con la reivindicación 35, en donde el mencionado anticuerpo monoclonal anti-IL-6R humano es el anticuerpo PM-1.
39. El uso de acuerdo con la reivindicación 36, en donde el mencionado anticuerpo monoclonal anti-IL-6R de ratón es el anticuerpo MR16-1.
40. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 32 a 39, en donde el mencionado anticuerpo anti-IL-6r es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o anticuerpo de tipo humano contra IL-6R.
41. El uso de acuerdo con la reivindicación 40, en donde el mencionado anticuerpo humanizado contra IL-6R es el anticuerpo PM-1 humanizado.
42. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 21 a 41, en donde las mencionadas enfermedades relacionadas con IL-6 son artritis reumatoide, plasmacitosis, hiperinmunoglobulinemia, anemia, nefritis, caquexia, mieloma múltiple, enfermedad del ganader, nefritis proliferativa mesangial, lupus

eritomatoso sistémico, enfermedad de Crohn, pancreatitis, soriasis, artritis idiopática juvenil o artritis idiopática juvenil sistemática.

43. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30 y reivindicaciones 33 a 42, que es el uso mencionado para la producción de la composición farmacéutica que incluye el inmunosupresor o la composición farmacéutica que incluye el anticuerpo anti-IL-6R y el inmunosupresor, en donde una dosificación del anticuerpo anti-IL-6R es desde 0.02 hasta 150 mg/kg/4 semanas o la dosificación que muestre una concentración del anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.
44. El uso de acuerdo con la reivindicación 43, en donde la dosificación de anticuerpo anti-IL-6R es desde 0.5 hasta 30 mg/kg/4 semanas o la dosificación que muestre una concentración de anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.
45. El uso de acuerdo con la reivindicación 44, en donde la dosificación de anticuerpo anti-IL-6R es desde 2 hasta 8 mg/kg/4 semanas o la dosificación que muestre una concentración de anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.
46. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 45, en la cual el mencionado uso es la producción de agente terapéutico para el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6 para la administración en dosis altas, que comprende el anticuerpo anti-IL-6R o la mencionada composición farmacéutica que incluye altas dosis del anticuerpo anti IL-6R, en donde la dosificación de anticuerpo anti-IL-6R es 4 mg/kg/4 semanas o más o la dosificación que muestre una concentración del anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.
47. El uso de acuerdo con la reivindicación 46, en donde la dosificación de anticuerpo anti-IL-6R es desde 6 a 16 mg/kg/4 semanas o la dosificación que muestre una concentración de anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.

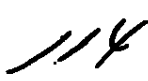
- 
48. El uso de acuerdo con la reivindicación 47, en donde la dosificación de anticuerpo anti-IL-6R es desde 6 a 10 mg/kg/4 semanas o la dosificación que muestre una concentración de anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.
49. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30 y las reivindicaciones 33 a 48, en donde el mencionado inmunosupresor es metotrexato (MTX).
50. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 49, donde la dosificación del mencionado MTX es desde 1 a 100 mg/cuerpo/semana.
51. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 50, en donde la dosificación del mencionado MTX es desde 4 a 50 mg/cuerpo/semana.
52. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 51, donde la dosificación del mencionado MTX es desde 7.5 a 25 mg/cuerpo/semana.
53. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30 y reivindicaciones 34 a 52, para administración simultáneamente del mencionado anticuerpo anti-IL-6 y el mencionado inmunosupresor.
54. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 28 a 30 y reivindicaciones 34 a 52, para administración del mencionado anticuerpo anti-IL-6 y del mencionado inmunosupresor con intervalo de tiempo.
55. Un método que comprende la administración de un antagonista IL-6 e inmunosupresores a un paciente que requiere tal tratamiento en el método para el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6
56. Un método para mejorar el efecto en el uso de un antagonista IL-6 para el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6, que comprende la administración de Inmunosupresores y un antagonista IL-6 a un paciente que requiere tal tratamiento.
57. Un método para la reducción o prevención de reacciones alérgicas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6 con un antagonista IL-6,

que comprende la administración de inmunosupresores y un antagonista IL-6 a un paciente que requiere tal tratamiento.

58. Un método que comprende la administración de un antagonista IL-6 anticuerpo anti-IL-6R en una dosis alta a un paciente que requiere tal tratamiento en el método para el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6 con la administración de una dosis alta de antagonista IL-6.
59. Un método para la reducción o prevención de reacciones alérgicas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6, que comprende comprende la administración de dosis altas de un antagonista IL-6 a un paciente que requiere tal tratamiento.
60. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 55 a 59, en donde el mencionado antagonista IL-6 es un anticuerpo anti-IL-6R.
61. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 55 a 59, en donde el mencionado anticuerpo anti-IL-6R es un anticuerpo monoclonal contra IL-6R humano.
62. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 55 a 59, en donde el mencionado anticuerpo anti-IL-6R es un anticuerpo monoclonal contra IL-6 de ratón.
63. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 55 a 62, en donde el mencionado anticuerpo anti-IL-6R es un anticuerpo recombinado.
64. El método de acuerdo con la reivindicación 61, en donde el mencionado anticuerpo monoclonal anti-IL-6R humano es el anticuerpo PM-1.
65. El método de acuerdo con la reivindicación 62, en donde el mencionado anticuerpo monoclonal anti-IL-6R de ratón es el anticuerpo MR16-1.
66. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 59 a 64, en donde el mencionado anticuerpo anti-IL-6R es un anticuerpo quimerico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de tipo humano contra IL-6R.
67. El método de acuerdo con la reivindicación 66, en donde el mencionado anticuerpo humanizado contra IL-6R es el anticuerpo humanizado PM-1.

113

68. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 55 a 67, en donde las mencionadas enfermedades relacionadas con IL-6 son artritis reumatoide, plasmacitosis, hiperinmunoglobulinemia, anemia, nefritis, caquexia, mieloma múltiple, enfermedad del ganader, nefritis proliferativa mesangial, lupus eritomatoso sistémico, enfermedad de Crohn, pancreatitis, soriasis, artritis idiopática juvenil o artritis idiopática juvenil sistemática.
69. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 55 a 57 y reivindicaciones 60 a 68, que es el método para el tratamiento en donde el inmunosupresor, o anticuerpo anti-IL-6R y el inmunosupresor son administrados, en donde la dosificación de anticuerpo anti-IL-6R es desde 0.02 a 150 mg/kg/4 semanas o la dosificación que muestre una concentración de anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.
70. El método de acuerdo con la reivindicación 69, en donde la dosificación de anticuerpo anti-IL-6R es desde 0.5 a 30 mg/kg/4 semanas o la dosificación que muestre una concentración de anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.
71. El método de acuerdo con la reivindicación 70, en donde la dosificación de anticuerpo anti-IL-6R es desde 2 a 8 mg/kg/4 semanas o la dosificación que muestre una concentración de anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.
72. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 58 a 68, el cual es el mencionado método para el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6 o el método mencionado para el tratamiento en donde es administrada una dosis alta de anticuerpo anti-IL-6 que comprende la administración de la dosis alta de anticuerpo anti-IL-6R, en donde la dosificación del anticuerpo anti IL-6R es 4 mg/kg/4 semanas o más o la dosificación que muestre una concentración de anticuerpo anti-IL-6R en sangre equivalente a eso.

- 
73. El método de acuerdo con la reivindicación 72, en donde la dosificación de anticuerpo anti-IL-6R es desde 6 a 16 mg/kg/4 semanas o la dosificación que muestre una concentración de anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.
74. El método de acuerdo con la reivindicación 73, en donde la dosificación de anticuerpo anti-IL-6R es desde 6 a 10 mg/kg/4 semanas o la dosificación que muestre una concentración de anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.
75. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 55 a 57 y las reivindicaciones 60 a 74, en donde el mencionado inmunosupresor es metotrexato (MTX).
76. El método de acuerdo con la reivindicación 75, en donde la dosificación del mencionado MTX es desde 1 a 100 mg/cuerpo/semana.
77. El método de acuerdo con la reivindicación 76, en donde la dosificación del mencionado MTX es desde 4 a 50 mg/cuerpo/semana.
78. El método de acuerdo con la reivindicación 77, en donde la dosificación del mencionado MTX es desde 7.5 a 25 mg/cuerpo/semana.
79. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 55 a 57 y las reivindicaciones 60 a 78, para la administración simultáneamente del mencionado anticuerpo anti-IL-6 y el mencionado inmunosupresor.
80. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 55 a 57 y la reivindicaciones 60 a 78, para la administración del mencionado anticuerpo anti-IL-6 y del mencionado inmunosupresor con intervalo de tiempo.



RESUMEN

Una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades relacionadas con interleukin-6 (IL-6), que incluye un antagonista interleukin-6 (antagonista IL-6) e inmunosupresores. El antagonista IL-6 es preferiblemente un anticuerpo a un receptor interleukin-6 (IL-6R).

G. Angel

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/JP2004/006211

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K39/505 A61K39/395

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)
IPC 7 C07K

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 210 075 A (LOBL THOMAS J ET AL) 11 May 1993 (1993-05-11) column 23	1-5, 15, 28-32, 42, 55-59, 68
X	CHOY E H S ET AL: "Therapeutic benefit of blocking interleukin-6 activity with an anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in rheumatoid arthritis: a randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial." ARTHRITIS AND RHEUMATISM. DEC 2002, vol. 46, no. 12, December 2002 (2002-12), pages 3143-3150, XP002298379 ISSN: 0004-3591 page 3143	1-10, 13, 15-21, 26-37, 40, 42-48, 53-63, 66, 68-74, 79, 80

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in 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 document 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 claim 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

- *T* 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.
- *S* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 October 2004

Date of mailing of the international search report

22/10/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wagner, R

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NISHIMOTO ET AL: "Safety and efficacy of repetitive treatment with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody (MRA) in rheumatoid arthritis." ARTHRITIS AND RHEUMATISM, vol. 44, no. S9-191, 2002, pages S84-S84, XP002298380 abstract	4-10,13, 15, 31-37, 40,42, 58-63, 66,68
X	EP 1 074 268 A (KISHIMOTO TADAMITSU ; CHUGAI PHARMACEUTICAL CO LTD (JP)) 7 February 2001 (2001-02-07) paragraph '0017! paragraph '0034!	4-15, 31-42, 55-68
X	WO 97/10338 A (CHIRON CORP) 20 March 1997 (1997-03-20) page 22	1-5, 28-32, 55-59
X	WO 99/64070 A (OPHIDIAN PHARM INC) 16 December 1999 (1999-12-16) page 6, line 11	1-5, 28-32, 55-59
P,X	NISHIMOTO N ET AL: "Toxicity, pharmacokinetics, and dose-finding study of repetitive treatment with the humanized anti-interleukin 6 receptor antibody MRA in rheumatoid arthritis. Phase I/II clinical study" JOURNAL OF RHEUMATOLOGY 01 JUL 2003 CANADA, vol. 30, no. 7, 1 July 2003 (2003-07-01), pages 1426-1435, XP009037243 ISSN: 0315-162X page 1427	1-5, 28-32, 55-59
P,X、	MAINI & CHARISMA STUDY GROUP: "A double blind, randomised, parallel group, controlled, dose ranging study of the safety, tolerability, pharmacokinetics and efficacy of repeat doses of MRA given alone or in combination with methotrexate in patients with rheumatoid arthritis." ABSTRACT OF PRESENTATION AT EULAR, 2003, LISBON, 19 June 2003 (2003-06-19), page OP0002, XP002298382 Retrieved from the Internet: URL:http://mcic3.textor.com/cgi-bin/mc/pri ntabs.pl?APP=eular2003SCIE-abstract&TEMPLA TE=&keyf=1607&showHide=show&client=> 'retrieved on 2004-09-28! abstract	1-80

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/JP2004/006211

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	WO 2004/039826 A (CENTOCOR INC) 13 May 2004 (2004-05-13) page 44	1-5, 15, 22, 28-32, 42, 49, 55-59, 68, 75
P, X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 16 November 2003 (2003-11-16), NISHIMOTO NORIHIRO ET AL: "The long-term safety and efficacy of humanized anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody, MRA in multicentric Castleman's disease." XP002298386 Database accession no. PREV200400147710 abstract	1-5, 16-21, 28-32, 43-48, 55-59, 69-74
P, X	& BLOOD, vol. 102, no. 11, 16 November 2003 (2003-11-16), pages 646a-647a, 45TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY; SAN DIEGO, CA, USA; DECEMBER 06-09, 2003 ISSN: 0006-4971 abstract	1-5, 16-21, 28-32, 43-48, 55-59, 69-74
P, X	ITO HIROAKI ET AL: "A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease" GASTROENTEROLOGY, vol. 126, no. 4, April 2004 (2004-04), pages 989-996, XP002298383 ISSN: 0016-5085 page 990; table 1	1-5, 16-21, 28-32, 43-48, 55-59, 69-74
A	MAINI RAVINDER N ET AL: "Therapeutic efficacy of multiple intravenous infusions of anti-tumor necrosis factor alpha monoclonal antibody combined with low-dose weekly methotrexate in rheumatoid arthritis" ARTHRITIS AND RHEUMATISM, vol. 41, no. 9, September 1998 (1998-09), pages 1552-1563, XP002298384 ISSN: 0004-3591 page 1559	1-80

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/JP2004/006211

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BAERT FILIP ET AL: "Influence of immunogenicity on the long-term efficacy of infliximab in Crohn's disease." NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, vol. 348, no. 7, 13 February 2003 (2003-02-13), pages 601-608, XP009037271 ISSN: 0028-4793 page 607	1-80
A	WAGNER ET AL: "Consequences of immunogenicity to the therapeutic monoclonal antibodies ReoPro(TM) and Remicade (TM)" IMMUNOGENICITY OF THERAPEUTIC BIOLOGICAL PRODUCTS S. KARGER PUBLISHERS INC., 79 FIFTH AVENUE, NEW YORK, NY, 10003, USA; S. KARGER AG, CH-4009, P. O. BOX, BASEL, SWITZERLAND SERIES: DEVELOPMENTS IN BIOLOGICALS (ISSN 1424-6074 (ISSN PRINT)), 2003, pages 37-53, XP001183819 SYMPOSIUM ON IMMUNOGENICITY OF THERAPEUTIC BIOLOGICAL PRODUCTS; BETHESDA, MD, USA; OCTOBER 31-NOVEMBER 02, 2001 ISSN: 3-8055-7575-0 the whole document	1-80
A	US 6 270 766 B1 (FELDMAN MARC ET AL) 7 August 2001 (2001-08-07) column 6	1-80

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2004/006211

Box 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.: 55-80
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 55-80 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 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

Information on patent family members

International Application No

PCT/JP2004/006211

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5210075	A	11-05-1993	NONE
EP 1074268	A	07-02-2001	AU 754006 B2 31-10-2002
			AU 2748199 A 11-10-1999
			CA 2324115 A1 23-09-1999
			EP 1074268 A1 07-02-2001
			HU 0101694 A2 28-12-2002
			NO 20004581 A 10-11-2000
			PL 342938 A1 16-07-2001
			US 6723319 B1 20-04-2004
			CN 1297357 T 30-05-2001
			WO 9947170 A1 23-09-1999
			RU 2195960 C2 10-01-2003
			US 2004071706 A1 15-04-2004
WO 9710338	A	20-03-1997	AU 6961796 A 01-04-1997
			WO 9710338 A1 20-03-1997
WO 9964070	A	16-12-1999	AU 4556899 A 30-12-1999
			WO 9964070 A1 16-12-1999
WO 2004039826	A	13-05-2004	WO 2004039826 A1 13-05-2004
			BR 0214168 A 14-09-2004
			CA 2467719 A1 13-05-2003
US 6270766	B1	07-08-2001	WO 9509652 A1 13-04-1995
			AU 719015 B2 04-05-2000
			AU 3703597 A 25-02-1998
			CA 2261630 A1 12-02-1998
			EP 0914157 A1 12-05-1999
			WO 9805357 A1 12-02-1998
			US 2002010180 A1 24-01-2002
			US 2002136723 A1 26-09-2002
			AU 6149594 A 01-05-1995
			EP 0765171 A1 02-04-1997
			JP 9510952 T 04-11-1997
			US 6770279 B1 03-08-2004
			US 2002068057 A1 06-06-2002
			AT 155043 T 15-07-1997
			AU 5152293 A 09-05-1994
			CA 2146647 A1 28-04-1994
			DE 69312077 D1 14-08-1997
			DE 69312077 T2 30-10-1997
			EP 0663836 A1 26-07-1995
			WO 9408619 A1 28-04-1994
			JP 8505365 T 11-06-1996
			US 5741488 A 21-04-1998

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
JAPONDate of mailing (day/month/year)
01 September 2005 (01.09.2005)Applicant's or agent's file reference
P745-PCT

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/JP2004/006211International filing date (day/month/year)
28 April 2004 (28.04.2004)Priority date (day/month/year)
28 April 2003 (28.04.2003)

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 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
11 November 2004 (11.11.2004)

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, JP, 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

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
JAPONDate of mailing (day/month/year)
11 November 2004 (11.11.2004)Applicant's or agent's file reference
P745-PCT

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/JP2004/006211International filing date (day/month/year)
28 April 2004 (28.04.2004)Priority date (day/month/year)
28 April 2003 (28.04.2003)

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 11 November 2004 (11.11.2004) under
No. WO 2004/096273copy of international application as republished by the International Bureau on under
No. WOFor 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

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

INFORMATION CONCERNING ELECTED
OFFICES NOTIFIED OF THEIR ELECTION

(PCT Article 31(7) and Rule 61.3)

To:

AOKI, Atsuehi
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) 02 December 2004 (02.12.2004)		
Applicant's or agent's file reference P745-PCT		
IMPORTANT INFORMATION		
International application No. PCT/JP2004/006211	International filing date (day/month/year) 28 April 2004 (28.04.2004)	Priority date (day/month/year) 28 April 2003 (28.04.2003)
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al		

- The applicant is hereby informed that the International Bureau has, according to Article 31(7), notified each of the following Offices of its election:
EP: AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR
National: BG, CA, CN, CZ, DE, JP, KP, KR, MN, NO, PL, RO, RU, SK, US
- The following Offices have waived the requirement for the notification of their election; the notification will be sent to them by the International Bureau only upon their request:
AP: BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW
EA: AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM
OA: BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG
National: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BR, BW, BY, BZ, CH, CO, CR, CU, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MW, MX, MZ, NA, NI, NZ, OM, PG, PH, PT, SC, SD, SE, SG, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW
- Since the election(s) was (were) made before the expiration of 19 months from the priority date, the applicant is reminded that he must enter the "national phase" before the expiration of 30 months from the priority date before each of the Offices listed above. This must be done by paying the national fee(s) and furnishing, if proscribed, a translation of the international application (Article 39(1)(a)), as well as, where applicable, by furnishing a translation of any annexes of the international preliminary report on patentability (Chapter II of the Patent Cooperation Treaty) (Article 36(3)(b) and Rule 74.1).
Some Offices have fixed time limits expiring later than the above-mentioned time limit. See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, the *PCT Newsletter* and the WIPO Internet site, updated regularly.

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

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P745-PCT	FOR FURTHER ACTION	See Form PCT/PEA/16
International application No. PCT/JP2004/006211	International filing date (day/month/year) 28.04.2004	Priority date (day/month/year) 28.04.2003
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K39/505, A61K39/395		
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA et al.		
1. This report is the international preliminary examination report, established by this international Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36. 2. This REPORT consists of a total of 9 sheets, including this cover sheet. 3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising: a. ☐ sent to the applicant and to the international Bureau) a total of sheets, as follows: ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 807 of the Administrative Instructions). ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box. b. ☐ (sent to the international Bureau only) a total of (Indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in computer readable form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).		
4. This report contains indications relating to the following items: ☒ Box No. I Basis of the opinion ☐ Box No. II Priority ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability ☐ Box No. IV Lack of unity of invention ☒ Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement ☐ Box No. VI Certain documents cited ☐ Box No. VII Certain defects in the international application ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application		
Date of submission of the demand 30.08.2004	Date of completion of this report 08.07.2005	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80288 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523856 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4485	Authorized Officer Wagner, R Telephone No. +49 89 2399-7357	

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

136

International application No.
PCT/JP2004/006211

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the language, this report is based on the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
- ☐ This report is based on translations from the original language into the following language, which is the language of a translation furnished for the purposes of:
- ☐ international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
 - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4)
 - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2 and/or 55.3)
2. With regard to the elements* of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-40 as originally filed

Claims, Numbers

1-80 as originally filed

- ☐ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing
3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (specify):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (specify):
4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
- ☐ the description, pages
 - ☐ the claims, Nos.
 - ☐ the drawings, sheets/figs
 - ☐ the sequence listing (specify):
 - ☐ any table(s) related to sequence listing (specify):

* If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

127

International application No.
PCT/JP2004/006211

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application,
- ☒ claims Nos. 1-5 (in part), 28-32 (in part), 55-59 (in part), 55-80 (IA)

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 55-80 (IA) relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (specify):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☒ no international search report has been established for the said claims Nos. 1-5 (in part), 28-32 (in part), 55-59 (in part)
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:

the written form

- ☐ has not been furnished
- ☐ does not comply with the standard

the computer readable form

- ☐ has not been furnished
- ☐ does not comply with the standard

- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

**INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT
ON PATENTABILITY**

128
International application No.
PCT/JP2004/006211

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	22-27,49-54,75-80
	No: Claims	1-21, 28-48, 55-74
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	1-80
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-54
	No: Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Re Item II

Priority

As the priority document of the present application is not available at the moment of the present preliminary examination, and thus considered as being valid, the non-patent documents identified as PX in the International Search Report are considered as not forming part of the prior art.

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The scope of claims 1-5, 28-32, 55-59 is not clear (Article 6 PCT) because the interleukin-6 antagonists is a functional definition which does not allow to determine which substances fall within the scope of said claims. In order to determine the scope of the claims the skilled person is faced with the undue burden to test all existing and even not yet discovered compounds in regard to their inhibitory function on IL-6.

The search and the present examination is therefore limited to the interleukin-6 antagonists (page 8, lines 32-34): anti-IL-6 antibodies, anti-IL-6R antibody, anti-gp 130 antibody, modified IL-6, modified soluble IL-6R, partial peptides of IL-6 or IL-6R. The low molecular weight substances (page 8, line 35) do not represent a meaningful limitation which would allow the skilled person to determine which further compounds are included in the scope of the claims, therefore small molecules are also excluded from the search and examination.

2. Claims 55-80 relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(I) PCT).

Re Item V

Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

Reference is made to the following documents:

D1: US5210075

D2: Choy et al., Arthritis and Rheumatism, Vol. 46, No. 12, 2002, pp.3143-3150

D3: Nishimoto et al., Abstract 199, page S84, vol. 44, issue S9, Arthritis and Rheumatism

D4: EP1074268

D5: WO9710338

D6: WO9964070

1. For the assessment of the present claims 55-80 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however; claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.
2. Claims 4,5,31,32,58,59 are limited by the concept of high dose. Said feature is relative and vague (Article 6 PCT) and does not represent a limitation to the scope of said claims.
3. Claims 29 and 30 are not clear (Article 6 PCT). The wording of said claims does not allow to determine which compound is actually enhancing (claim 29) or reducing the allergic reaction. Claim 29 is interpreted as being to the use of an IL-antagonist and an immunosuppressant for the production of a pharmaceutical composition for the treatment of IL-6 related diseases. It must be underlined, that the treatment of IL-6 related diseases does not represent a limitation of the use.

Claim 30 is interpreted as being to the use of an immunosuppressant for the production of a pharmaceutical composition for the reduction or prevention of allergic reactions against IL-6 antagonists.

4. D1 discloses the use of interleukin-6 antagonist peptides in combination with immunosuppressants for the treatment of IL-6 mediated diseases, like rheumatoid arthritis (columns 23, 29). As the co-administration of the immunosuppressants inherently increases the anti-inflammatory effect of an anti-IL6 antagonist and inherently reduces a possible immune reaction against an administered antibody, the subject-matter of claims 1-5, 28-32 (see also section 3), 55-59 and 15, 42, 68 is not novel (Article 33(2) PCT).
5. D2 discloses a treatment of rheumatoid arthritis by using a anti-IL-6 receptor antibody (MRA). One group of patients receives a dose of 10 mg/kg of MRA and the patients were allowed to take prednisolone at a daily dose inferior to 7.5 mg. Therefore D2 anticipates the subject-matter of claims 1-10, 13, 15-22, 28-37, 40, 42-48, 55-63, 66, 68-74 (Article 33(2) PCT). D2 does not disclose whether the MRA antibody is administered simultaneously with the prednisolone or not. As the administration schedule of the anti IL6-R antibody and the immuno-suppressant does not have any surprising effect, the subject-matter of claims 26, 27, 53, 54, 79, 80 does not involve an inventive step with regard to D2 (Article 33(3) PCT).
6. D3 discloses a clinical study in which an anti-IL6R antibody is administered at a dose of 2, 4 or 8 mg/kg/2 weeks for the treatment of rheumatoid arthritis. Therefore the D3 anticipates the subject-matter of claims 4-10, 13, 15, 31-37, 40, 42, 58-63, 66, 68 (Article 33(2) PCT).
7. D4 discloses anti-IL6 R antibodies PMI and MR16-1 [0034] to be administered at doses between 0.01 and 100 mg/kg [0117] for the treatment of ulcerative colitis or Crohn's disease. As the concept of high doses is relative and cannot be regarded as a distinctive feature, D4 anticipates the subject-matter of claims 4-15, 31-42, 55-68 (Article 33(2) PCT).
8. D5 (page 22) discloses a combination therapy with IL-6 receptor antagonists (IL-6 muteins) and anti-TNF antibodies in the treatment of sepsis. Anti-TNF antibodies are immunosuppressants according to the description (infliximab, page 7, line 5) and therefore D5 anticipates the subject-matter of claims 1, 2, 3, 4, 5, 28-32, 55-59 (Article 33(2) PCT). D6 (page 6, line 11) discloses a combination of anti-IL6 antibodies and anti-TNF antibodies for the treatment of sepsis, therefore D6 anticipates the subject-matter of the same claims.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/JP2004/006211

9. The subject-matter of claims 22-25, 49-52, 75-78 is novel because the prior art, published prior to the priority date (considered to be valid) of the present application does not disclose the combination of an "IL-6 antagonist" and methotrexate. D2 is to be considered as the closest prior art in which the treatment of rheumatoid arthritis by anti-IL6 receptor antibodies is disclosed. The difference between the present claims 22, 49 and 75 and the disclosure of D2 resides in the fact that in the present claims methotrexate is combined to the antibodies. The technical problem to be solved is the choice of a combination partner for the anti-IL6 receptor antibody, which would achieve a synergic effect (page 2, lines 32-34 of description) or which would reduce or prevent allergic reaction, i.e. antibody formation, against the IL6-R antibody. As the present application does not disclose any data showing that one of the effects has been achieved, an inventive step cannot be acknowledged for the subject-matter of claims 22-25, 49-52, 75-78 (Article 33(3) PCT).

Further Remarks:

10. In claims 11, 12, 14, 38,39,41,64,65,67 antibodies are designated by internal denominations. In order to avoid a lack of clarity said antibodies should be identified by their respective deposit accession numbers cited on page 10 of the description.
11. Claims 25, 26, 53 and 54 are not clear (Article 6 PCT) because they refer to an anti-IL6 antibody, but are dependent on claims directed to anti- IL6 receptor antibodies.
12. The expression "immunosuppressants" is not clear (Article 6 PCT) because the skilled person is not aware of a possible immunosuppressant effect of all existing compounds.

Re Item VI

Certain documents cited

Certain published documents might be relevant for novelty in a future regional/national phase.

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
REPORT ON PATENTABILITY
(SEPARATE SHEET)**

International application No.
PCT/JP2004/006211

Application No Patent No	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO 04/039826	13.05.2004	26.10.2002	26.10.2002

124

〔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

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される

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.

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

大阪府富田林市中西町 3 丁目 5 番 3 1 号

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)

微生物研究系 2998 号

(FERM BP- 2998)

II. 科学的性質及び分類学上の位置

1 箇の微生物には、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、平成 元年 7 月 12 日 (原寄託日) に受領した 1 箇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系 P- 10839 号より移管)

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 for Science and Technology Research Institute

所長 鈴木智

Tomoo

DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県つくば市 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

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

135
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 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: PMI

FERM BP-2998

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
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

136

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) 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 桶の微生物には、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	
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桶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桶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 達夫 Michio Oishi, D. Sc., DIRECTOR GENERAL. あて名: 日本国茨城県つくuba-shi Ibaraki-ken 1-3, Higashi-tokuba-shi Ibaraki-ken 305, JAPAN 平成 9 年 (1997) 3月13日	

Depositor
Name: CHUGAI SEIYAKU
KABUSHIKI KAISHA
Representative: Osamu Nagayama

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

137
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 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)

岸本 忠三

寄託者

殿

あ て 名 ⑤ 584

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-p1B1BSF2R

(受託番号)

微工研条寄第 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 昭和 64 年 9 月 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 Biological 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 3 0 5)

1989) 1 月 9 日

DEPOSITOR
Name Tadamitsu Kishimoto

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

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 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

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
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:	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.

**BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
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.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT

(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl:	A61K 38/505			
22) Fecha de solicitud:	(71) Solicitante(s)	CHUGAI SEYAKU KABUSHIKI KAISHA			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País	OSAMU OKUDA RAVINDER NATH MAINI NORIAKI YOSHIDA	
	0309819.5	28/04/2003	GB		
(72) Inventor(es)				EMILIO FERRERO	
(74) Apoderado:					
(85) Fecha límite inicio fase nacional:	28 de Noviembre 2005			(87) Publicación Internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT				Fecha:	11 de Noviembre 2004
Fecha de presentación de la solicitud:	28/04/2004			N° publicación:	WO2004/096273 A1
No. de solicitud PCT/JP2004/006211					
(54) Título: METODOS PARA TRATAR ENFERMEDADES RELACIONADAS CON INTERLEUKIN-8					

Reivindicación(ea):

1. Una composición farmacéutica para el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6, que comprende un antagonista de interleukin 6 (antagonista IL-6) e inmunosupresores.
2. Una composición farmacéutica que comprende Inmunosupresores, para mejorar el efecto en el uso de antagonista IL-6 para el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6.
3. Una composición farmacéutica que comprende inmunosupresores, para la reducción o prevención de reacciones alérgicas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6 con un antagonista IL-6.
4. Un agente terapéutico para la administración a dosis altas, que incorpora un antagonista IL-6.
5. Una composición farmacéutica que comprende dosis altas de antagonista IL-6, para la reducción o prevención de reacciones alérgicas en el tratamiento de enfermedades relacionadas con IL-6.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el mencionado antagonista IL-6 es un anticuerpo receptor anti-interleukin-6 (anticuerpo IL-6R).
7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el mencionado anticuerpo IL-6R es un anticuerpo monoclonal contra IL-6R.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, en donde el mencionado anticuerpo anti-IL-6R es un anticuerpo monoclonal contra IL-6R humano.
9. La composición farmacéutica de acuerdo con las reivindicaciones 6 o 7, en donde el mencionado anticuerpo anti IL-6R es un anticuerpo monoclonal contra IL-6R de ratón.
10. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 9, en donde el mencionado anticuerpo anti IL-6R es un anticuerpo recombinado.
11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el mencionado anticuerpo monoclonal anti IL-6R humano es el anticuerpo PM-1.
12. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en donde el mencionado anticuerpo monoclonal IL-6R de ratón es el anticuerpo MR18-1.

13. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, en donde el mencionado anticuerpo anti IL-6R es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de tipo humano contra IL-6R.
14. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el mencionado anticuerpo humanizado contra IL-6R es el anticuerpo PM-1 humanizado.
15. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde las mencionadas enfermedades relacionadas con IL-6 son artritis reumatoide, plasmacitosis, hiperinmunoglobulinemia, anemia, nefritis, caquexia, mieloma múltiple, enfermedad del ganadero, nefritis proliferativa mesangial, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa, pancreatitis, soriasis, artritis idiopática juvenil o artritis idiopática juvenil sistémica, vasculitis y enfermedad de Kawasaki.
16. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y las reivindicaciones 6 a 15, en las cuales la mencionada composición farmacéutica que contiene inmunosupresores o la mencionada composición farmacéutica que contiene el anticuerpo y el inmunosupresor, donde una dosificación de anticuerpo anti-IL-6R es desde 0.02 a 150 mg/kg/4 semanas o la dosificación que muestre una concentración de anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.
17. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la dosificación de anticuerpo anti-IL-6R es desde 0.5 a 30 mg/kg/4 semanas o la dosificación que muestre una concentración del anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.
18. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la dosificación de anticuerpo anti-IL-6R es de 2 a 8 mg/kg/4 semanas o la dosificación que muestre una concentración de anticuerpo anti-IL-6R en la sangre equivalente a eso.

143

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 000176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 78,312
FECHA : OCTUBRE 10 DE 2005

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 05109276 00000000 Folia: 143
Fecha (FPO) : 2005-10-26 17:10:56
Tramite : 011 PCI-PATENT 379 FASE NRC 411 PRESENCIAL
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	31556192	10/10/2005	37,664,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	9 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Gib 4419-841-002-5