



Industria y Comercio
S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial
Division de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06 44336

21 EXPEDIENTE No

54 TÍTULO AGENTE TERAPEUTICO PARA EL MESOTELIOMA

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61M 45/00, 39/395, A61P 35/00

71 SOLICITANTE CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI

DOMICILIO TOKIO, JAPON

74 APODERADO EMILIO FERRERO
C.C 438 019 de Usaquén

22 BOGOTÁ, D C ,

**Industria y Comercio**

SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 08-044338-00000-0000 Fax: 2008-05-10 17:30:41

Dep. 2020 NUECREACIONES

Tra: 11 PATENTEYII Evs 378 FASENACIONALI

Act 411 PRESENTACION Folios: 167

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE**PCT****ENTRADA EN FASE NACIONAL**

17-05-06

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, Ukima 5-Chome,
Kita-ku,
Tokio 115-8543
JapónDomicilio: Tokio 115-8543
Japón**IDENTIFICACIÓN**C.C. ☐NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número

3

**REPRESENTANTE
APODERADO**Nombre: **EMILIO FERRERO**

Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35

Teléfono: 347 38 11

Fax: 211 86 50

E-mail: clientes@camyp.com.

Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓNC.C. ☒NIT ☐C.E. ☐Otro ☐

Cual

Número 438.019 T.P 31.929

4

**INVENTOR (ES)
(72)**

1. Norihito NISHIMOTO

4-8-9-804, Nyoidani,

Minoh-shi

Osaka 582-0011

Japón

3. Yasuo ADACHI

c/o Laboratory of Immune Regulation

Graduate School of Frontier Biosciences

Osaka University

1-3, Yamadaoka, Suita-shi,

Osaka 585-0871

Japón

2. Tadamitsu KISHIMOTO

3-5-31, Nakanocho

Tondabayashi-shi

Osaka 584-0021

Japón

4. Koichi TAKAYAMA

c/o Respiratory Clinic

Kyushu University Hospital

3-1-1, Maidashi, Higashi-ku,

Fukuoka-shi,

Fukuoka 812-8582

Japón

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/JP2004/015874Fecha: 15 de octubre de 2004Publicación Internacional No. WO 2005/037315 A1Fecha: 28 de abril de 2005

6

Título (54)**AGENTE TERAPEUTICO PARA EL MESOTELIOMA**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 45/00, 39/395, A61P 35/00

8

PrioritySI ☒ NO ☐**(33) País de Origen**JP**(32) Fecha**17 de octubre de 2003**(31) Número de Solicitud**2003-358152

9

Comprobante de pago No.: 06- 34,622

Fecha: 10 de mayo de 2006

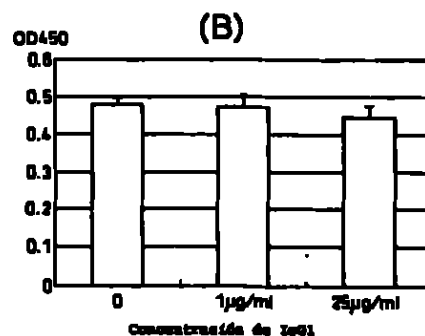
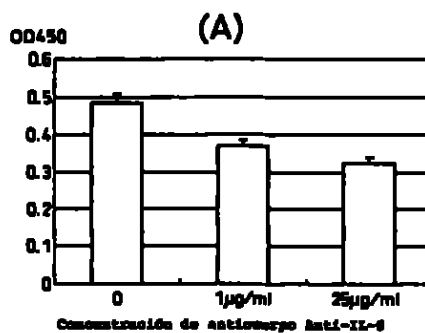
10

Anexos:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463.000.00.
- ☐ 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:

Emilio Ferrero

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

JDF

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2005/037315 A1
2. ☒ **Forma PCT/ISA/210**. Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Extracto de publicación.

CAVELIER

179

ABOGADOS
EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-35
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

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

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

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER-OF-ATTORNEY

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

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 4ª 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 aquel. 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 cese la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplente, 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.

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 contenciosos administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos

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 4ª 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 taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact of its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

In addition, we grant a Power-of-Attorney to the above named attorneys-at-law so that they may obtain the interpretation of my (our) industrial property rights against the 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 contencioso, 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

10 MAY 2006

COMO NOTARIO SEXTO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

10 MAY 2006

PABLO MENDEZ SANCIA
NOTARIO (E)

[Handwritten signature]



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

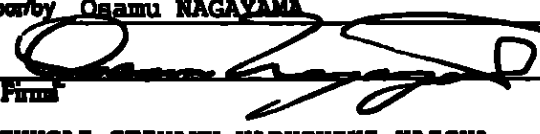
the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

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

en/in Tokyo, Japan

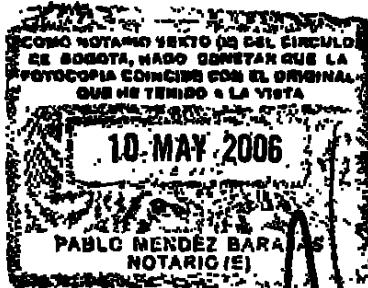
por/by Ogamu NAGAYAMA

President, CEO


Name Signature

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA







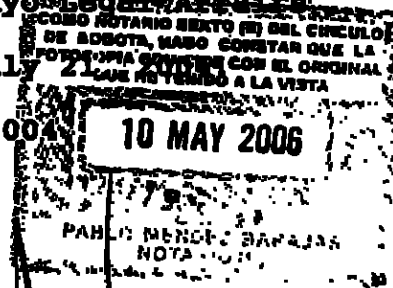
Registration No 561 of 2001

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, Ukina 5-chome, Kita-ku, Tokyo, Japan has stated in my very presence that said Osamu NAGAYAMA acknowledges himself to have signed the attached Power of Attorney in compliance with the authority bestowed on him as President, CEO of CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA.

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

Dated this 7th day of October, 2004



Norio Akiyama
Notary Public Norio Akiyama



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



RECEIVED
MAY 10 2006

COMO NOTARIO SECTO (R) DEL CIRCULO
DE SOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA

10 MAY 2006

PABLO MENDE BARAJAS
NOTARIO (E)

RECEIVED
MAY 10 2006



平成16年登録第

561 号

認 証

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

よって、これを認証する。

平成16年 10 月 7 日、本公証人役場において

東京都中央区日本橋兜町1番10号

東京法務局所属

公 証 人

Notary

Norio Akiyama
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

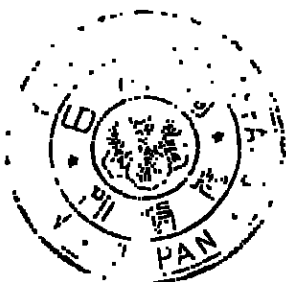
6. OCT. 7, 2004

7. by the Ministry of Foreign Affairs

8. 04- NO 003170

9. Seal/stamp:

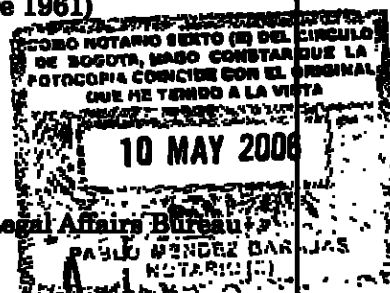
10. Signature



S. Hagiwara

Shinichi HAGIWARA

For the Minister for Foreign Affairs



9

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.

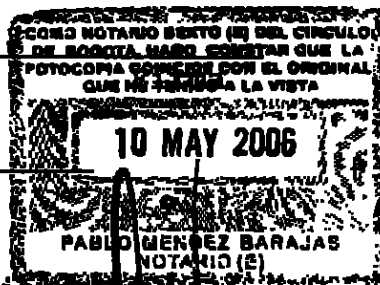
Dado y firmado el 16 de Septiembre de 2004 en Tokio, Japón, por Osamu NAGAYAMA, Presidente y Director Ejecutivo.

Firma Ilegible
Firma
CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

Registro No. 561 de 2001

Certificado Notarial

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



Expedido hoy 7 de Octubre de 2004

Firma ilegible
Notario Público Norio Akiyama

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

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

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

APOSTILLA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: JAPÓN

Este documento público

2. ha sido firmado por Norio Akiyama

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

4. lleva el sello/estampilla de

5. en Tokio

6. OCT 7 2004

7. por el Ministerio de Relaciones Exteriores

8. 04 - No. 003170 ✓

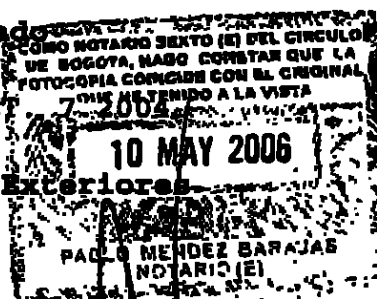
9. Sello/estampilla

10. Firma:

Firma Ilegible

Shinichi HAGIWARA

Por el Ministro de Relaciones Exteriores

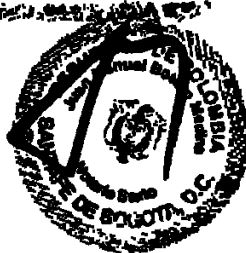


Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

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

Diego F. Vargas Z.
DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999²

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE BOGOTA
 BOGOTA HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRM(A)S
[Firma]
 CONCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
 EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
 SANTIPE DE BOGOTA.
 15 OCT 2004



NO SE ASUME
 RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2004 OCT 15 P 12:46

[Firma]
 JEFE DE LEGALIZACIONES
 SANTIPE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
 EXTERIORES

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

COMO NOTARIO SEXTO (6) DEL CIRCULO
 DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
 FOTOCOPIA CONCIDE CON EL ORIGINAL
 QUE HE TENIDO A LA VISTA
 10-MAY 2006
 ELO MENDEZ BARAJAS
 NOTARIO (E)

(19) 世界知的所有権機関
国際 事務局



(43) 国際公開日
2005 年 4 月 28 日 (28.04.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/037315 A1

(51) 国際特許分類: A61K 45/00, 39/395, A61P 35/00
(21) 国際出願番号: PCT/JP2004/015674
(22) 国際出願日: 2004 年 10 月 15 日 (15.10.2004)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ:
特願 2003-358152
2003 年 10 月 17 日 (17.10.2003) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 西本 憲弘 (NISHI-MOTO, Norihiro) [JP/JP]; 〒5620011 大阪府箕面市如意谷 4-8-9-804 Osaka (JP). 岸本 忠三 (KISHIMOTO, Tadamiatsu) [JP/JP]; 〒5840021 大阪府富田林市中野町 3-5-31 Osaka (JP). 安達 康雄 (ADACHI, Yasuo) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1-3 大阪大学大学院生命機能科学研究科免疫制御学講座内 Osaka (JP). 高山 浩一 (TAKAYAMA, Koichi) [JP/JP]; 〒8128582 福岡県福岡市東区馬出 3-1-1 九州大学病院呼吸器科内 Fukuoka (JP).

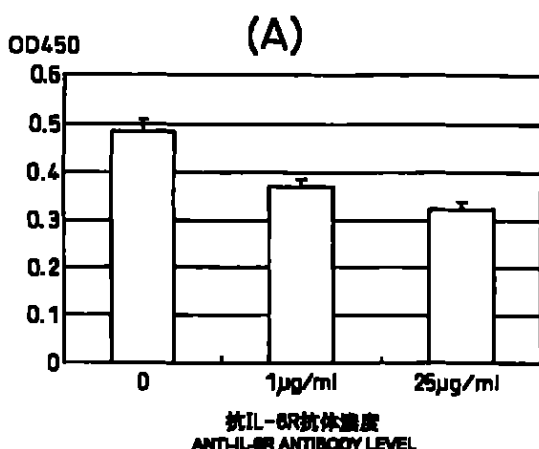
(74) 代理人: 青木 篤, 外 (AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目 5 番 1 号 虎ノ門 37 森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,

(続葉有)

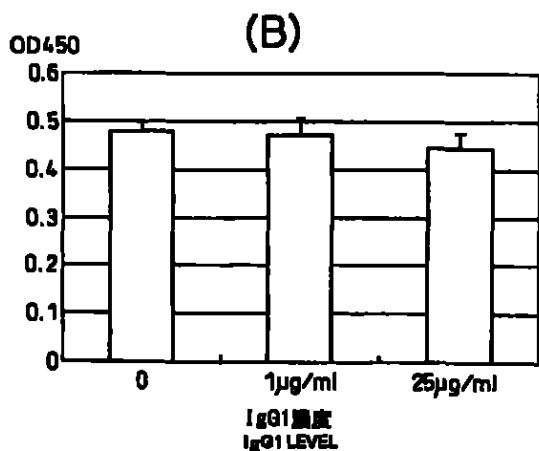
(54) Title: THERAPEUTIC AGENT FOR MESOTHELIOMA

(54) 発明の名称: 中皮腫治療剤



(57) Abstract: A therapeutic agent for mesothelioma, comprising an interleukin-6 (IL-6) antagonist, for example, an antibody against IL-6 receptor (IL-6R); and a mesothelioma cytostatic agent comprising an IL-6 antagonist, for example, an antibody against IL-6R.

(57) 要約: インターロイキン-6 (IL-6) アンタゴニスト、例えば IL-6 受容体 (IL-6R) に対する抗体を含んで成る中皮腫治療剤、及び IL-6 アンタゴニスト、例えば IL-6R に対する抗体を含んで成る中皮腫細胞増殖抑制剤。



WO 2005/037315 A1

DESCRIPTION

MESOTHELIOMA THERAPEUTIC AGENT

5

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to a novel mesothelioma therapeutic agent and mesothelioma cell inhibitor.

10

BACKGROUND ART

Mesothelioma is a tumor that occurs in the mesothelium that covers the surface of the pleura, peritoneum and pericardium that respectively envelop the organs of the chest cavity such as the lungs and heart, and abdominal organs such as the digestive tract and liver. In the case of diffuse pleural mesothelioma, chest pain is caused by invasion of the intercostals nerves on the side of the chest wall pleura, and respiratory and circulatory disorders may occur due to tumor growth and accumulation of pleural fluid in the pleura on the organ side (Takagi, Journal of Clinical and Experimental Medicine, (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp. 469-472, 1999). There is eventually proliferation into the adjacent mediastinal organs, progressing to direct invasion of the heart or development into the abdominal cavity by means of the diaphragm, or there may be development outside the chest cavity as a result of additional lymphatic or circulatory metastasis (ibid).

30

In the U.S., diffuse pleural mesothelioma is reported to occur in 3,000 persons annually, the number of cases began to increase prominently in the 1980s, and is frequently observed in men in their sixties, with the incidence in men being roughly five times that in women (Takagi, Journal of Clinical and Experimental Medicine (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp. 469-472, 1999). According to recent reports in the U.S. and

35

Europe, the incidence of mesothelioma is demonstrating a rapidly increasing trend, and based on epidemiological statistics from the U.K. in 1995, the number of deaths from mesothelioma is predicted to continue to increase over the next 25 years, and in the worst possible scenario, has been indicated as having a risk to the extent of accounting for 1% of all deaths among men born in the 1940s (Nakano, Respiration, Vol. 18, No. 9, pp. 916-925, 1999).

Numerous different classifications of the clinical disease stages have been used for mesothelioma, and since the methods for classifying the disease stage used differ, previous therapeutic reports on mesothelioma have encountered difficulties when comparing the results of treatment (Nakano, Respiration, Vol. 18, No. 9, pp. 916-925, 1999). An international TNM classification for malignant pleural mesothelioma in 1995 by the International Mesothelioma Interest Group (IMIG) (Nakano, Respiration, Vol. 18, No. 9, pp. 916-925, 1999).

In addition, malignant mesothelioma has a causative relationship with exposure to asbestos, and this has also been demonstrated in animal experiments (Tada, Journal of Clinical and Experimental Medicine (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp. 406-408, 1999). Asbestos that has been inhaled into the respiratory tract reaches a location directly beneath the pleura where a tumor eventually develops due to chronic irritation for at least about 20 years, and this tumor spreads in a thin layer over the entire surface of the pleura (Takagi, Journal of Clinical and Experimental Medicine (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp. 469-472, 1999). Consequently, although malignant mesothelioma is classified as an asbestos-related disease, not all malignant mesothelioma is caused by asbestos, and well-documented exposure is only observed in about half of all patients (Tada, Journal of Clinical and Experimental Medicine (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp.

406-408, 1999).

Malignant pleural mesothelioma is resistant to treatment, is associated with an extremely poor prognosis, and requires that countermeasures be taken immediately (Nakano, Respiration, Vol. 18, No. 9, pp. 916-925, 1999). For example, although the folic acid antagonist, methotrexate (MTX), has a satisfactory efficacy rate of 37% in large-dose single treatment in combination with leucovin, its use has not proliferated due to the technical difficulty associated with application to mesothelioma that causes retention of a large amount of pleural fluid (Nakano, Journal of Clinical and Experimental Medicine (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp. 570-573, 2003). In addition, although pleuropulmonary excision and pleurectomy are performed for diffuse pleural mesothelioma, there is increased susceptibility to relapse following treatment, and the post-surgical local relapse rate in particular is high at 35-43% (Takagi, Journal of Clinical and Experimental Medicine (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp. 469-472, 1999).

Numerous human mesothelioma cell lines and several mouse mesothelioma cell lines are known to express IL-6 in vitro, and in mice transplanted with mouse mesothelioma cell line AB22, which expresses a high level of IL-6, IL-6 has been reported to be detected in serum prior to cancer cell growth, clinical symptoms and changes in peripheral blood lymphocyte tissue (Bielefeldt-Ohmann, Cancer Immunol. Immunother. 40: 241-250, 1995). In addition, serum IL-6 levels in patients with malignant pleural mesothelioma are higher in comparison with pulmonary adenoma patients complicated with pleural effusion, and with respect to thrombocytosis, which is one of the clinical symptoms of malignant pleural mesothelioma, there is known to be a remarkable correlation between serum IL-6 levels and platelet counts (Nakano, British Journal of Cancer 77(6):

907-912, 1998). Moreover, the tumor cells of pleural mesothelioma patients express high levels of IL-6, and IL-6 levels in the serum have been reported to increase prior to death (Higashihara, Cancer, October 15, 1992, Vol. 70, No. 8, pp. 2105-2108).

As a result of administering rat anti-mouse IL-6 antibody (6B4) to mouse transplanted with AB22 at the rate of twice a week, Bielefeldt-Ohmann, et al. reported that effects were observed that considerably diminished the onset and progression of clinical symptoms (Bielefeldt-Ohmann, Cancer Immunol. Immunother. 40: 241-250, 1995). However, according to a report by Bielefeldt, anti-IL-6 antibody does not have a direct growth inhibitory effect on AB22 in vitro, there were no differences observed in the postmortem appearances of mice treated with anti-IL-6 antibody and those not treated with said antibody, and tumor masses of considerable size were observed even in the treated mice (Bielefeldt-Ohmann, Cancer Immunol. Immunother. 40: 241-250, 1995). Namely, growth inhibition of mesothelioma by anti-IL-6 antibody has not been known both in vitro and in vivo.

Takagi, Journal of Clinical and Experimental Medicine (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp. 469-472, 1999

Nakano, Respiration, Vol. 18, No. 9, pp. 916-925, 1999

Tada, Journal of Clinical and Experimental Medicine (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp. 406-408, 1999

Nakano, Journal of Clinical and Experimental Medicine (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp. 570-573, 2003

Bielefeldt-Ohmann, Cancer Immunol. Immunother. 40: 241-250, 1995

Higashihara, Cancer, October 15, 1992, Vol. 70, No. 8, pp. 2105-2108

DISCLOSURE OF THE INVENTION

IL-6 antagonists were not known to act directly on mesothelioma and demonstrate growth inhibitory effects.

5 An object of the present invention is to provide a novel mesothelioma therapeutic agent (mesothelioma cell growth inhibitor) that contains an IL-6 antagonist as its active ingredient.

10 As a result of conducting extensive studies to develop a novel mesothelioma therapeutic agent that inhibits the growth of mesothelioma cells, the inventor of the present invention obtained the novel finding that the growth of mesothelioma cells can be inhibited by inhibiting or interrupting signal transmission relating
15 to IL-6, thereby leading to completion of the present invention.

Thus, the present invention provides a mesothelioma therapeutic agent that contains an interleukin-6 (IL-6) antagonist as its active ingredient.

20 In addition, the present invention also provides a growth inhibitor against mesothelioma cells that contains an interleukin-6 (IL-6) antagonist as its active ingredient.

25 The aforementioned mesothelioma is, for example, pleural mesothelioma, and more specifically, malignant pleural mesothelioma. Diffuse pleural mesothelioma is included in malignant pleural mesothelioma.

30 The aforementioned IL-6 antagonist is, for example, an antibody to IL-6 or an antibody to IL-6 receptor, and preferably a monoclonal antibody to IL-6 receptor. The aforementioned antibody to IL-6 receptor is particularly preferably a monoclonal antibody to human IL-6 receptor such as PM-1 antibody, or a monoclonal antibody to mouse IL-6 receptor such as MR16-1 antibody. The
35 aforementioned antibody to IL-6 receptor is preferably a recombinant antibody.

The aforementioned antibody to IL-6 receptor may be

a chimeric antibody, humanized antibody or human antibody. In the present invention, a particularly preferable antibody is humanized PM-1 antibody.

5 The present invention can also be in the forms indicated below.

(1) The use of an interleukin-6 (IL-6) antagonist to produce a mesothelioma therapeutic agent.

(2) The use according to (1) above in which the mesothelioma is pleural mesothelioma.

10 (3) The use according to (2) above wherein the pleural mesothelioma is malignant pleural mesothelioma.

(4) The use according to any of (1) through (3) above wherein the IL-6 antagonist is an antibody to IL-6 receptor.

15 (5) The use according to (4) above wherein the antibody to IL-6 receptor is a monoclonal antibody to IL-6 receptor.

(6) The use according to (4) above wherein the antibody to IL-6 receptor is a monoclonal antibody to human IL-6
20 receptor.

(7) The use according to (4) above wherein the antibody to IL-6 receptor is a monoclonal antibody to mouse IL-6 receptor.

25 (8) The use according to any of (4) through (7) above wherein the antibody to IL-6 receptor is a recombinant antibody.

(9) The use according to (6) above wherein the monoclonal antibody to human IL-6 receptor is PM-1 antibody.

30 (10) The use according to (7) above wherein the monoclonal antibody to mouse IL-6 receptor is MR16-1 antibody.

(11) The use according to any of (4) through (10) above wherein the antibody to IL-6 receptor is a chimeric
35 antibody, humanized antibody or human antibody to IL-6 receptor.

(12) The use according to (11) above wherein the

humanized antibody to IL-6 receptor is humanized PM-1 antibody.

(13) The use of an interleukin-6 (IL-6) antagonist to produce a growth inhibitor against mesothelioma cells.

5 (14) The use according to (13) above in which the mesothelioma is pleural mesothelioma.

(15) The use according to (14) above wherein the pleural mesothelioma is malignant pleural mesothelioma.

10 (16) The use according to any of (13) through (15) above wherein the IL-6 antagonist is an antibody to IL-6 receptor.

(17) The use according to (16) above wherein the antibody to IL-6 receptor is a monoclonal antibody to IL-6 receptor.

15 (18) The use according to (16) above wherein the antibody to IL-6 receptor is a monoclonal antibody to human IL-6 receptor.

20 (19) The use according to (16) above wherein the antibody to IL-6 receptor is a monoclonal antibody to mouse IL-6 receptor.

(20) The use according to any of (16) through (19) above wherein the antibody to IL-6 receptor is a recombinant antibody.

25 (21) The use according to (18) above wherein the monoclonal antibody to human IL-6 receptor is PM-1 antibody.

(22) The use according to (19) above wherein the monoclonal antibody to mouse IL-6 receptor is MR16-1 antibody.

30 (23) The use according to any of (16) through (22) above wherein the antibody to IL-6 receptor is a chimeric antibody, humanized antibody or human antibody to IL-6 receptor.

35 (24) The use according to (23) above wherein the humanized antibody to IL-6 receptor is humanized PM-1 antibody.

The present invention can also adopt the forms

indicated below.

(1) A treatment method for mesothelioma comprising:
administering an interleukin-6 (IL-6) antagonist to a
subject requiring that treatment.

5 (2) The method according to (1) above wherein the
mesothelioma is pleural mesothelioma.

(3) The method according to (2) above wherein the
pleural mesothelioma is malignant pleural mesothelioma.

10 (4) The method according to any of (1) through (3) above
wherein the IL-6 antagonist is an antibody to IL-6
receptor.

(5) The method according to (4) above wherein the
antibody to IL-6 receptor is a monoclonal antibody to IL-
6 receptor.

15 (6) The method according to (4) above wherein the
antibody to IL-6 receptor is a monoclonal antibody to
human IL-6 receptor.

(7) The method according to (4) above wherein the
antibody to IL-6 receptor is a monoclonal antibody to
20 mouse IL-6 receptor.

(8) The method according to any of (4) through (7) above
wherein the antibody to IL-6 receptor is a recombinant
antibody.

25 (9) The method according to (6) above wherein the
monoclonal antibody to human IL-6 receptor is PM-1
antibody.

(10) The method according to (7) above wherein the
monoclonal antibody to mouse IL-6 receptor is MR16-1
antibody.

30 (11) The method according to any of (4) through (10)
above wherein the antibody to IL-6 receptor is a chimeric
antibody, humanized antibody or human antibody to IL-6
receptor.

35 (12) The method according to (11) above wherein the
humanized antibody to IL-6 receptor is humanized PM-1
antibody.

(13) A method for inhibiting the growth of mesothelioma

cells comprising: administering an interleukin-6 (IL-6) antagonist to a subject requiring that inhibition.

(14) The method according to (13) above in which the mesothelioma is pleural mesothelioma.

5 (15) The method according to (14) above wherein the pleural mesothelioma is malignant pleural mesothelioma.

(16) The method according to any of (13) through (15) above wherein the IL-6 antagonist is an antibody to IL-6 receptor.

10 (17) The method according to (16) above wherein the antibody to IL-6 receptor is a monoclonal antibody to IL-6 receptor.

(18) The method according to (16) above wherein the antibody to IL-6 receptor is a monoclonal antibody to human IL-6 receptor.

15 (19) The method according to (16) above wherein the antibody to IL-6 receptor is a monoclonal antibody to mouse IL-6 receptor.

(20) The method according to any of (16) through (19) above wherein the antibody to IL-6 receptor is a recombinant antibody.

(21) The method according to (18) above wherein the monoclonal antibody to human IL-6 receptor is PM-1 antibody.

25 (22) The method according to (19) above wherein the monoclonal antibody to mouse IL-6 receptor is MR16-1 antibody.

(23) The method according to any of (16) through (22) above wherein the antibody to IL-6 receptor is a chimeric antibody, humanized antibody or human antibody to IL-6 receptor.

30 (24) The method according to (23) above wherein the humanized antibody to IL-6 receptor is humanized PM-1 antibody.

35

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Fig. 1 is a graph that shows the results of Example

1 by indicating the productivities of IL-6 by various malignant mesothelioma cell lines.

5 Fig. 2 is a graph that shows the results of Example 2 by indicating the productivities (lack thereof) of IL-6 receptor (IL-6R) by various malignant mesothelioma cell lines. Furthermore, GAPDH indicates the amount of mRNA of GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) used as an internal control.

10 Fig. 3 is a graph that shows the results of Example 3, wherein the production of vascular endothelial growth factor (VEGF) by malignant mesothelioma cell lines H2052 and H2452 is induced by IL-6 and IL-6R.

15 Fig. 4 is a graph that shows the results of Example 4 in which a similar experiment to Example 3 was conducted for malignant mesothelioma cell line H28 by indicating that this cell line produces vascular endothelial growth factor (VEGF) without requiring induction by IL-6/IL-6R.

20 Fig. 5 is a graph that shows the results of Example 5, wherein in contrast to phosphorylation of STAT3 due to stimulation by IL-6 being promoted in cell line H2025, in which production of VEGF is induced by IL-6, phosphorylation of STAT3 due to stimulation by IL-6 is not promoted in cell line H28, in which production of VEGF is not induced by IL-6.

25 Fig. 6 is a graph that shows the results of Example 6, wherein in contrast to expression of SOCS3 due to stimulation by IL-6 and IL-6R being induced in cell line H2025, in which production of VEGF is induced by IL-6, SOCS3 is non-inductively expressed in cell line H28, in which production of VEGF is not induced by IL-6.

30 Fig. 7 is a drawing showing the structure of a promoter of plasmids pGL3-VEGF and pGL3-VEGFmut along with its vicinity used in Example 7.

35 Fig. 8 is a graph that shows the results of Example 7, wherein in a system in which VEGF promoter is coupled to luciferase reporter gene, in the case of altering the

p-STAT3 binding site within the VEGF promoter, activation of the VEGF promoter by IL-6 does not occur.

Fig. 9 is a schematic drawing showing the mechanism of induction of VEGF promoter (production of VEGF) due to stimulation by IL-6 in cell line H2052 as predicted from the results of Examples 5 through 7.

Fig. 10 is a graph that shows the results of Example 8, wherein the growth of cell line H2052 increases IL-6 concentration-dependently in the presence of IL-6R.

Fig. 11 is a graph that shows the results of Example 9, wherein promotion of the growth of cell line H2052 by IL-6 and IL-6R is inhibited by MRA.

Fig. 12 is a graph that shows the results of Example 10, wherein the growth of cell line H226 increases IL-6 concentration-dependently in the presence of IL-6R, and that MRA demonstrates inhibitory effects on that growth.

Fig. 13 is a graph that shows the results of Experiment 8 by indicating that the growth of cell line H226 increases IL-6 concentration-dependently in the presence of IL-6R.

Fig. 14 is a graph that shows the results of Example 11, wherein growth promotion of malignant mesothelioma cell lines H2052 and H226 by IL-6 and soluble IL-6 receptor is inhibited by humanized PM-1 antibody.

Fig. 15 is a graph that shows the results of Example 12, wherein induction of VEGF production by IL-6 stimulation in the malignant mesothelioma cell lines MSTO, H226, H2052 and H2452 is inhibited by humanized PM-1 antibody.

Fig. 16 is a graph that shows the results of Example 13, wherein phosphorylation of STAT3 induced by IL-6/soluble IL-6R stimulation in the cell lines H2052 and H2452 is inhibited by humanized PM-1 antibody.

Fig. 17 is a graph that shows the results of Example 14, wherein promotion of the growth of the cell lines H2052 and H226 by IL-6 and soluble IL-6R stimulation is not inhibited by anti-VEGF antibody.

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

IL-6 is a cytokine also referred to as B cell stimulating factor 2 (BSF2) or interferon β 2. IL-6 was initially discovered to be differentiation factor involved in activation of B lymphocytic cells (Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76), after which it was determined to be a multifunctional cytokine having effects on the functions of various cells (Akira, S. et al., Adv. In Immunology (1993) 54, 1-78). IL-6 has also been reported to induce maturation of T lymphocytic cells (Lotz, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258).

IL-6 transmits its biological activity by means of various proteins on cells. One of these is the ligand-binding protein of IL-6 receptors having a molecular weight of about 80 kD (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981; Yamasaki, K. et al., Science (1987) 241, 825-828). In addition to existing in a membrane-bound form that is expressed on the cell membrane by penetrating the cell membrane, IL-6 receptors also exist as soluble IL-6 receptors mainly composed of an extracellular region.

Another of these a membrane protein gp130 having a molecular weight of about 130 kD that is involved in the signal transmission of non-ligand binding. IL-6 and IL-6 receptors form an IL-6/IL-6 receptor complex, and as a result of subsequently binding with gp130, the biological activity of IL-6 is transmitted into cells (Taga, T. et al., Cell (1989) 58, 573-581).

IL-6 antagonists are substances that inhibit the transmission of the biological activity of IL-6. Known examples of these IL-6 antagonists include antibody to IL-6 (anti-IL-6 antibody), antibody to IL-6 receptors (anti-IL-6 receptor antibody), antibody to gp130 (anti-gp130 antibody), IL-6 variant, and IL-6 or IL-6 receptor partial peptide.

There have been several reports regarding anti-IL-6

receptor antibody (Novick, D. et al., Hybridoma (1991) 10, 137-146; Huang, Y.W. et al., Hybridoma (1993) 12, 621-630; International Unexamined Patent Publication No. WO 95-09873; French Unexamined Patent Publication No. FR 2694767, and U.S. Patent No. US 521628). Humanized PM-1 antibody is known to be obtained by transplanting the complementarity determining region (CDR) of one of these in the form of mouse anti-PM-1 (Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906) to human antibody (International Unexamined Patent Publication No. WO 92-19759).

The aforementioned IL-6 antagonist is preferably an antibody to IL-6 receptor, and more preferably a monoclonal antibody to human IL-6 receptor or monoclonal antibody to mouse IL-6 receptor. An example of the aforementioned monoclonal antibody to human IL-6 receptor is PM-1 antibody, while an example of monoclonal antibody to mouse IL-6 receptor is MR16-1 antibody. The aforementioned antibody is preferably a chimeric antibody, humanized antibody or human antibody, an example of which is humanized PM-1 antibody.

There are particular limitations on the origin, type or form of the IL-6 antagonist used in the present invention provided it inhibits the growth of mesothelioma cells and is useful as an active ingredient of a mesothelioma therapeutic agent.

IL-6 antagonists are substances that inhibit the biological activity of IL-6 by interrupting signal transmission by IL-6. IL-6 antagonists are preferably substances that have inhibitory action against the binding of IL-6, IL-6 receptor and gp130. Examples of IL-6 antagonists include anti-IL-6 antibody, anti-IL-6 receptor antibody, anti-gp130 antibody, IL-6 variants, soluble IL-6 receptor variants, IL-6 receptor partial peptides and low molecular weight substances demonstrating similar activity.

Anti-IL-6 antibody used in the present invention can

be obtained as a polyclonal or monoclonal antibody using known methods. Monoclonal antibody of mammalian origin is particularly preferable for the anti-IL-6 antibody used in the present invention. Examples of monoclonal antibodies of mammalian origin include those produced by hybridomas and those produced by hosts transformed with an expression vector containing antibody gene using genetic engineering techniques. This antibody interrupts the transmission of the biological activity of IL-6 to cells as a result of inhibiting binding of IL-6 to IL-6 receptors by binding with IL-6.

Examples of these antibodies include MH166 (Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol. (1998) 18, 951-956), and SK2 antibody (Sato, K. et al., 21st General Meeting of the Japanese Society for Immunology, Academic Record (1991) 21, 166).

Anti-IL-6 antibody-producing hybridoma can basically be produced in the manner described below using known technology. Namely, this antibody can be produced by using IL-6 as a sensitizing antigen, immunizing with this in accordance with ordinary immunization methods, fusing the resulting immunocytes with known host cells according to ordinary cell fusion methods, and then screening for cells that produce monoclonal antibody according to ordinary screening methods.

More specifically, production of IL-6 antibody should be carried out in the manner described below. Human IL-6 used as sensitizing antigen for acquiring antibody is obtained by using the IL-6 gene/amino acid sequence disclosed in Eur. J. Biochem. (1987) 168, 543-550; J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541; or, Agr. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688.

After inserting the IL-6 gene sequence into a known expression vector system and transforming suitable host cells, the target IL-6 protein is purified by known methods from the host cells or culture supernatant, followed by using this purified IL-6 protein as a

sensitizing antigen. In addition, a fused protein consisting of IL-6 protein and another protein may also be used as sensitizing antigen.

5 The anti-IL-6 receptor antibody used in the present invention can be obtained in the form of a polyclonal antibody or monoclonal antibody using known means. Monoclonal antibody of mammalian origin is particularly preferable for the anti-IL-6 receptor antibody used in the present invention. Examples of monoclonal antibody
10 originating in mammalian cells include those produced by hybridomas and those produced in a host transformed with an expression vector that contains antigen gene by genetic engineering techniques. As a result of this antibody binding to IL-6 receptors, binding of IL-6 to
15 IL-6 receptors is inhibited, thereby interrupting the transmission of the biological activity of IL-6 to cells.

Examples of these antibodies include MR16-1 antibody (Tamura, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924-11928), PM-1 antibody (Hirata, Y. et al., J.
20 Immunol. (1989) 143, 2900-2906), AUK12-20 antibody, AUK64-7 and AUK146-15 antibody (International Unexamined Patent Publication No. WO 92-19759). Among these, PM-1 antibody is particularly preferable for use as the antibody.

25 Furthermore, a PM-1 antibody-producing hybridoma cell line has been internationally deposited based on the Budapest Treaty under the designation FERM BP-2988 on July 12, 1989 at the International Patent Organism Depository of the National Institute of Advanced
30 Industrial Science and Technology (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan) as PM-1. In addition, an MR16-1 antibody-producing hybridoma cell line has been internationally deposited based on the Budapest Treaty under the designation FERM BP-5875 on
35 March 13, 1997 at the International Patent Organism Depository of the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba Central 6, 1-

1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan) as Rat-mouse hybridoma MR16-1.

5 Anti-IL-6 receptor monoclonal antibody-producing hybridoma can basically be produced in the manner described below using known technology. Namely, this hybridoma can be produced by using IL-6 receptor as sensitizing antigen, immunizing with this in accordance with ordinary immunization methods, fusing the resulting immunocytes with known host cells according to ordinary
10 cell fusion methods, and screening for cells that produce monoclonal antibody according to known screening methods.

More specifically, anti-IL-6 receptor antibody should be produced in the manner described below. For example, human IL-6 receptor used as sensitizing antigen
15 for acquisition of antibody is obtained by using the IL-6 receptor gene/amino acid sequence disclosed in European Unexamined Patent Publication No. EP 325474, while mouse IL-6 receptor is obtained by using the IL-6 receptor gene/amino acid sequence disclosed in Japanese Unexamined
20 Patent Publication No. 3-155795.

There are two types of IL-6 receptor protein consisting of that which is expressed on the cell membrane and that which is released from the cell membrane (soluble IL-6 receptor) (Yasukawa, K. et al., J.
25 Biochem. (1990) 108, 673-676). Soluble IL-6 receptor antibody is substantially composed of the extracellular region of IL-6 receptor that binds to the cell membrane, and differs from membrane-bound IL-6 receptor in that it is missing a cell membrane-penetrating region or cell
30 membrane-penetrating region and intracellular region. IL-6 receptor protein may use either IL-6 receptor provided it can be used as sensitizing antigen for producing the anti-IL-6 receptor antibody used in the present invention.

35 After inserting the gene sequence of IL-6 receptor into a known expression vector system to transform suitable host cells, the target IL-6 receptor is purified

by known methods from the host cells or culture supernatant followed by using the purified IL-6 receptor protein as sensitizing antigen. In addition, a fused protein consisting of cells that express IL-6 receptor or
5 IL-6 receptor protein and another protein may also be used as sensitizing antigen.

Escherichia coli (*E. coli*) containing plasmid pIBBSF2R that contains cDNA encoding human IL-6 receptor has been internationally deposited based on the Budapest
10 Treaty under the deposit number FERM BP-2232 on January 9, 1989 at the International Patent Organism Depository of the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan) as HB101-pIBBSF2R.

15 Anti-gp130 antibody used in the present invention can be obtained in the form of polyclonal antibody or monoclonal antibody using known means. Monoclonal antibody of mammalian origin is particularly preferable.
20 for the anti-gp130 antibody used in the present invention. Monoclonal antibodies of mammalian origin include those produced by hybridomas and those produced in a host transformed with an expression vector that contains antibody gene by genetic engineering techniques.
25 This antibody inhibits binding of IL-6/IL-6 receptor complex to gp130 and interrupts the transmission of the biological activity of IL-6 to cells by binding with gp130.

Examples of these antibodies include AM64 antibody (Japanese Unexamined Patent Publication No. 3-219894),
30 4B11 antibody, 2H4 antibody (U.S. Patent No. 5571513) and B-P8 antibody (Japanese Unexamined Patent Publication No. 8-291199).

Anti-gp130 monoclonal antibody-producing hybridoma can basically be produced in the manner described below
35 using known technology. Namely, this hybridoma can be produced by using gp130 as a sensitizing antigen, immunizing with this in accordance with ordinary

immunization methods, fusing the resulting immunocytes with known host cells according to ordinary cell fusion methods, and screening for cells that produce monoclonal antibody according to ordinary screening methods.

5 More specifically, monoclonal antibody should be produced in the manner described below. For example, gp130 used as sensitizing antigen for acquiring antibody is obtained by using the gp130 gene/amino acid sequence disclosed in European Unexamined Patent Publication No.
10 EP 411946.

 After inserting the gene sequence of gp130 into a known expression vector system to transform suitable host cells, the target gp130 protein is purified from the host cells or culture supernatant by known methods, followed
15 by using the purified gp130 receptor protein as sensitizing antigen. In addition, a fused protein consisting of cells expressing gp130 or gp130 protein and another protein may also be used as sensitizing antigen.

 Although there are no particular limitations on the
20 mammal immunized with sensitizing antigen, it is preferably selected in consideration of compatibility with the host cells used for cell fusion, typical examples of which include rodents such as mice, rats and hamsters.

25 Immunization of the animal with sensitizing antigen is carried out in accordance with known methods. As a typical example of such a method, immunization is preferably carried out by injecting sensitizing antigen into the abdominal cavity or beneath the skin of a
30 mammal. More specifically, a suspension of sensitizing antigen diluted to a suitable amount with phosphate-buffered saline (PSB) or physiological saline is mixed with a suitable amount of an ordinary adjuvant such as Freund's complete adjuvant as desired followed by
35 emulsifying and administering several times to the mammal every 4 to 21 days. In addition, a suitable carrier can be used when immunizing with the sensitizing antigen.

After confirming that immunization has been carried out in this manner and the antibody level in serum has risen to a desired level, immunocytes are removed from the mammal and used for cell fusion. Spleen cells are a particularly preferable example of immunocytes used for cell fusion.

Various known cell lines such as P3X6Ag8.653 (Kearney, J. F. et al., J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415, SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270), FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35, 1-21), S194 (Trowbridge, I. S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323) or R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) are already suitably used as mammalian myeloma cells serving as the other host cells fused with the aforementioned immunocytes.

Fusion of the aforementioned immunocytes and myeloma cells can basically be carried out in compliance with known methods such as the method of Milstein, et al. (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46).

More specifically, the aforementioned cell fusion is carried out, for example, in an ordinary nutritive culture liquid in the presence of a cell fusion promoter. Examples of fusion promoters that are used include polyethylene glycol (PEG) and Sendai virus (HVJ), and an assistant such as dimethylsulfoxide can also be added to enhance fusion efficiency as desired.

The ratio of immunocytes and myeloma cells used is preferably 1 to 10 times more immunocytes than myeloma cells. Examples of culture liquids that can be used for the aforementioned cell fusion include RPMI1640 culture liquid preferable for growth of the aforementioned myeloma cells, MEM culture liquid and other ordinary

culture liquids used for this type of cell culturing. Moreover, a serum supplement such as fetal calf serum (FCS) can also be used in combination with the aforementioned culture liquid.

5 Cell fusion is carried out by thoroughly mixing predetermined amounts of the aforementioned immunocytes and myeloma cells in the aforementioned culture liquid, adding PEG solution, such as PEG solution having an average molecular weight of about 1000 to 6000 and pre-
10 warmed to 37°C, normally at a concentration of 30 to 60% (w/v), and then mixing to form the target fused cells (hybridoma). Continuing, cell fusion agents and so forth that are detrimental to hybridoma development can be removed by repeating the procedure consisting of
15 sequentially adding suitable culture liquid and then centrifuging to remove the supernatant.

 The hybridoma is selected by culturing in an ordinary selective culture liquid such as HAT culture liquid (culture liquid containing hypoxanthine,
20 aminopterin and thymidine). Culturing in said HAT culture liquid is continued for a duration, which is normally from several days to several weeks, that is sufficient for destroying those cells other than the target hybridoma (non-fused cells). Next, hybridoma that
25 produces the target antibody is then screened and cloned by carrying out ordinary limiting dilution methods.

 In addition to obtaining the aforementioned hybridoma by immunizing animals other than humans with antigen, a desired human antibody having binding activity
30 with a desired antigen or antigen-expressing cells can be obtained by sensitizing human lymphocytes with a desired antigen protein or antigen-expressing cells in vitro, and then fusing the sensitized B lymphocytes with myeloma cells such as U266 (refer to Japanese Examined Patent
35 Publication No. 1-59878). Moreover, a desired human antibody may also be acquired in accordance with the aforementioned method by administering antigen or

antigen-expressing cells into a transgenic animal having a repertoire of human antibody genes (refer to International Unexamined Patent Publications Nos. WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 or WO 96/33735).

Hybridoma that produces monoclonal antibody produced in this manner can be sub-cultured in ordinary culture liquid and stored in liquid nitrogen for a long period of time.

A method in which the hybridoma is cultured in accordance with ordinary methods and obtained in the form of the culture supernatant, or a method in which the hybridoma is grown by administering to a mammal that is compatible therewith followed by obtaining the form of ascites, can be employed to acquire monoclonal antibody from the hybridoma. The former method is suitable for obtaining highly pure antibody, while the latter method is suitable for producing antibody in large volume.

For example, production of anti-IL-6 receptor antibody-producing hybridoma can be carried out according to the method disclosed in Japanese Unexamined Patent Publication No. 3-139293. This can be carried out using a method in which the PM-1-producing hybridoma internationally deposited based on the Budapest Treaty under the designation FERM BP-2988 on July 12, 1989 at the International Patent Organism Depository of the National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japan) is injected into the abdominal cavity of BALB/c mice to obtain ascites followed by purification of PM-1 antibody from the ascites, or a method in which said hybridoma is cultured in a medium such as 10% fetal calf serum, RPMI1640 medium containing 5% BM-Condimed H1 (Boehringer-Mannheim), hybridoma SFM medium (Gibco-BRL) or PFHM-11 medium (Gibco-BRL), followed by purification of PM-1 antibody from the culture supernatant.

Recombinant antibody produced using gene

recombination technology by cloning antibody gene from a hybridoma, incorporating in a suitable vector and then inserting into a host can be used as monoclonal antibody in the present invention (refer to, for example,
5 Borrebaeck, C. A. K. and Larrick, J. W., Therapeutic Monoclonal Antibodies, publishing in the United Kingdom by MacMillan Publishers Ltd., 1990).

More specifically, mRNA that encodes antibody variable (V) region is isolated from cells such as a
10 hybridoma that produce the target antibody. Isolation of mRNA is carried out by preparing total RNA according to a known method such as guanidine centrifugation (Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299) or AGPC (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-
15 159), and the preparing mRNA using an mRNA Purification Kit (Pharmacia) and so forth. In addition, mRNA can be prepared directly by using the QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia).

cDNA of the antibody V region is synthesized from
20 the resulting mRNA using reverse transcriptase. Synthesis of cDNA can be carried out using, for example, the AMV Reverse Transcriptase First-Strand cDNA Synthesis Kit. In addition, The 5'-Ampli Finder Race Kit (Clontech) and 5'-RACE method using PCR (Frohman, M. A.
25 et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002) can be used to synthesize and amplify the cDNA. The target DNA fragment is purified from the resulting PCR product and coupled with vector DNA. Moreover, a recombinant vector is then produced from this and
30 inserted into *E. coli* and so forth followed by selecting a colony to prepare the desired recombinant vector. The base sequence of the target DNA is then confirmed by a known method such as the deoxy method.

Once DNA that encodes the V region of the target
35 antibody, this is then coupled with DNA that encodes a desired antibody constant region (C region) followed by incorporation into an expression vector. Alternatively,

DNA encoding the V region of the antibody may be incorporated into an expression vector that contains DNA of the antibody C region.

5 In order to produce antibody used in the present invention, an antibody gene as will be described later is incorporated into an expression vector that expressed under the control of, for example, an enhancer or a promoter. Next, host cells are transformed with this expression vector to allow expression of the antibody.

10 In the present invention, a gene recombinant antibody that has been artificially altered for the purpose of lowering interspecies antigenicity to humans can be used, examples of which include chimeric antibody, humanized antibody and human antibody. These altered
15 antibodies can be produced using known methods.

Chimeric antibodies are obtained by coupling DNA encoding antibody V region obtained in the manner described above with DNA encoding human antibody C region followed by incorporating the coupled product into an
20 expression vector and producing by inserting into a host (refer to European Unexamined Patent Publication No. EP 125023 or International Unexamined Patent Publication No. WO 92-19759). Chimeric antibody that is useful in the present invention can be obtained by using this known
25 method.

For example, plasmids containing DNA that encode the V regions of the L chain and H chain of chimeric PM-1 antibody have been named pPM-k3 and pPM-h1, respectively, and *Escherichia coli* retaining these plasmids have been
30 internationally deposited based on the Budapest Treaty under the designation NCIMB40366 and NCIMB40362, respectively, on February 12, 1991 at the National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (23 St Machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Scotland, Commonwealth
35 of Great Britain and Northern Ireland).

Humanized antibodies, which are also referred to as reshaped antibodies, are obtained by transplanting the

complementarity determining region (CDR) of mammals other than humans such as mice to the complementarity determining region of human antibody, and their typical gene recombination techniques are known (refer to
5 European Unexamined Patent Publication No. EP 125023 or International Unexamined Patent Publication No. WO 92-19759).

More specifically, a DNA sequence designed so as to couple CDR of mouse antibody with the framework (FR)
10 region of human antibody is synthesized by PCR from a plurality of oligonucleotides produced so as to have overlapping portions on their ends. The resulting DNA is then coupled with DNA that encodes human antibody C region followed by incorporation into an expression
15 vector and insertion into a host to produce the DNA in that host (refer to European Unexamined Patent Publication No. EU 239400 or International Unexamined Patent Publication No. WO 92-19759).

An FR for which the complementarity determining region forms a satisfactory antigen binding site is
20 selected for the FR of the human antibody coupled by means of CDR. The amino acids of the framework region of the antibody variable region may be substituted so that the complementary determining region of the reconfigured
25 human antibody forms a suitable antigen binding site (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

Human antibody C region is used for chimeric antibody and humanized antibody. An example of a human
30 antibody C region is Cy, and for example, Cy1, Cy2, Cy3 or Cy4 can be used. In addition, the human antibody C region may be modified to improve stability of the antibody or its production.

Chimeric antibodies are composed of a variable region of an antibody of mammalian origin other than
35 humans and a C region originating in human antibody, while humanized antibodies are composed of a complementarity determining region of an antibody of

mammalian origin other than humans and a framework region and C region originating in human antibody, and since their antigenicity in humans is decreased, they are useful as antibodies used in the present invention.

5 A preferable specific example of a humanized antibody used in the present invention is humanized PM-1 antibody (refer to International Unexamined Patent Publication No. WO 92-19759).

10 In addition to the method previously described, another known technology for acquiring human antibody consists of acquiring human antibody by panning using a human antibody library. For example, a phage that binds to an antigen can also be selected by using a variable region of human antibody as a single chain antibody
15 (scFv) and expressing on the surface of a phage using the phage display method. The DNA sequence that encodes the human antibody variable region that binds to the antigen can then be determined by analyzing the genes of the selected phage. Once the DNA sequence of the scFv that
20 binds to the antigen has been identified, an expression vector that is equivalent to that sequence can then be produced to acquire the human antibody. These methods are already commonly known and reference can be made to WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO
25 93/19172, WO 95/01438 and WO 95/15388.

 Antibody gene constructed in the manner described above can be expressed and acquired by known methods. In the case of mammalian cells, antibody gene can be expressed with DNA or vector that contains said DNA in
30 which a commonly used useful promoter, antibody gene to be expressed, and poly A signal downstream from the 3' side are functionally bound. An example of a promoter/enhancer is human cytomegalovirus immediately early promoter/enhancer.

35 In addition, examples of other promoters/enhancers that should used to express antibody used in the present invention include virus promoters/enhancers such as those

of retrovirus, polyoma virus, adenovirus or Simeon virus 40 (SV40), as well as promoters/enhancers originating in mammalian cells such as human elongation factor 1 α (HEF1 α).

5 For example, in the case of using SV40 promoter/enhancer, antibody can be easily expressed in accordance with the method of Mulligan et al. (Mulligan, R. C. et al., Nature (1979) 277, 108-114) or in the case of HEF1 α promoter/enhancer, antibody can be easily
10 expressed in accordance with the method of Mizushima et al. (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322).

 In the case of *Escherichia coli*, antibody can be expressed by functionally binding a commonly used useful
15 promoter, signal sequence for secreting antibody and antibody gene to be expressed. Examples of promoters include lacZ promoter and araB promoter. In the case of using lacZ promoter, antibody should be expressed in accordance with the method of Ward et al. (Ward, E. S. et
20 al., Nature (1989) 341, 544-546; Ward, E. S. et al., FASEB J. (1992) 6, 2422-2427), or in the case of using araB promoter, antibody should be expressed in accordance with the method of Better et al. (Better, M. et al., Science (1988) 240, 1041-1043).

25 The pelB signal sequence (Lei, S. P. et al., J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383) should be used for the signal sequence for antibody secretion in the case of producing in the periplasm of *E. coli*. After separating the antibody produced in the periplasm, the antibody is
30 used after suitably refolding the antibody structure (refer to, for example, WO 96/30394).

 Examples of replication sources that can be used include those originating in SV40, polyoma virus, adenovirus or bovine papilloma virus (BPV), and in order
35 to increase the number of gene copies in the host cell system, the expression vector can contain a selection

marker such as aminoglycoside phosphotransferase (APH) gene, thymidine kinase (TK) gene, *E. coli* xanthine-guanine phosphoribosyl transferase (Ecogpt) gene or dihydrofolate reductase (dhfr) gene.

5 Any arbitrary production system can be used to produce antibody used in the present invention. The production system for antibody production may be an in vitro system or an in vivo system. Examples of in vitro production systems include production systems that use
10 eukaryotic cells and a production systems that use prokaryotic cells.

 In the case of using eukaryotic cells, the production system may use animal cells, plant cells or fungal cells. Known examples of animal cells include:
15 (1) mammalian cells such as CHO, COS, myeloma, BHK (baby hamster kidney), HeLa and Vero cells, (2) amphibian cells such as African tree frog follicular cells, and (3) insect cells such as sf9, sf21 and Tn5 cells. Known examples of plant cells include cells originating in
20 *Nicotiana tabacum*, and they should be cultured in calluses. Known examples of fungal cells include yeasts cells such as *Saccharomyces* species including *Saccharomyces cerevisiae*, and molds such as *Aspergillus* species including *Aspergillus niger*.

25 In the case of using prokaryotic cells, a production system that uses bacterial cells is used. Known examples of bacterial cells include *E. coli* and *Bacillus subtilis*.

 Antibody is obtained by inserting the target antibody gene into these cells by transformation, and
30 then culturing the transformed cells in vitro. Culturing is carried out in accordance with known methods. For example, DMEM, MEM, RPMI1640 or IMDM can be used for the culture liquid, and a serum supplement such as fetal calf serum (FCS) can also be used in combination. In
35 addition, antibody may also be produced in vivo by transferring cells into which the antibody gene has been inserted to the abdominal cavity and so forth of an

animal.

On the other hand, examples of in vivo production systems include production systems that use animals and production systems that use plants. In the case of using an animal, examples of production systems include those that use mammals or insects.

Examples of mammals that can be used include goats, pigs, sheep, mice and rabbits (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). Silkworms can be used for the insects. In the case of using plants, tobacco plants can be used, for example.

Antibody gene is inserted into these animals or plants followed by production and recovery of the antibody within the bodies of the animals or plants. For example, an antibody gene is inserted at an intermediate location in a gene that encodes a protein uniquely produced in milk such as goat β casein to prepare in the form of a fused protein. A DNA fragment that contains the fused protein into which the antibody gene has been inserted is then injected into a goat embryo and this embryo is then introduced into a female goat. The desired antibody is then obtained from the milk produced by a transgenic goat or its progeny that is born from the goat that has received the embryo. A suitable hormone may be used in the transgenic goat to increase the amount of milk containing the desired antibody produced from the transgenic goat (Ebert, K. M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702).

In addition, in the case of using silkworms, a silkworm is infected with baculovirus into which the target antibody gene has been inserted followed by obtaining the desired antibody from the silkworm body fluid (Maeda, S. et al., Nature (1985) 315, 592-594). Moreover, in the case of using a tobacco plant, the target antibody gene is inserted into a plant expression vector such as pMON 530, after which this vector is inserted into bacteria such as *Agrobacterium tumefaciens*.

This bacteria is then used to infect a tobacco plant such as *Nicotiana tabacum* to obtain the desired antibody from the tobacco leaves (Jilian, K. -C. Ma, et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138).

5 As has been described above, in the case of producing antibody with an in vitro or in vivo production system, a host may be simultaneously transfected by separately incorporating DNA encoding antibody heavy chain (H chain) or light chain (L chain) in separate
10 expression vectors, or transforming a host by incorporating DNA encoding H chain and L chain in a single expression vector (refer to International Unexamined Patent Publication No. WO 94-11523).

 Antibody used in the present invention may be an
15 antibody fragment or modified product thereof provided is can be preferably used in the present invention. Examples of antibody fragments include Fab, F(ab')₂, Fv or H chain and single chain Fv (scFv) in which Fv or Fv or H chain and L chain are coupled with a suitable
20 linker.

 More specifically, after forming an antibody fragment by treating an antibody with an enzyme such as papain or pepsin, or constructing a gene that encodes these antibody fragments and inserting it into an
25 expression vector, it is expressed in suitable host cells (refer to, for example, Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H., Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496; Plueckthun, A. & Skerra, A., Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496;
30 Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-666; Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137).

 The aforementioned scFv is obtained by coupling antibody H chain V region with L chain V region. In this
35 scFv, the H chain V region and L chain V region are coupled with a linker and preferably a peptide linker (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

(1988) 85, 5879-5883). The H chain V region and L chain V region in scFv may have for their origins any of the origins described for the aforementioned antibodies. An example of a peptide linker used to couple the V regions is an arbitrary single chain peptide composed of 12-19 amino acid residues.

DNA that encodes scFv is obtained by using DNA that encodes the aforementioned antibody H chain or H chain V region and DNA that encodes L chain or L chain V region as templates, amplifying a DNA portion that encodes a desired amino acid sequence among these sequences by PCR using a primer pair that defines both ends, and then amplifying by combining with a prime pair that defines the DNA that encodes the peptide linker portion as well as both of its ends so that each H chain and L chain is linked.

In addition, once DNA that encodes scFv is produced, expression vectors that contain them as well as hosts that have been transformed by said expression vectors can be obtained in accordance with ordinary methods. In addition, scFv can be obtained in accordance with ordinary methods by using those hosts.

These antibody fragments can be produced from a host by acquiring and expressing their genes in the same manner as previously described. The "antibody" referred to in the present invention includes these antibody fragments.

Antibodies bound with various types of molecules such as polyethylene glycol (PEG) can be used for antibody modified products. The "antibody" referred to in the present invention includes these antibody modified products. These antibody modified products can be obtained by carrying out chemical modification on a resulting antibody. These methods have already been established in this field.

As was previously described, expressed antibody can be separated from inside or outside cells or from a host

and purified to uniformity. Separation and purification of antibody used in the present invention can be carried out by affinity chromatography. Examples of columns used for affinity chromatography include a protein A column and protein G column. Examples of carriers used for a protein A column include Hyper D, POROS and Sepharose F.F. Other separation and purification methods used with ordinary proteins may also be used and there are no limitations thereon.

Antibody used in the present invention can be separated and purified by suitably selecting and combining, for example, chromatography other than the aforementioned affinity chromatography, filtration, ultrafiltration, salting out or dialysis. Examples of other types of chromatography include ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography and gel filtration. These types of chromatography can be applied to high-performance liquid chromatography (HPLC). In addition, reverse phase HPLC may also be used.

Concentration of antibody obtained as described above can be measured by measurement of optical absorbance, ELISA and so forth. Namely, in the case of measuring optical absorbance, after suitably diluting with PBS(-), optical absorbance at 280 nm is measured followed by calculating concentration based on 1.35 OD representing 1 mg/ml. In addition, measurement of concentration by ELISA can be carried out in the manner described below. Namely, 100 μ l of goat anti-human IgG (TAG) diluted to 1 μ g/ml with 0.1 M bicarbonate buffer (pH 9.6) are added to a 96-well plate (Nunc) followed by incubating overnight at 4°C to immobilize the antibody on the plate. After blocking, 100 μ l of suitably diluted antibody used in the present invention, sample containing antibody or human IgG standard (Cappel) are added followed by incubating for 1 hour at room temperature.

After washing the plate, 100 μ l of 5000X-diluted

alkaline phosphatase-labeled anti-human IgG (BIOSOURCE) are added followed by incubating for 1 hour at room temperature. After washing the plate, substrate solution is added followed by incubating and then measuring
5 optical absorbance at 405 nm using a Microplate Reader Model 3550 (BioRad) to calculate the concentration of the target antibody.

IL-6 variant used in the present invention is a substance that has binding activity with IL-6 receptor
10 but does not transmit the biological activity of IL-6. Namely, although IL-6 variant competes with IL-6 for binding with IL-6 receptor, since it does not transmit the biological activity of IL-6, signal transmission by IL-6 is interrupted.

15 IL-6 variant is produced by introducing a mutation by substituting an amino acid residue in the amino acid sequence of IL-6. Although there are no limitations on the origin of the IL-6 serving as the basis of the IL-6 variant, human IL-6 is preferable in consideration of
20 antigenicity and so forth.

More specifically, this is carried out by predicting the secondary structure of the amino acid sequence of IL-6 using a known molecular modeling program such as WHATIF (Vriend, et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56), and
25 then evaluating the effects on all of the amino acid residues to be substituted. After determining a suitable substituted amino acid residue, by then using a vector containing a base sequence that encodes human IL-6 gene as a template and introducing a mutation such that the
30 amino acid is substituted by PCR carried out in the normal manner, a gene that encodes IL-6 variant is obtained. This can then be incorporated in a suitable expression vector as necessary to obtain IL-6 variant in compliance with the aforementioned recombinant antibody
35 expression, production and purification methods.

Specific examples of IL-6 variants are disclosed in Brakenhoff et al., J. Biol. Chem. (1994) 269, 86-93,

AH

Savino et al., EMBO J. (1994) 13, 1357-1367, WO 96-18648 and WO 96-17869.

IL-6 partial peptide or IL-6 receptor partial peptide used in the present invention is a substance that
5 has binding activity with IL-6 receptor or IL-6, respectively, and does not transmit the biological activity of IL-6. Namely, IL-6 partial peptide or IL-6 receptor partial peptide specifically inhibit binding of
10 IL-6 to IL-6 receptor by capturing IL-6 receptor or IL-6 by binding thereto. As a result, signal transmission by IL-6 is interrupted since the biological activity of IL-6 is not transmitted.

IL-6 partial peptide or IL-6 receptor partial peptide is a peptide that is composed of an amino acid
15 sequence of a portion or entirety of the region involved in binding between IL-6 and IL-6 receptor in the amino acid sequence of IL-6 or IL-6 receptor. Such a peptide is normally composed of 10 to 80, preferably 20 to 50 and more preferably 20 to 40 amino acid residues.

IL-6 partial peptide or IL-6 receptor partial peptide can be produced by a method in which the region
20 involved in binding between IL-6 and IL-6 receptor is identified in the amino acid sequence of IL-6 or IL-6 receptor, and a portion or all of that amino acid sequence is normally known, examples of which include
25 genetic engineering techniques and peptide synthesis methods.

IL-6 partial peptide or IL-6 receptor partial peptide can be produced using genetic engineering
30 techniques by incorporating DNA that encodes a desired peptide in an expression vector and obtaining the desired peptide in compliance with the aforementioned recombinant antibody expression, production and purification methods.

IL-6 partial peptide or IL-6 receptor partial peptide can be produced using peptide synthesis methods
35 by using a method normally used in peptide synthesis, such as a solid phase synthesis method or liquid phase

45
45

synthesis method.

More specifically, this should be carried out according to the method described in Zokuiyaku-hin-no-Kaihatsu, Vol. 14, Peptide Synthesis, N. Yajima, ed., Hirokawa Shoten Publishing (1991). In the case of solid phase synthesis, a method is used in which, for example, a peptide chain is elongated by alternately repeating a reaction in which an amino acid corresponding to the C terminal of the peptide to be synthesized is bound to a support that is insoluble in organic solvent, and amino acids in which the α -amino groups and side chain functional groups are protected with suitable protecting groups are sequentially bound in order from the C terminal to the N terminal, and a reaction in which said protecting groups of α -amino groups of amino acids or peptide bound to the resin are eliminated. Solid phase peptide synthesis methods are broadly divided into the Boc method and Fmoc method depending on the type of protecting groups used.

After synthesizing the target peptide in this manner, a de-protecting reaction and reaction for severing the peptide chain from the support are carried out. In the reaction for severing the peptide chain, hydrogen fluoride or trifluoromethane sulfonic acid are normally used in the Boc method, while TFA is normally used in the Fmoc method. In the Boc method, for example, the aforementioned protected peptide resin is treated in hydrogen fluoride in the presence of anisole. Next, the protecting groups are eliminated and the peptide is severed from the support followed by recovery of the peptide. A crude peptide is then obtained by freeze-drying the product. On the other hand, in the Fmoc method, for example, a de-protecting reaction and reaction for severing the peptide chain from the support can be carried out using the same procedure as described above in TFA.

The resulting crude peptide can be separated and

purified by applying to HPLC. Elution should be carried out under the optimum conditions using a water-acetonitrile-based solvent normally used for purification of protein. The fraction corresponding to the peak of the resulting chromatography profile is then separated and freeze-dried. The peptide fraction purified in this manner is then identified by molecular weight analysis using mass spectrometry, amino acid composition analysis or amino acid sequence analysis.

Specific examples of IL-6 partial peptides and IL-6 receptor partial peptides are disclosed in Japanese Unexamined Patent Publication No. 2-188600, Japanese Unexamined Patent Publication No. 7-324097, Japanese Unexamined Patent Publication No. 8-311098 and U.S. Patent No. US 5210075.

IL-6 signal transmission inhibitory activity of IL-6 antagonist used in the present invention can be evaluated by normally used methods. More specifically, IL-6-dependent human myeloma line (S6B45, KPMM2), human Lennert's T lymphoma cell line KT3 or IL-6-dependent cell line MH60 or BSF2 is cultured followed by the addition of IL-6 while simultaneously in the presence of IL-6 antagonist and measurement of the uptake of ³H-thymidine by IL-6-dependent cells.

In addition, ¹²⁵I-labeled IL-6 bound to IL-6 receptor expressing cells is measured by culturing IL-6 receptor expressing cells in the form of U266 cells followed by the addition of ¹²⁵I-labeled IL-6 and the simultaneous addition of IL-6 antagonist. In the aforementioned assay system, a negative control group that does not contain IL-6 antagonist is provided in addition to the group in which IL-6 antagonist is present, and comparison of the results obtained from the two groups makes it possible to evaluate the IL-6 inhibitory activity of the IL-6 antagonist.

As will be indicated in the examples to be described later, since growth inhibitory effects on mesothelioma

cells have been observed for anti-IL-6 receptor antibody, anti-IL-6 receptor antibody and other IL-6 antagonists were suggested as being useful as therapeutic agents for mesothelioma.

5 The treatment target in the present invention is a mammal. The mammal of the treatment target is preferably a human.

 The mesothelioma therapeutic agent or mesothelioma cell growth inhibitor of the present invention can be
10. administered systemically or locally either orally or parenterally. For example, intravenous infusion or other form of intravenous injection, intramuscular injection, intrathoracic injection, intraperitoneal injection, subcutaneous injection, suppositories, enema or oral
15 enteric-coated pills and so forth can be selected, and the administration method can be suitably selected according to the age and symptoms of the patient. The effective dose is selected within the range of 0.01 mg to 100 mg per kilogram of body weight per administration.
20 Alternatively, a dose of 1 to 1000 mg, and preferably 5 to 50 mg, can be selected per patient.

 The preferable dose and administration method in the case of anti-IL-6 receptor antibody, for example, is such that the amount of free antibody present in the blood is
25 the effective dose, a specific example of which is a method by which it is administered using a method such as intravenous drip or other form of intravenous injection or subcutaneous injection and so forth according to an administration schedule such as twice a week, once a
30 week, once every two weeks or once every four weeks in a single administration or divided among several administrations at a dose of 0.5 mg to 40 mg, and preferably 1 mg to 20 mg, per month (4 weeks) per 1 kilogram of body weight. The administration schedule can
35 be adjusted such as by lengthening the administration interval from twice per week or once per week to once every two weeks, once every three weeks or once every

four weeks while observing the patient's condition and trends in blood test values.

5 The mesothelioma therapeutic agent or mesothelioma cell growth inhibitor of the present invention may contain a pharmaceutically acceptable carrier or additive depending on the administration route. Examples of such carriers and additives include water, pharmaceutically acceptable organic solvents, collagen, polyvinyl alcohol, polyvinyl pyrrolidone, carboxyvinyl polymer, sodium
10 carboxymethyl cellulose, sodium polyacrylate, sodium arginate, water-soluble dextran, sodium carboxymethyl starch, pectin, methyl cellulose, ethyl cellulose, xanthan gum, gum Arabic, casein, gelatin, agar, diglycerin, propylene glycol, polyethylene glycol,
15 Vaseline, paraffin, stearyl alcohol, stearic acid, human serum albumin (HSA), mannitol, sorbitol, lactose and surfactants acceptable for use as pharmaceutical additives. Although additives used are selected are suitably selected or combined from the aforementioned
20 additives according to the drug form, they are not limited to those indicated above.

EXAMPLES

25 Although the following provides a detailed explanation of the present invention through its examples and reference examples, the present invention is not limited thereto.

Example 1 - Production of IL-6 by Malignant Mesothelioma Cell Lines

30 Culturing of malignant mesothelioma cell lines MSTO, H2052, H28, H226 and H2452 was started at a cell concentration of 5×10^4 /well in a 24-well plate containing culture liquid (RPMI containing 10% fetal calf serum (FCS)), the cell culture liquid was replaced on the
35 following day, after which the cells were cultured for additional 3 days followed by measuring the concentrations of IL-6 in the culture supernatant using a

fully automated chemiluminescent enzyme immunoassay system (Fujirebio, Lumipulse) and correcting for the amount of cellular protein. Those results are shown in Fig. 1. The experiment was repeated three times.

5 Although cell line H28 did not produce IL-6, the other four lines produced IL-6. Cell lines H2052 and H226 produced particularly high levels of IL-6.

Example 2 - Expression of IL-6R in Malignant Mesothelioma Cell Lines

10 The expression levels of IL-6 receptor were measured for five malignant mesothelioma cell lines at the mRNA level. KT-3 cells were used for the positive control, and synoviocytes were used for the negative control. These cells were cultured for 48 hours in RPMI containing
15 10% FCS, and mRNA that encodes IL-6 receptor (IL-6R) in the cells was measured by reverse-transcribed PCR (RT-PCR) using the GeneAmp PCR System (Applied Biosystems) for the detection device. Those results are shown in Fig. 2. Fig. 2 (bottom) indicates the amount of mRNA of
20 the GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) used for the internal control.

According to these results, malignant mesothelioma cells are believed to express hardly any IL-6 receptor. Since the pleural fluid in cases of malignant pleural
25 mesothelioma consists of bloody pleural fluid, soluble IL-6 receptor is surmised to be present in large amounts, and this is believed to be involved in transmission of IL-6 irritation.

Example 3 - Induction of VEGF Production by IL-6 Stimulation (1)

30 Tumor cells of malignant mesothelioma cell lines H2052 and H2452 were cultured in three series in 24-well plates at an initial cell concentration of 5×10^4 /well in RPMI1640 medium. On the following day, the cell culture
35 liquid was replaced followed by commencement of stimulation by (1) recombinant IL-6 (10 ng/ml), (2) recombinant IL-6 (10 ng/ml) + recombinant soluble IL-6R

(100 ng/ml), and (3) inhibition by the anti-IL-6 receptor antibody, humanized PM-1 antibody (refer to WO 92/19759) (25 µg/ml) (RPMI was used for the medium control). After culturing for an additional 3 days, the concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the culture supernatants were measured using the Quantikine Human VEGF Immunoassay Kit (R & D Systems) and corrected for the amount of cellular protein.

Those results are shown in Fig. 3. As is clear from these graphs, production of VEGF was induced by IL-6 stimulation in both cell lines H2052 and H2452.

Example 4 - Induction of VEGF Production by IL-6 Stimulation (2)

The experiment of Example 3 was repeated using malignant mesothelioma cell line H28. Those results are shown in Fig. 4. As is clear from these results, although cell line H28 produces high levels of VEGF, it did not respond to stimulation by IL-6.

Example 5 - Phosphorylation of STAT3 by IL-6 Stimulation

Cell line H2025, in which production of VEGF is induced by IL-6, and cell line H28, in which production of VEGF is not induced by IL-6, were incubated in the presence of recombinant IL-6 (10 ng/ml) and soluble recombinant IL-6 receptor (100 ng/ml) together with signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) followed by analysis of the phosphorylation from STAT3 to p-STAT3 in hour 0, hour 0.5 and hour 1 of incubation by Western blotting. Those results are shown in Fig. 5.

As is clear from Fig. 5, prominent phosphorylation of STAT3 was observed for cell line H2052 at 30 minutes after IL-6 stimulation. In contrast, only slight phosphorylation of STAT3 was observed in response to IL-6 stimulation for cell line H28. Furthermore, p-STAT3 in Fig. 5 indicates phosphorylated STAT3, while STAT3 indicates the sum of phosphorylated and non-

phosphorylated STAT3.

Example 6 - Induction of SOCS3 by IL-6 Stimulation

Cell line H2025, in which production of VEGF is induced by IL-6, and cell line H28, in which production of VEGF is not induced by IL-6, were stimulated by incubating in the presence of recombinant IL-6 (10 ng/ml) and soluble recombinant IL-6 receptor (100 ng/ml) followed by measuring the expression levels of induced suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) by measuring the levels of mRNA that encode them following RT-PCR amplification in hour 0, hour 2 and hour 4 of incubation. Those results are shown in Fig. 6.

As is clear from Fig. 6, induction of SOCS3 mRNA was observed 2 hours after IL-6 stimulation in cell line H2052. Continuously high expression of SOCS3 was observed in cell line H28.

Example 7 - VEGF Promoter Assay

A plasmid pGL3-VEGF, which controls the expression of luciferase gene by VEGF promoter, and a plasmid pGL3-VEGFmut, which controls the expression of luciferase gene by a mutated VEGF promoter, were produced (Fig. 7).

50,000 H2052 cells each were transfected with 1 µg of pGL3-VEGF or pGL3-VEGFmut, and the transfected cells were stimulated with recombinant IL-6 (10 ng/ml) and recombinant soluble IL-6 receptor (100 ng/ml). After stimulating for 2 days, the luciferase activity induced from the VEGF promoter and mutated VEGF promoter was examined. Those results are shown in Fig. 8.

As is clear from Fig. 8, in the case of having removed the phosphorylated STAT3 binding site from the VEGF promoter, activation of the VEGF promoter due to IL-6 stimulation was no longer observed. Based on the results of the aforementioned Examples 5, 6 and 7, increased production of VEGF due to IL-6 stimulation in cell line H2052 was believed to be mediated by a JAK-STAT system. This predicted system is shown in Fig. 9.

Example 8 - Growth Promotion of H2052 and H226 by Addition of IL-6 and Soluble IL-6 Receptor

Cell line H2052 cells were disseminated in a 96-well plate containing RPMI medium containing 10% FCS at 500 cells/well followed by culturing in five series for 6 to 7 days in the presence or absence of recombinant soluble IL-6 receptor at 100 ng/ml and in the presence of various concentrations (0, 1, 10 or 100 ng/ml) of IL-6. Those results are shown in Fig. 10 and Fig. 13. As is clear from these graphs, cell line H2052 and cell line H226 grow IL-6 concentration- dependently in the presence of recombinant soluble IL-6 receptor (100 ng/ml).

Example 9 - Inhibition of Growth Promotion of H2052 Cells due to Addition of IL-6 and IL-6R by Antibody to IL-6R (Anti-IL-6R Antibody)

In order to determine whether or not growth promotion of H2052 cells by IL-6 and IL-6 receptor is inhibited by anti-IL-6R antibody, H2052 cells were disseminated in a 96-well plate containing RPMI medium containing 10% FCS at 500 cells/well followed by culturing in three series for 7 days in the presence of recombinant soluble IL-6 at 10 ng/ml and recombinant soluble IL-6 receptor at 100 ng/ml and in the presence of various concentrations (0.1 or 25 µg/ml) of humanized PM-1 antibody. Following culturing, the amount of growth of H2052 cells (OD 450) was measured by MTS assay. Those results are shown in Fig. 11. As a result, anti-IL-6 antibody was determined to inhibit growth concentration-dependently. On the other hand, inhibitory effects were not observed in the case of adding human IgG1 instead of MRA at the same concentration as a control.

Example 10 - Growth Promotion of H226 Cells by Addition of IL-6 and Soluble IL-6 Receptor and Inhibition by Anti-IL-6R Antibody

Cell line H226 cells were disseminated in a 96-well plate containing RPMI medium containing 10% FCS at a concentration of 500 cells/well followed by culturing in

three series for 7 days in the presence of recombinant soluble IL-6 receptor at 100 ng/ml and in the presence of various concentrations (0, 1, 10 or 100 ng/ml) of IL-6. Those results are shown in Fig. 12. As is clear from the graph, H226 cells that produce high levels of IL-6 grew IL-6 concentration-dependently in the presence of recombinant soluble IL-6 receptor (100 ng/ml) while their growth was inhibited by anti-IL-6R antibody in the same manner as H2052 cells producing high levels of IL-6.

10 Example 11 - Inhibition of Growth Promotion of Cell Line H2052 and Cell Line H226 Induced by Addition of IL-6 and Soluble IL-6 Receptor by Anti-IL-6 Receptor Antibody

15 Cells of cell line H2052 and cell line H225 were disseminated in a 96-well plate at 200 cells/well in RPMI medium containing 10% FCS followed by culturing in five series for 6 days in the presence of IL-6 (10 ng/ml) and soluble IL-6 receptor (100 ng/ml) and in the presence of various concentrations (0, 1 µg/ml, 5 µg/ml) of humanized PM-1 antibody. After culturing, the cell growth rates of cell line H2052 and cell line H226 were measured by MTS assay. The cell growth rates indicated how many times cell growth increased as compared with the absence of addition of IL-6/sIL-6R. Those results are shown in Fig. 20 14. As a result, anti-IL-6 receptor antibody completely inhibited the growth promoting action induced by addition of IL-6/sIL-6R in cell line H2052 and cell line H226. On the other hand, growth inhibitory effects were not observed in the case of adding the same concentrations of human IgG1 (Sigma) as a control instead of anti-IL-6 receptor antibody.

25 Example 12 - Inhibition of Induction of VEGF Production Induced by IL-6 Stimulation by Anti-IL-6 Receptor Antibody

30 A study was made of inhibition of the induction of VEGF production induced by IL-6 stimulation in malignant mesothelioma cell lines MSTO, H226, H2052 and H2452 by

anti-IL-6 receptor antibody under the same conditions as Example 3 with the exception of the concentrations of the humanized PM-1 antibody (0.1 µg/ml, 5 µg/ml). Those results are shown in Fig. 15. As a result, anti-IL-6 receptor antibody completely inhibited induction of VEGF production induced by IL-6/sIL-6R stimulation. On the other hand, inhibitory action on induction of VEGF production was not observed in the case of adding the same concentrations of human IgG1 (Sigma) as a control instead of anti-IL-6 receptor antibody.

Example 13 - Inhibition of STAT3 Phosphorylation by Anti-IL-6 Receptor Antibody

A study was made to determine whether STAT3 phosphorylation induced by stimulation by IL-6 (10 ng/ml) and soluble IL-6 receptor (100 ng/ml) is inhibited by 5 µg/ml of anti-IL-6 receptor antibody in cell line H2052 and cell line H2452 that produce VEGF. Those results are shown in Fig. 16. As a result, anti-IL-6 receptor antibody significantly inhibited phosphorylated STAT3 (p-STAT3) induced by IL-6/sIL-6R stimulation in malignant mesothelioma cells. On the other hand, significant inhibition of the phosphorylation of STAT3 was not observed in the case of adding the same concentration of human IgG1 (Sigma) as a control instead of anti-IL-6 receptor antibody.

Example 14 - Effect of Anti-VEGF Antibody on Growth of Malignant Mesothelioma Cells

Cells of cell line H2052 and cell line H226 were disseminated in a 96-well plate at 500 cells/plate in RPMI medium containing 10% FCS, followed by culturing in five series for 6-7 days in the presence of IL-6 (10 ng/ml) and recombinant soluble IL-6 receptor (100 ng/ml) and in the presence of 1 µg/ml of anti-VEGF antibody. After culturing, the amounts of growth were examined by MTS assay. The same concentration of human IgG1 (Sigma) was used for the control instead of anti-VEGF antibody.

Those results are shown in Fig. 17. As a result, anti-VEGF antibody did not inhibit cell growth induced by IL-6/sIL-6R stimulation. On the basis of this result, growth action on malignant mesothelioma cells induced by IL-6/sIL-6R stimulation was clearly determined to not be mediated by VEGF.

Reference Example 1 - Preparation of Human Soluble IL-6 Receptor

Soluble IL-6 receptor was produced by PCR using a plasmid pBSF2R.236 that contains DNA encoding IL-6 receptor obtained according to the method of Yamasaki, et al. (Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828). Plasmid pBSF2R.236 was then digested with restrictase SphI to obtain IL-6 receptor cDNA which was then inserted into mp18 (Amersham). A mutation was introduced into the IL-6 receptor cDNA by PCR with the In Vitro Mutagenesis System (Amersham) using a synthetic oligoprimmer designed so as to insert a stop codon into the IL-6 receptor cDNA. As a result of this procedure, a stop codon was inserted at the location of amino acid 345, and cDNA was obtained that encodes soluble IL-6 receptor.

In order to express the cDNA encoding soluble IL-6 receptor in CHO cells, it was coupled with plasmid pSV (Pharmacia) to obtain plasmid pSVL344. Soluble IL-6 receptor cDNA severed with HindIII-SalI was then inserted into plasmid pECEdhfr containing dhfr cDNA to obtain CHO cell expression plasmid pECEdhfr344.

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

The selected CHO cells were then screened by a limiting dilution method to obtain a single CHO cell clone. This CHO cell clone was amplified with methotrexate at a concentration from 20 nM to 200 nM to obtain human soluble IL-6 receptor-producing CHO cell line 5E27. CHO cell line 5E27 was cultured in Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Gibco) containing 5% FBS. After recovering the culture supernatant, the concentration of soluble IL-6 receptor in the culture supernatant was measured by ELISA. As a result, soluble IL-6 receptor was confirmed to be present in the culture supernatant.

Reference Example 2 - Preparation of Anti-Human IL-6 Antibody

A BALB/c mouse was immunized with 10 µg of recombinant IL-6 (Hirano, T. et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41) together with Freund's complete adjuvant, and this was continued once a week until anti-IL-6 antibody was able to be detected in the serum. Immunocytes were excised from local lymph nodes and fused with myeloma cell line P3U1 using polyethylene glycol 1500. A hybridoma was selected according to the method of Oi, et al. using HAT culture liquid (Selective Methods in Cellular Immunology, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) to establish a hybridoma that produced anti-human IL-6 antibody.

An IL-6 binding assay was performed in the manner described below on the hybridoma that produced anti-human IL-6 antibody. Namely, a flexible polyvinyl 96-well microplate (Dynatech Laboratories, Alexandria, VA) was coated overnight at 4°C with 100 µl of goat anti-mouse Ig (10 µg/ml, Cooper Biomedical, Malvern, PA) in 0.1 M carbonate-hydrogen carbonate buffer (pH 9.6). Next, the plate was treated for 2 hours at room temperature with 100 µl of PBS containing 1% bovine serum albumin (BSA).

After washing the plate with PBS, 100 µl of

57

hybridoma culture supernatant were added to each well followed by incubating overnight at 4°C. The plate was washed and ¹²⁵I-labeled recombinant IL-6 was added to each well at 2000 cpm/0.5 ng/well followed by measuring the radioactivity of each well after washing using a gamma counter (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA). 32 of 216 hybridoma clones were positive according to the IL-6 binding assay. Stable MH166.BSF2 was ultimately obtained from these clones. The anti-IL-6 antibody MH166 produced by said hybridoma had IgG1κ subtype.

Next, neutralizing activity on hybridoma growth by MH166 antibody was investigated using IL-6-dependent mouse hybridoma clone MH60.BSF2. MH60.BSF2 cells were divided among the wells of a microplate at 1 x 10⁴/200 μl/well followed by the addition of sample containing MH166 antibody and culturing for 48 hours, and then additionally culturing for 6 hours after adding ³H-thymidine (New England Nuclear, Boston, MA) at 0.5 μCi/well. The cells were then placed on glass filter paper and treated with an automatic harvester (Labo Mash Science, Tokyo, Japan). Rabbit anti-IL-6 antibody was used for the control.

As a result, MH166 antibody volume-dependently inhibited uptake of ³H-thymidine by MH60.BSF2 cells induced by IL-6. Thus, MH166 antibody was clearly demonstrated to neutralize IL-6 activity.

Reference Example 3 - Preparation of Anti-Human IL-6 Receptor Antibody

Anti-IL-6 receptor antibody MT18 produced according to the method of Hirata, et al. (Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906) was bound to activated Sepharose 4B (Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) according to attached protocol to purify IL-6 receptor (Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828). Human myeloma cell line U266 was solubilized with p-

paraaminophenyl methane sulfonyl fluoride hydrochloride (Wako Chemicals) containing 1% digitonin (Wako Chemicals), 10 mM triethanol amine (pH 7.8) and 0.15 M NaCl (digitonin buffer), and then mixed with MT18 antibody bound to Sepharose 4B beads. Subsequently, the beads were washed six times with digitonin buffer to obtain partially purified IL-6 receptor for immunization.

A BALB/c mouse was immunized four times every 10 days with the aforementioned partially purified IL-6 receptor obtained from 3×10^9 U266 cells followed by production of hybridoma in accordance with ordinary methods. The binding activity of hybridoma culture supernatant from positive growth wells to IL-6 receptor was investigated according to the method described below. 5×10^7 U266 cells were labeled with ^{35}S -methionine (2.5 mCi) and solubilized with the aforementioned digitonin buffer. The solubilized U266 cells were then mixed with MT18 antibody bound to Sepharose 4B beads having a volume of 0.04 ml followed by washing six times with digitonin buffer, eluting the ^{35}S -methionine-labeled IL-6 receptor with 0.25 ml of digitonin buffer (pH 3.4) and neutralizing with 0.025 ml of 1 M Tris (pH 7.4).

0.05 ml of hybridoma culture supernatant were mixed with 0.01 ml of Protein G Sepharose (Pharmacia). After washing, the Sepharose was incubated with 0.005 ml of ^{35}S -methionine-labeled IL-6 receptor solution prepared as described above. The immunoprecipitate was then analyzed with SDS-PAGE and hybridoma culture supernatant that reacts with IL-6 receptor was investigated. As a result, reaction-positive hybridoma clone PM-1 (FERM BP-2998) was established. Antibody produced from hybridoma PM-1 have the IgG1 κ subtype.

The IL-6 binding inhibitory activity of antibody produced by hybridoma PM-1 on human IL-6 receptor was investigated using human myeloma cell line U266. Human recombinant IL-6 was prepared from *E. coli* (Hirano, T. et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41-45) and labeled with

^{125}I using Bolton-Hunter reagent (New England Nuclear; Boston, MA) (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981).

4 x 10^5 U266 cells were cultured with 70% (v/v) hybridoma PM-1 culture supernatant and 14000 cpm of ^{125}I -labeled IL-6 for 1 hour. 70 μl of sample were layered onto 300 μl of FCS in a 400 μl microfuge polyethylene tube followed by centrifugation and measurement of radioactivity of the cells.

As a result, antibody produced by hybridoma PM-1 was clearly determined to inhibit binding of IL-6 to IL-6 receptor.

Reference Example 4 - Preparation of Anti-Mouse IL-6 Receptor Antibody

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

CHO cells producing mouse soluble IL-6 receptor were cultured in IMDM culture liquid containing 10% FCS followed by purification of mouse soluble IL-6 receptor from the culture supernatant using an affinity column in which anti-mouse IL-6 receptor antibody RS12 (refer to the aforementioned Saito, T. et al.) was immobilized in Affigel 10 gel (BioRad).

50 μg of the resulting mouse soluble IL-6 receptor were mixed with Freund's complete adjuvant and injected into the abdomen of a Wistar rat. The rat was additionally immunized with Freund's incomplete adjuvant starting two weeks later. Rat spleen cells were then harvested on day 45, and after fusing 2×10^8 cells with 1×10^7 cells of mouse myeloma cell line P3U1 using 50% PEG1500 (Boehringer-Mannheim) in accordance with ordinary methods, the fused cells were screened for hybridoma with HAT medium.

After adding hybridoma culture supernatant to a plate coated with rabbit anti-rat IgG antibody (Cappel),

60

the mouse soluble IL-6 receptor was allowed to react. Next, hybridoma that produced antibody to mouse soluble IL-6 receptor was screened by ELISA using rabbit anti-mouse IL-6 receptor antibody alkaline phosphatase-labeled sheep anti-rabbit IgG. The hybridoma clones that were confirmed to produce antibody were sub-screened twice to obtain a single hybridoma clone. That clone was named MR16-1.

The neutralizing activity during information transmission by mouse IL-6 of this hybridoma-producing antibody was investigated according to the uptake of ³H-thymidine using MH60.BSF2 cells (Matsuda, T. et al., J. Immunol. (1988) 18, 951-956). 1 x 10⁴ cells/200 µl/well of MH60.BSF2 cells were prepared in a 96-well plate. 10 pg/ml of mouse IL-6 and 12.3 to 1000 ng/ml of MR16-1 antibody or RS12 antibody were added to this plate and cultured for 44 hours at 37°C and 5% CO₂ followed by the addition of 1 µCi/well of ³H-thymidine. The uptake of ³H-thymidine was then measured 4 hours later. As a result, MR16-1 antibody inhibited the uptake of ³H-thymidine by MH60.BSF2 cells.

Thus, antibody produced by hybridoma MR16-1 (FERM BP-5875) was clearly determined to inhibit binding of IL-6 to IL-6 receptor.

What is claimed is:

1. A mesothelioma therapeutic agent that contains an interleukin-6 (IL-6) antagonist as its active ingredient.

5 2. A mesothelioma therapeutic agent according to claim 1 wherein, the mesothelioma is pleural mesothelioma.

10 3. A mesothelioma therapeutic agent according to claim 2 wherein, the pleural mesothelioma is malignant pleural mesothelioma.

4. A mesothelioma therapeutic agent according to any of claims 1 through 3 wherein, the IL-6 antagonist is antibody to IL-6 receptor.

15 5. A mesothelioma therapeutic agent according to claim 4 wherein, the antibody to IL-6 receptor is monoclonal antibody to IL-6 receptor.

6. A mesothelioma therapeutic agent according to claim 4 wherein, the antibody to IL-6 receptor is monoclonal antibody to human IL-6 receptor.

20 7. A mesothelioma therapeutic agent according to claim 4 wherein, the antibody to IL-6 receptor is monoclonal antibody to mouse IL-6 receptor.

25 8. A mesothelioma therapeutic agent according to any of claims 4 through 7 wherein, the antibody to IL-6 receptor is recombinant antibody.

9. A mesothelioma therapeutic agent according to claim 6 wherein, the monoclonal antibody to human IL-6 receptor is PM-1 antibody.

30 10. A mesothelioma therapeutic agent according to claim 7 wherein, the monoclonal antibody to mouse IL-6 receptor is MR16-1 antibody.

35 11. A mesothelioma therapeutic agent according to any of claims 4 through 10 wherein, the antibody to IL-6 receptor is chimeric antibody, humanized antibody or human antibody.

12. A mesothelioma therapeutic agent according to claim 11 wherein, the humanized antibody to IL-6 receptor

is humanized PM-1 antibody.

13. A growth inhibitor against mesothelioma cells that contains an interleukin-6 (IL-6) antagonist as its active ingredient.

5 14. A growth inhibitor according to claim 13 wherein, the mesothelioma is pleural mesothelioma.

15 15. A growth inhibitor according to claim 14 wherein, the pleural mesothelioma is malignant pleural mesothelioma.

10 16. A growth inhibitor according to any of claims 13 through 15 wherein, the IL-6 antagonist is antibody to IL-6 receptor.

15 17. A growth inhibitor according to claim 16 wherein, the antibody to IL-6 receptor is monoclonal antibody to IL-6 receptor.

18. A growth inhibitor according to claim 16 wherein, the antibody to IL-6 receptor is monoclonal antibody to human IL-6 receptor.

20 19. A growth inhibitor according to claim 16 wherein, the antibody to IL-6 receptor is monoclonal antibody to mouse IL-6 receptor.

20. A growth inhibitor according to any of claims 16 through 19 wherein, the antibody to IL-6 receptor is recombinant antibody.

25 21. A growth inhibitor according to claim 18 wherein, the monoclonal antibody to human IL-6 receptor is PM-1 antibody.

30 22. A growth inhibitor according to claim 19 wherein, the monoclonal antibody to mouse IL-6 receptor is MR16-1 antibody.

23. A growth inhibitor according to any of claims 16 through 22 wherein, the antibody to IL-6 receptor is chimeric antibody, humanized antibody or human antibody.

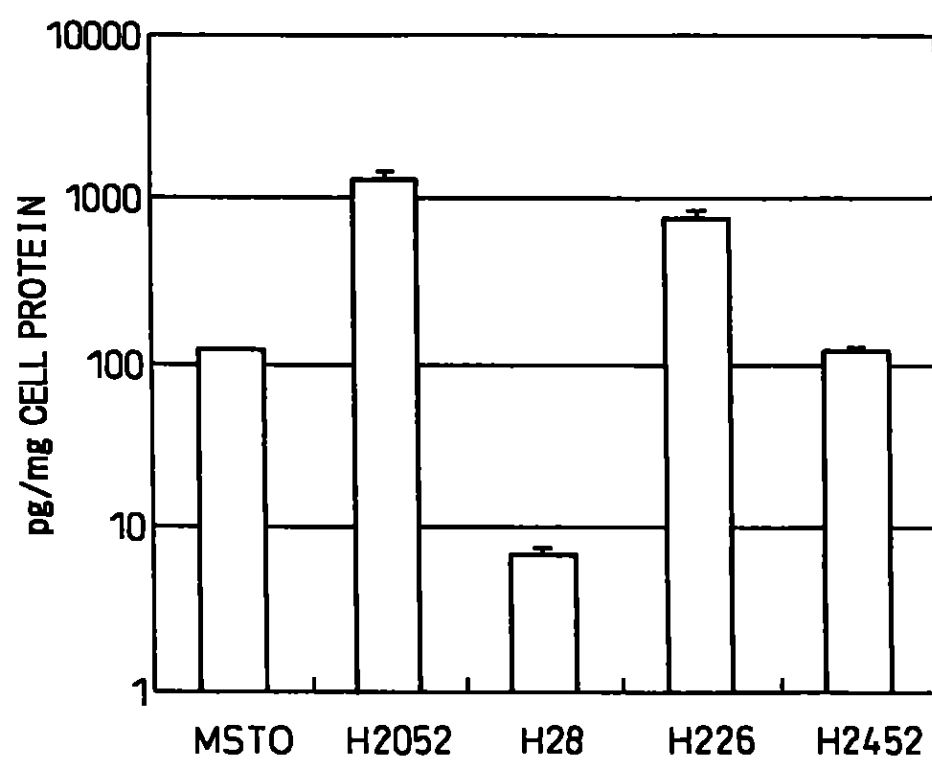
35 24. A growth inhibitor according to claim 23 wherein, the humanized antibody to IL-6 receptor is humanized PM-1 antibody.

ABSTRACT

5 The present invention provides a mesothelioma
therapeutic agent containing an interleukin-6 (IL-6)
antagonist such as antibody to IL-6 receptor (IL-6R), and
a mesothelioma cell growth inhibitor containing an IL-6
antagonist such as antibody to IL-6R.

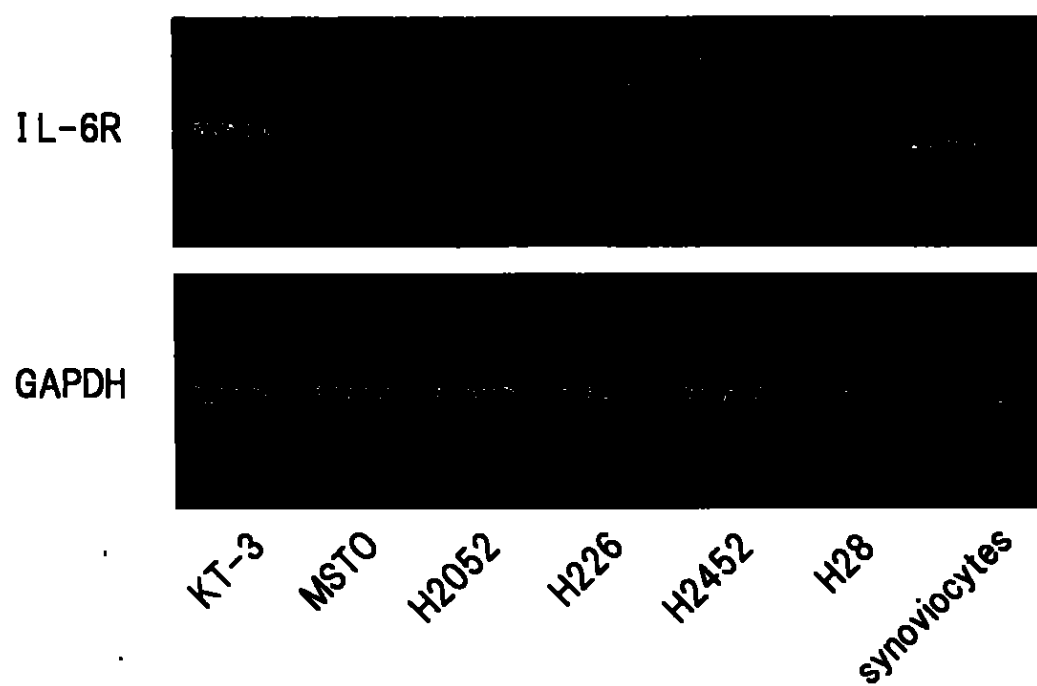
$\frac{1}{17}$

Fig. 1



~~2/17~~

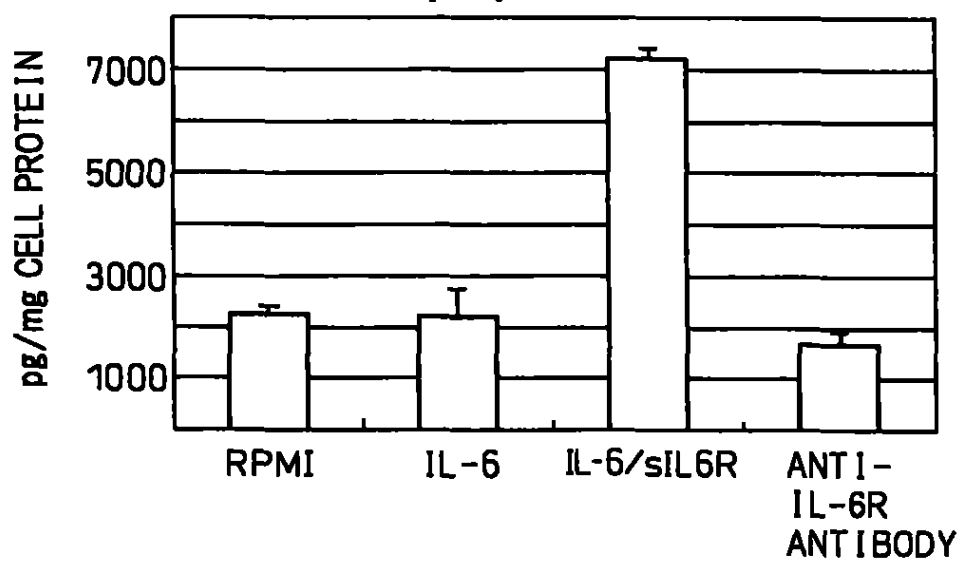
Fig.2



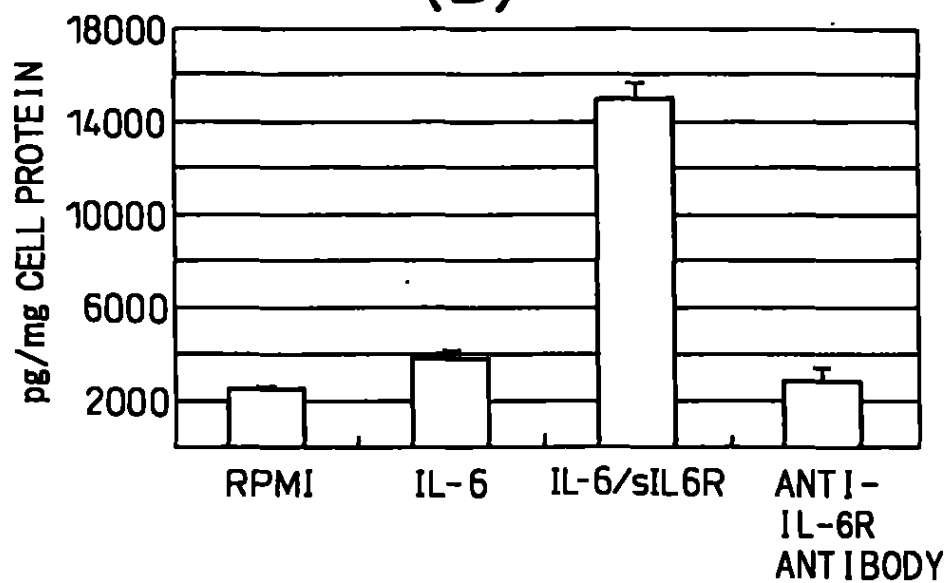
3/17

Fig.3

(A)

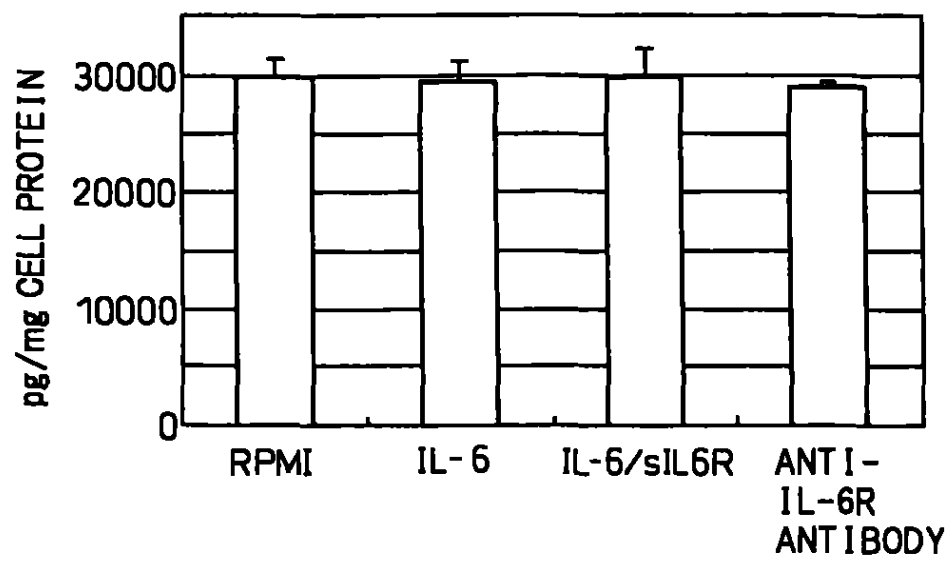


(B)



4/17

Fig.4



5/17

Fig.5

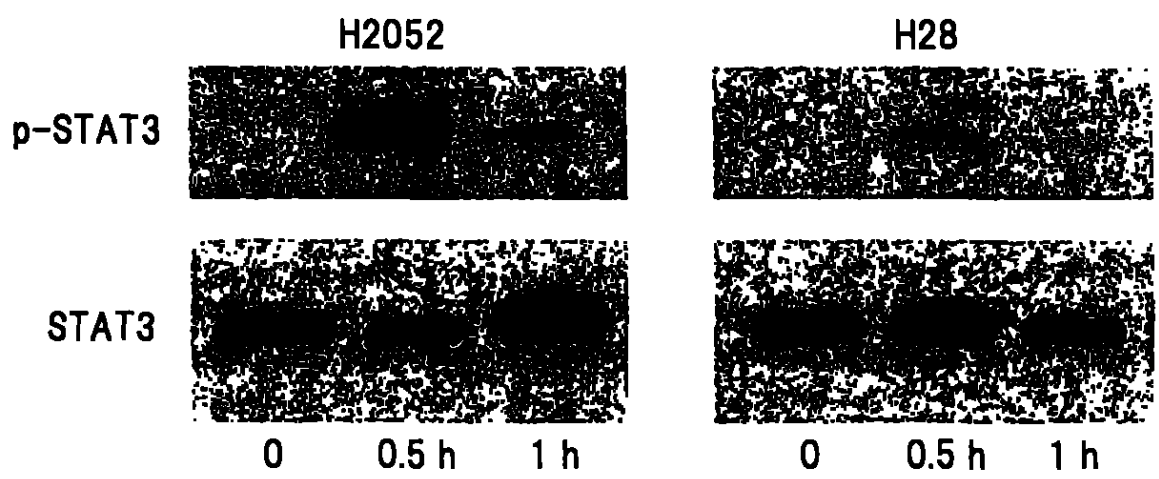
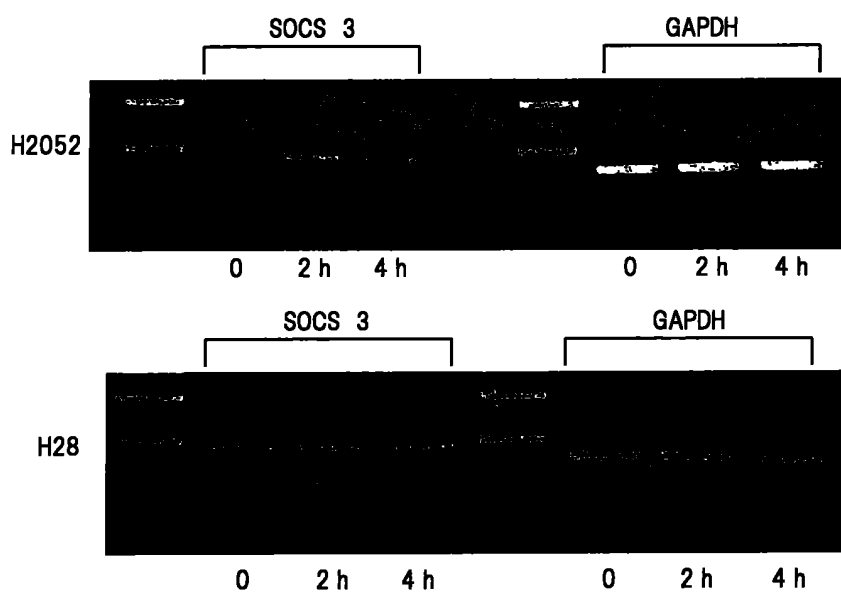


Fig 6



6/17

84

Fig 7

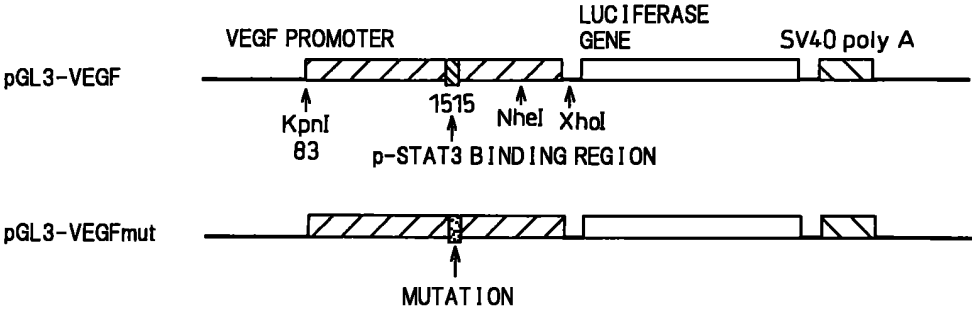
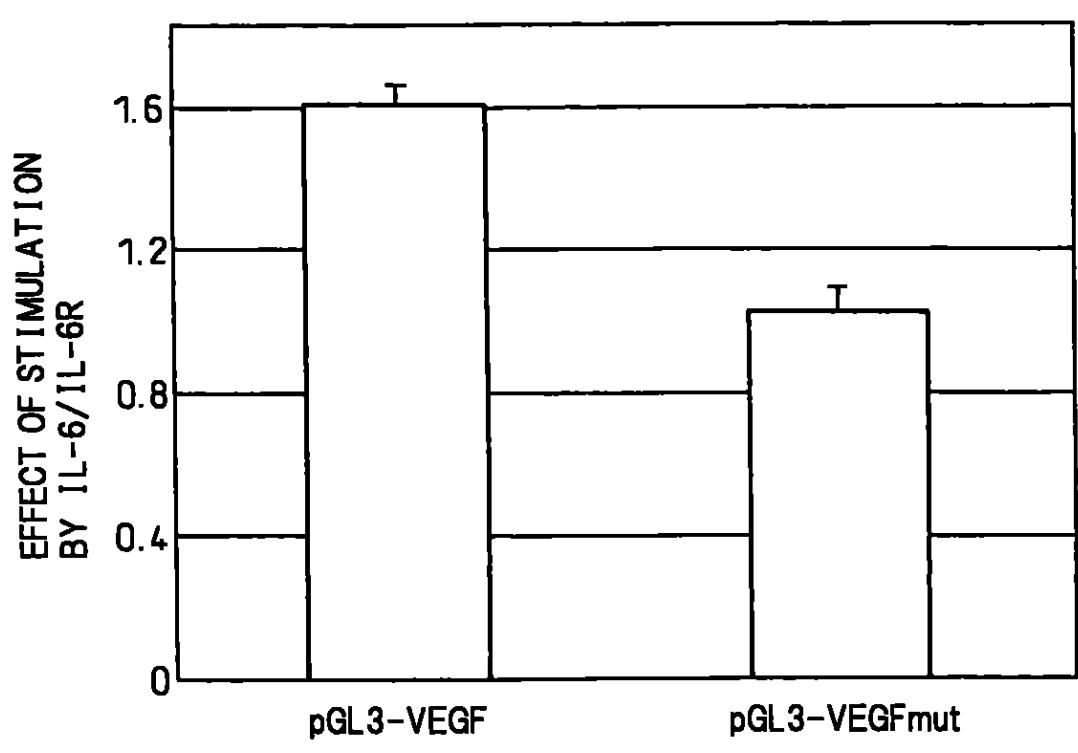
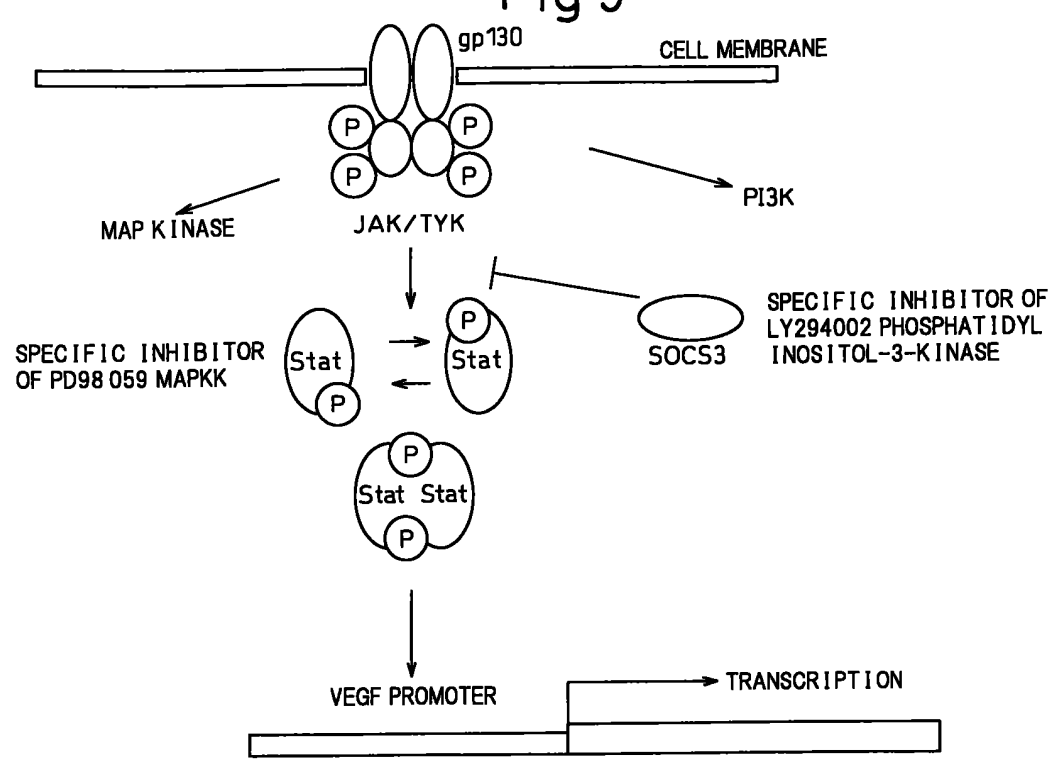


Fig.8



72

Fig 9

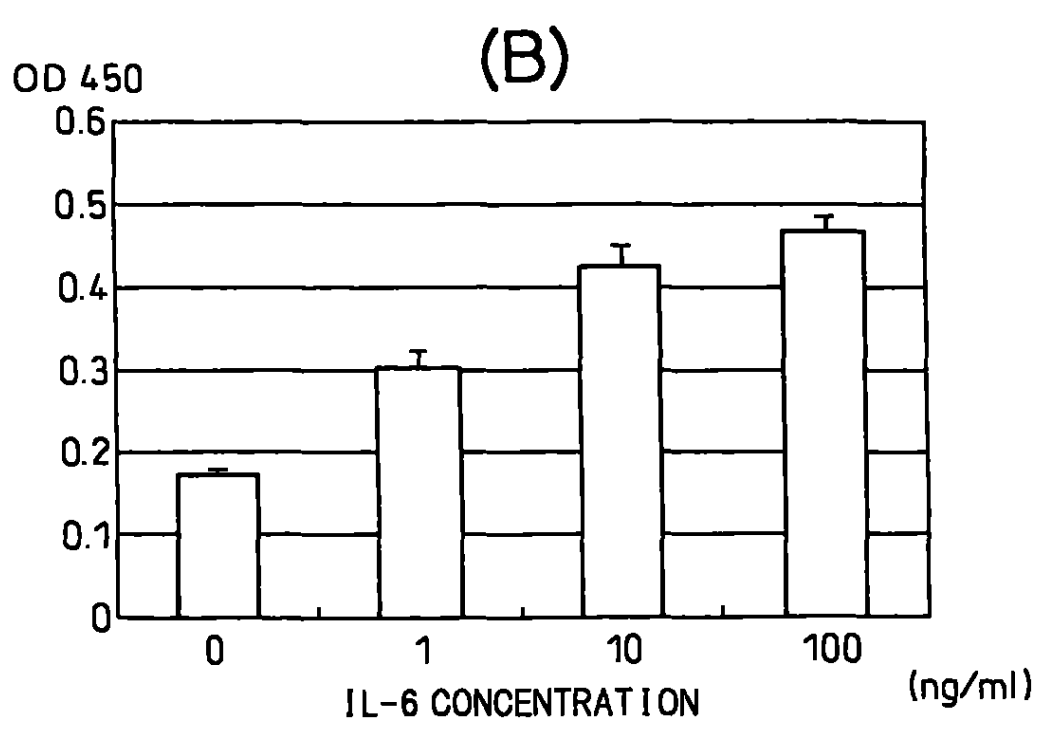
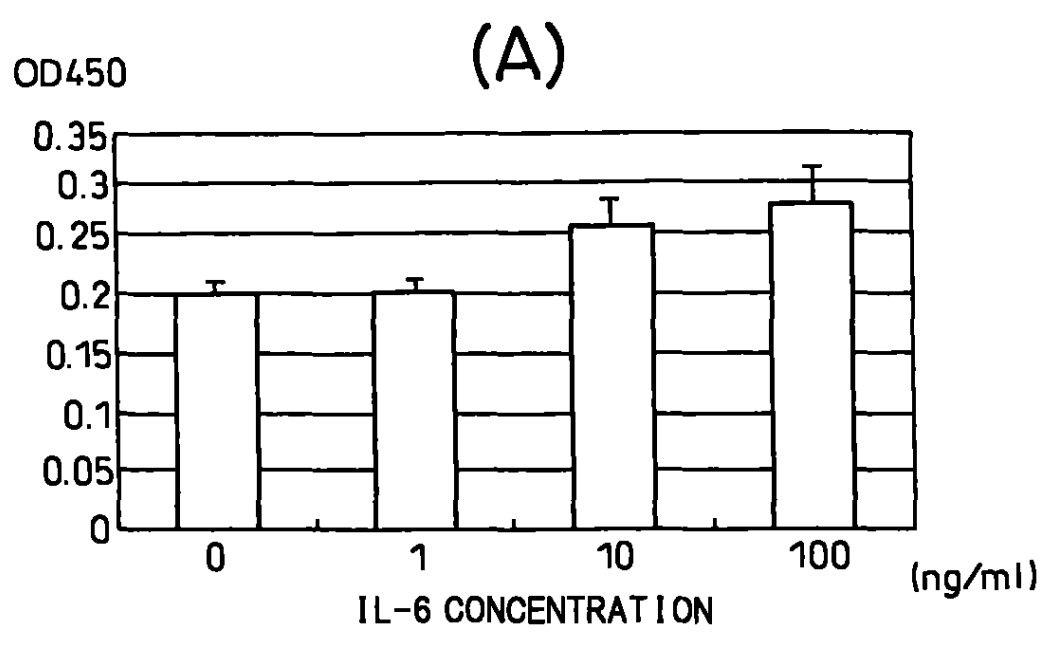


9/17

72

10/17

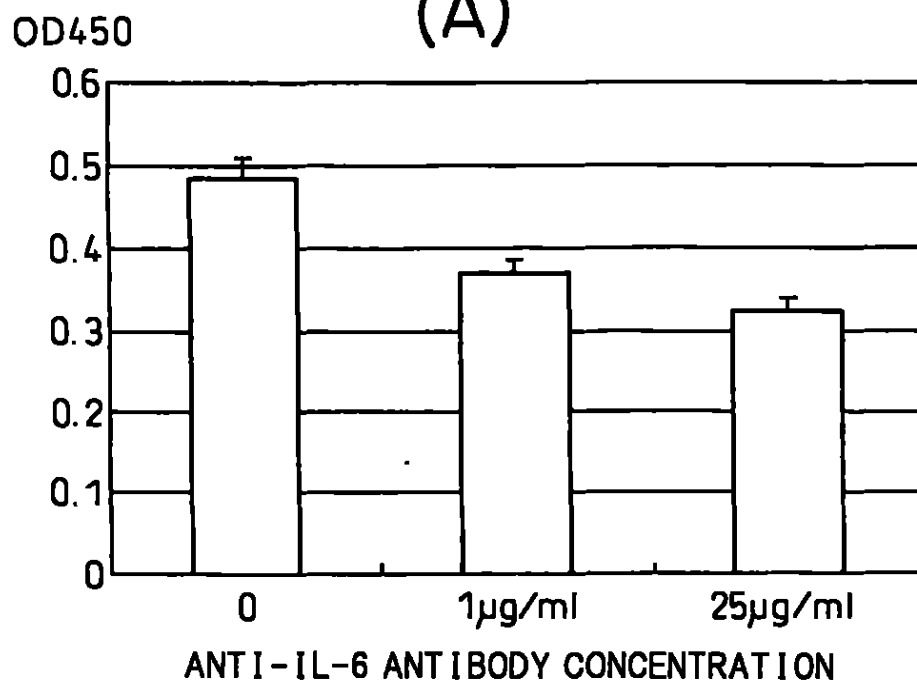
Fig.10



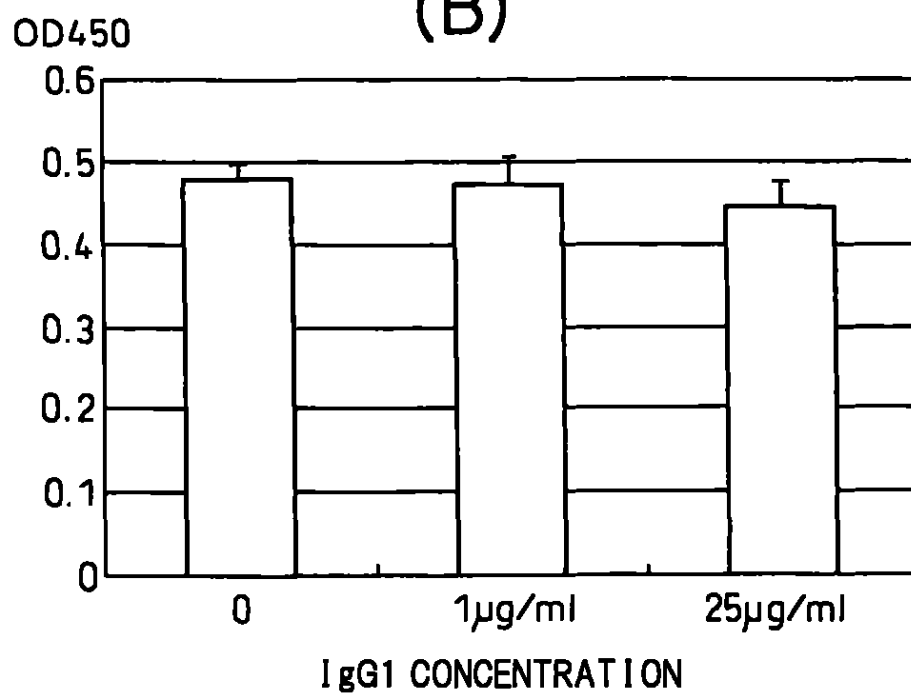
11/17

Fig. 11

(A)



(B)



12/17

Fig.12

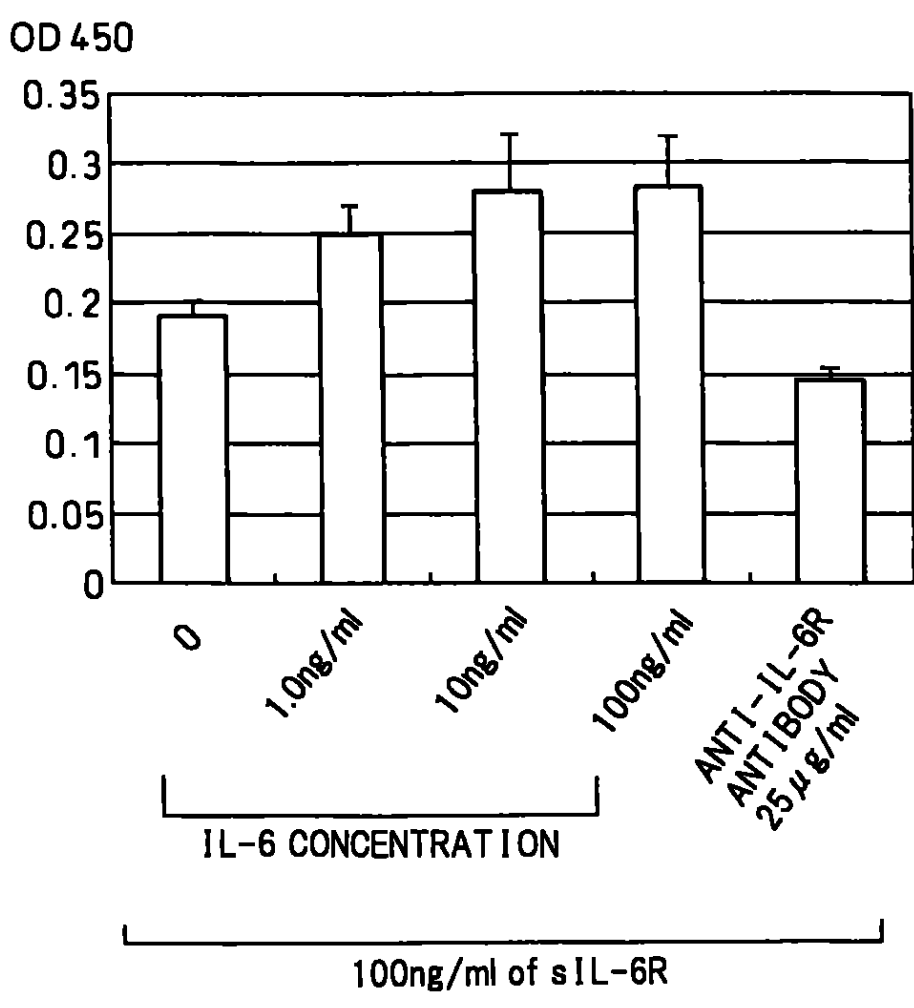
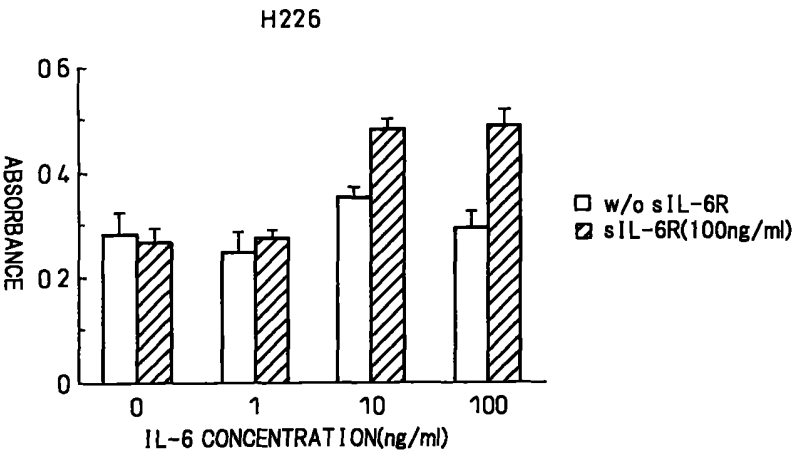


Fig 13



13/17

76

14/17

Fig.14

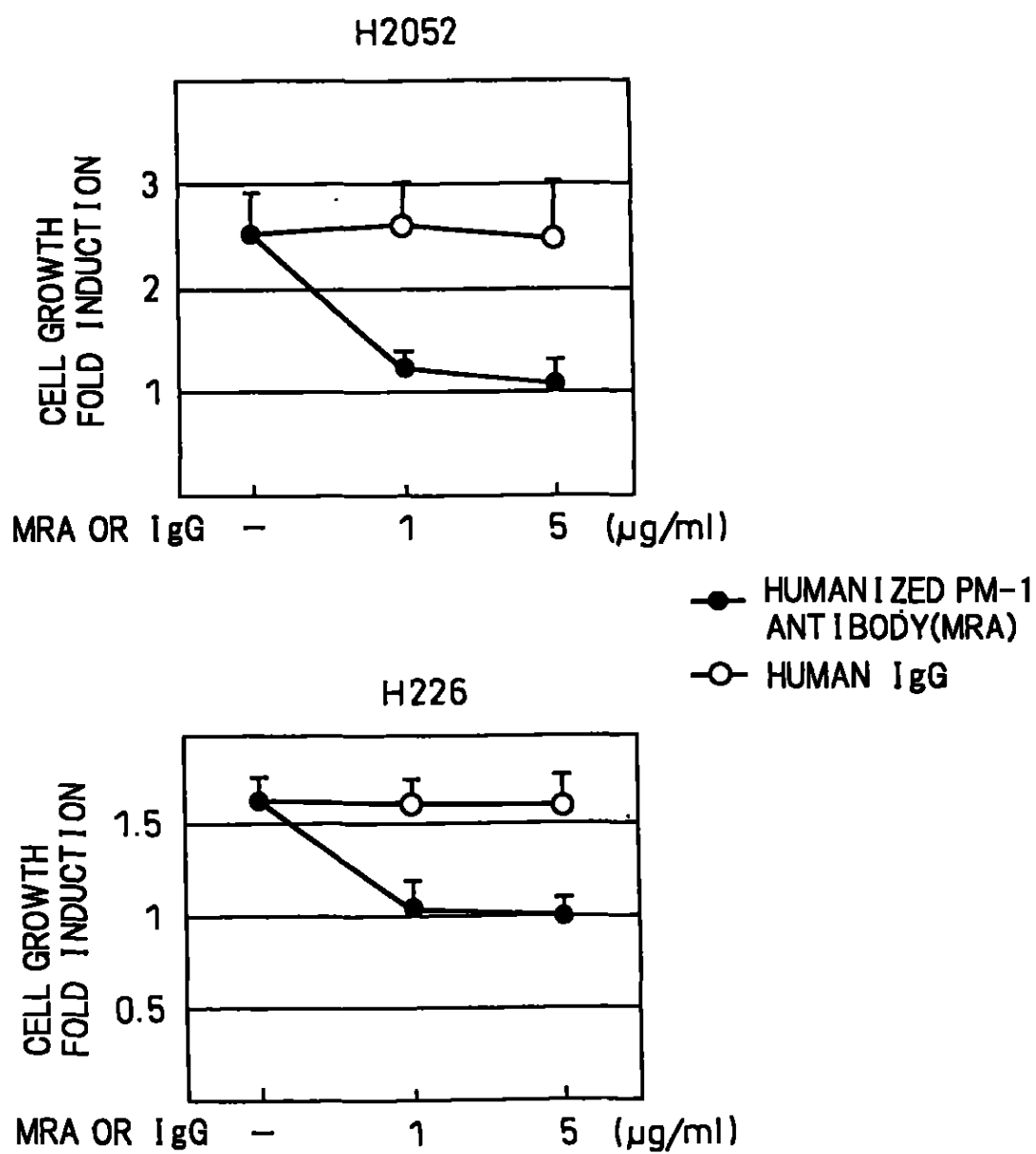
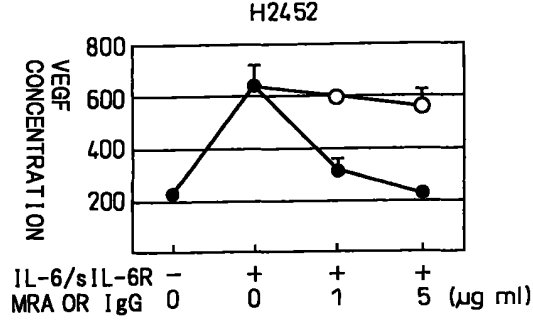
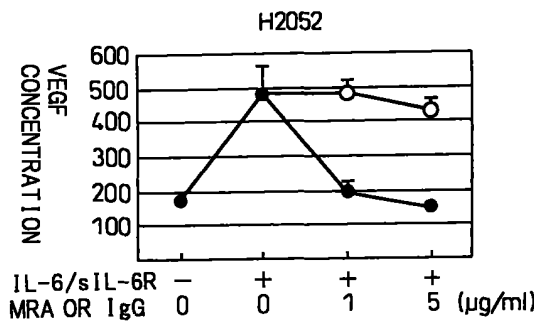
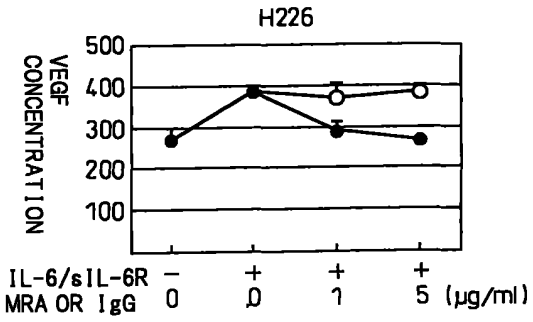
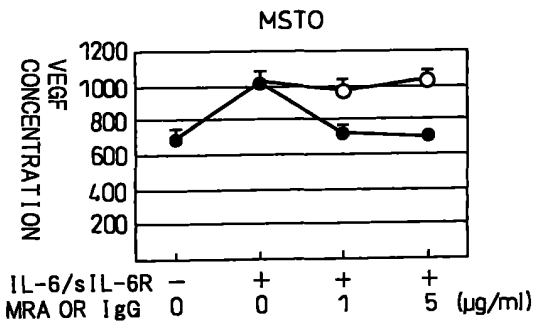


Fig 15

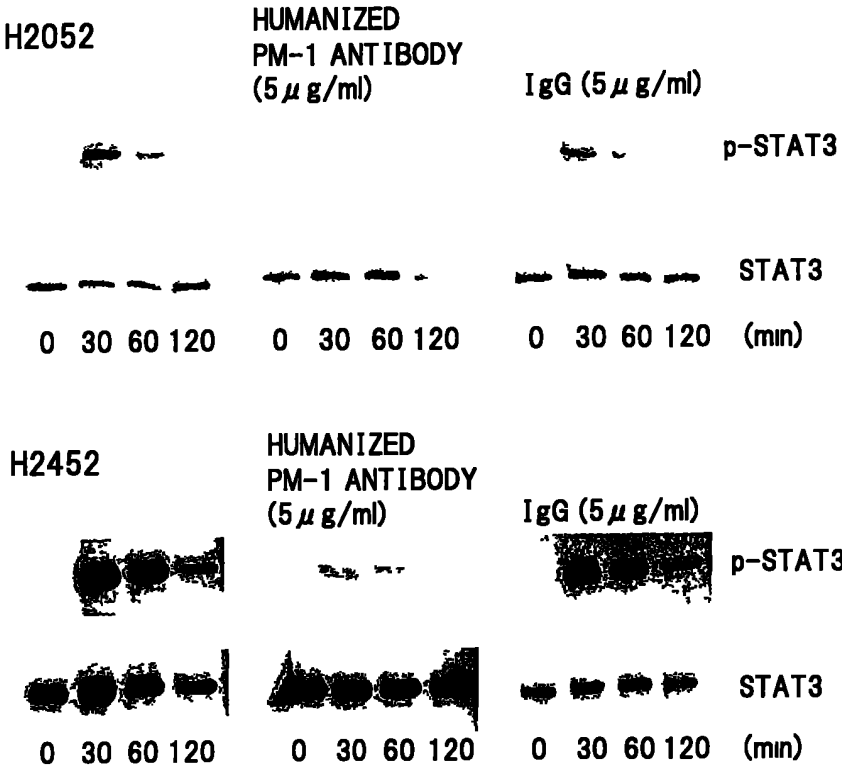
● HUMANIZED PM-1 ANTIBODY(MRA)
○ HUMAN IgG



15/17

2

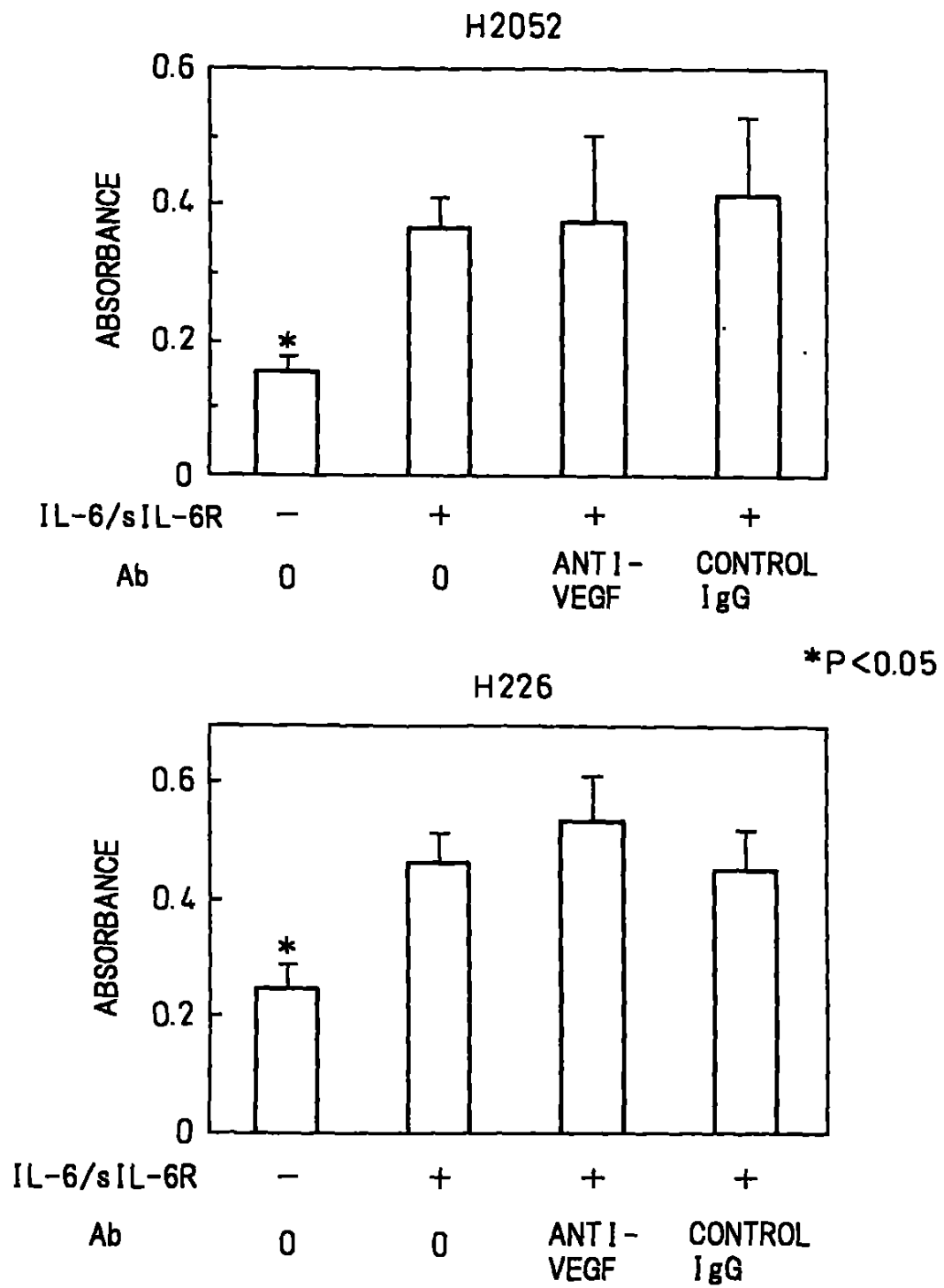
Fig 16



16/17

79

Fig.17



AGENTE TERAPÉUTICO PARA EL MESOTELIOMA

DESCRIPCION

CAMPO TECNICO

La presente invención se refiere a un nuevo agente terapéutico para el mesotelioma y al inhibidor celular del mesotelioma.

ANTECEDENTES DE LA ESPECIALIDAD

El mesotelioma es un tumor que se produce en el mesotelio que recubre la superficie de la pleura, el peritoneo y el pericardio que envuelven respectivamente a los órganos de la cavidad torácica tales como los pulmones y el corazón, y a los órganos abdominales tales como el tracto digestivo y el hígado. En el caso del mesotelioma difuso de pleura, el dolor pectoral es provocado por la invasión de los nervios intercostales en el costado de la pleura de la pared torácica y se pueden presentar trastornos respiratorios y circulatorios debidos al crecimiento del tumor y a la acumulación del líquido pleural en la pleura en el costado del órgano (Takagi, Journal of Clinical and Experimental Medicine, (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp. 469-472, 1999). Eventualmente hay proliferación en los órganos adyacentes al mediastino, que progresa hacia la invasión directa del corazón o el desarrollo en la cavidad abdominal por medio del diafragma o es posible que exista un desarrollo fuera de la cavidad torácica como resultado de las metástasis linfáticas o circulatorias adicionales (ibid).

En los Estados Unidos de América, se informó que el mesotelioma difuso de pleura se produce en 3.000 personas al año, la cantidad de casos comenzó a aumentar de manera significativa en la década del 90 y se observa con frecuencia entre los hombres alrededor de los sesenta años, siendo la incidencia en los hombres de aproximadamente cinco veces la de las mujeres (Takagi, Journal of Clinical and Experimental Medicine (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp. 469-472, 1999). De acuerdo con los informes recientes de los Estados Unidos

de América y de Europa, la incidencia del mesotelioma está demostrando una tendencia que aumenta con rapidez y sobre la base de las estadísticas epidemiológicas del Reino Unido, en 1995, se prevé que la cantidad de muertes por mesotelioma continuará aumentando durante los próximos 25 años, y en el peor de los escenarios posibles, se ha indicado que presenta un riesgo hasta el punto de dar cuenta del 1% de todas las muertes producidas entre los hombres nacidos en la década del 40 (Nakano, *Respiration*, Vol. 18, No. 9, pp. 916-925, 1999).

Se han utilizado numerosas clasificaciones diferentes de los estadios clínicos de la enfermedad para el mesotelioma y dado que los métodos utilizados para clasificar los estadios de la enfermedad difieren, los informes terapéuticos anteriores acerca del mesotelioma se han topado con dificultades en el momento de comparar los resultados del tratamiento (Nakano, *Respiration*, Vol. 18, No. 9, pp. 916-925, 1999). Una clasificación internacional de TNM para el mesotelioma maligno de pleura en 1995 por el International Mesothelioma Interest Group (IMIG) (Nakano, *Respiration* Vol. 18, No. 9, pp. 916-925, 1999).

Además, el mesotelioma maligno tiene una relación causal con la exposición a los asbestos y esto también se ha demostrado en experimentos realizados con animales (Tada, *Journal of Clinical and Experimental Medicine* (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp. 406-408, 1999). Los asbestos que han sido inhalados en el tracto respiratorio alcanzan una ubicación que está directamente por debajo de la pleura donde eventualmente se desarrolla un tumor debido a una irritación crónica durante por lo menos alrededor de 20 años, y este tumor se disemina en una capa delgada a través de toda la superficie de la pleura (Takagi, *Journal of Clinical and Experimental Medicine* (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp. 469-472, 1999). Por consiguiente, a pesar de que el mesotelioma maligno se clasifica como una enfermedad relacionada con los

asbestos, no todos los mesoteliomas malignos son provocados por los asbestos y una exposición bien documentada sólo se observa en alrededor de la mitad de todos los pacientes (Tada, Journal of Clinical and Experimental Medicine (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp. 406-408, 1999).

El mesotelioma maligno de pleura es resistente al tratamiento, se asocia con un pronóstico extremadamente pobre y requiere que se adopten medidas de prevención en forma inmediata (Nakano, Respiration, Vol. 18, No. 9, pp. 916-925, 1999). Por ejemplo, a pesar de que el antagonista del ácido fólico, el metotrexato (MTX), tiene un índice de eficacia satisfactorio del 37% en el tratamiento único a dosis altas en combinación con leucovina, su uso no ha proliferado debido a la dificultad técnica asociada con la aplicación al mesotelioma que provoca la retención de una gran cantidad de líquido pleural (Nakano, Journal of Clinical and Experimental Medicine (March Supplement) "Respiratory Diseases", pp. 570-573, 2003). Además, si bien se realizan la exéscisión pleuropulmonar y la pleurectomía para el mesotelioma difuso de pleura, existe un aumento de la susceptibilidad a la recidiva posterior al tratamiento, y el índice de recidiva local post quirúrgico en particular es alto entre el 35 y el 43% (Takagi, Journal of Clinical and Experimental Medicine (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp. 469-472, 1999).

Se sabe que numerosas líneas celulares del mesotelioma humano y diversas líneas celulares del mesotelioma de ratón expresan IL-6 in vitro y en ratones transplantados con la línea celular AB22 del mesotelioma de ratón, que expresa un alto nivel de IL-6, se informó que IL-6 se detecta en suero antes del crecimiento celular del cáncer, los síntomas clínicos y los cambios experimentados en el tejido de los linfocitos de sangre periférica (Bielefeldt-Ohmann, Cancer Immunol. Immunother. 40: 241-250, 1995). Además, los niveles séricos de IL-6 registrados en pacientes con mesotelioma maligno de pleura son superiores en comparación con los pacientes con adenoma pulmonar complicado

con derrame de pleura y con respecto a la trombocitosis, que es uno de los síntomas clínicos del mesotelioma maligno de pleura, se sabe que existe una correlación significativa entre los niveles séricos de IL-6 y los recuentos de plaquetas (Nakano, British Journal of Cancer 77 (6) : 907-912, 1998). Además las células tumorales de los pacientes con mesotelioma de pleura expresan altos niveles de IL-6, y se ha informado que los niveles de IL-6 en sangre aumentan antes de que se produzca la muerte (Rigashihara, Cancer, 15 de Octubre de 1992, Vol. 70, No. 8, pp. 2105-2108).

Como resultado de haber administrado anticuerpos IL-6 anti-ratón de rata (6B4) a ratones transplantados con AB22 con una frecuencia de dos veces por semana, Bielefeldt-Ohmann, et al. informaron que se han observado efectos que redujeron en forma considerable el inicio y la progresión de los síntomas clínicos (Bielefeldt-Ohmann, Cancer Immunol. Immunother, 40: 241-250, 1995). No obstante ello, de acuerdo con un informe realizado por Bielefeldt, el anticuerpo anti-IL-6 no tiene un efecto inhibitorio directo sobre el crecimiento en AB22 in vitro, no se ha observado ninguna diferencia en la apariencia postmortem de los ratones tratados con anti-IL-6, el anticuerpo y los que no fueron tratados con el mencionado anticuerpo y se observaron masas tumorales de un tamaño considerable inclusive en los ratones sometidos a tratamiento (Bielefeldt-Ohmann, Cancer Immunol. Immunother, 40: 241-250, 1995). A saber, la inhibición del crecimiento del mesotelioma por el anticuerpo anti-IL-6 no se ha conocido tanto in vitro como in vivo.

Takegi, Journal of Clinical and Experimental Medicine (March Supplement), "Respiratory Diseases", PP. 469-472, 1999.

Nakano, Respiration, Vol. 18, No. 9, pp. 916-925, 1999.

Tada, Journal of Clinical and Experimental Medicine (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp. 406-408, 1999.

Nakano, Journal of Clinical and Experimental Medicine (March Supplement), "Respiratory Diseases", pp. 570-573, 2003.

Bielefeldt-Ohmann, Cancer Immunol. Immunother. 40:241-250, 1995.

Higashihara, Cancer, october 16, 1992, Vol. 70, No. 8, pp. 2105-2108.

DIVULGACION DE LA INVENCION

No se sabía que los antagonistas IL-6 actúan directamente sobre el mesotelioma y que demuestran efectos inhibitorios del crecimiento. Un objeto de la presente invención es proporcionar un nuevo agente terapéutico para el mesotelioma (inhibidor del crecimiento celular del mesotelioma) que contiene un antagonista IL-6 como su ingrediente activo.

Como resultado de la realización de extensos estudios para desarrollar un nuevo agente terapéutico para el mesotelioma que inhibe el crecimiento de las células del mesotelioma, el inventor de la presente invención obtuvo el novedoso hallazgo de que el crecimiento de las células del mesotelioma se puede inhibir al inhibir o interrumpir la transmisión de la señal relacionada con IL-6, lo cual conduce por consiguiente a completar la presente invención.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un agente terapéutico para el mesotelioma que contiene un antagonista de la Interleuquina-6 (IL-6) como su ingrediente activo.

Además, la presente invención también proporciona un inhibidor del crecimiento contra las células del mesotelioma que contiene un antagonista de la interleuquina-6 (IL-6) como su ingrediente activo.

El mesotelioma que se mencionó con anterioridad es, por ejemplo, el mesotelioma de pleura y de manera más específica, el mesotelioma maligno de pleura. El mesotelioma difuso de pleura está incluido en el mesotelioma maligno de pleura.

El antagonista IL-6 que se mencionó con anterioridad es, por ejemplo, un anticuerpo para la IL-6 o un anticuerpo para el receptor de la IL-6 y preferentemente un anticuerpo monoclonal para el receptor de la IL-6. El anticuerpo que se mencionó con anterioridad para el receptor de la IL-6 es preferentemente en particular un anticuerpo monoclonal para el receptor de la IL-6 humana tal como el anticuerpo PM-1, o un anticuerpo monoclonal para el receptor IL-6 de ratones tal como el anticuerpo MR16-1. El anticuerpo mencionado con anterioridad para el receptor IL-6 es preferentemente un anticuerpo recombinante.

El anticuerpo mencionado con anterioridad para el receptor IL-6 puede ser un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano. En la presente invención, un anticuerpo que se prefiere en forma particular es el anticuerpo humanizado-FM-1.

La presente invención también puede ser de las formas que se indican a continuación.

- (1) El uso de un antagonista de interleuquina-6 (IL-6) para producir un agente terapéutico para el mesotelioma.
- (2) El uso de acuerdo con (1) que se mencionó con anterioridad en el cual el mesotelioma es el mesotelioma de pleura.
- (3) El uso de acuerdo con (2) que se mencionó con anterioridad en el cual el mesotelioma es el mesotelioma de pleura.
- (4) El uso de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) que se mencionaron con anterioridad en los cuales el antagonista IL-6 es un anticuerpo para el receptor de IL-6.
- (5) El uso de acuerdo con (4) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo para el receptor IL-6 es un anticuerpo monoclonal del receptor de IL-6.

- (6) El uso de acuerdo con (4) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo para el receptor IL-6 es un anticuerpo monoclonal del receptor de IL-6 humano.
- (7) El uso de acuerdo con (4) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo para el receptor IL-6 es un anticuerpo monoclonal del receptor de IL-6 del ratón.
- (8) El uso de acuerdo con cualquiera de (4) a (7) que se mencionaron con anterioridad en los cuales el anticuerpo para el receptor IL-6 es un anticuerpo recombinante.
- (9) El uso de acuerdo con (6) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo monoclonal del receptor de IL-6 es el anticuerpo PM-1.
- (10) El uso de acuerdo con (7) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo monoclonal del receptor IL-6 del ratón es MR16-1.
- (11) El uso de acuerdo con cualquiera de (4) a (10) que se mencionaron con anterioridad en los cuales el anticuerpo para el receptor IL-6 es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano para el receptor IL-6.
- (12) El uso de acuerdo con (11) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo humanizado para el receptor IL-6 es un anticuerpo FM-1 humanizado.
- (13) El uso de un antagonista de la interleuquina-6 (IL-6) para producir un inhibidor del crecimiento contra las células del mesotelioma.
- (14) El uso de acuerdo con (13) que se mencionó con anterioridad en el cual el mesotelioma es el mesotelioma de pleura.
- (15) El uso de acuerdo con (14) que se mencionó con anterioridad en el cual el mesotelioma de pleura es un mesotelioma de pleura maligno.

- (16) El uso de acuerdo con cualquiera de (13) a (15) que se mencionan con anterioridad en los cuales el antagonista de la interleuquina-6 es un anticuerpo para el receptor de IL-6.
- (17) El uso de acuerdo con (16) que se menciona con anterioridad en el cual el anticuerpo para el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6.
- (18) El uso de acuerdo con (16) que se menciona con anterioridad en el cual el anticuerpo para el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 humano.
- (19) El uso de acuerdo con (16) que se menciona con anterioridad en el cual el anticuerpo para el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 humano.
- (20) El uso de acuerdo con cualquiera de (16) a (19) que se mencionan con anterioridad en los cuales el anticuerpo para el receptor de IL-6 es un anticuerpo recombinante.
- (21) El uso de acuerdo con (18) que se menciona con anterioridad en el cual el anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 humano es el anticuerpo PM-1.
- (22) El uso de acuerdo con (19) que se menciona con anterioridad en el cual el anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 del ratón es el anticuerpo MR16-1.
- (23) El uso de acuerdo con cualquiera de (16) a (22) que se mencionan con anterioridad en los cuales el anticuerpo para el receptor de IL-6 es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano para el receptor IL-6.

- (24) El uso de acuerdo con (23) que se menciona más arriba en el cual el anticuerpo humanizado para el receptor de IL-6 es el anticuerpo humanizado PM-1.

La presente invención también puede adoptar las formas que se indican a continuación.

- (1) Un método de tratamiento para el mesotelioma que comprende: la administración de un antagonista de la interleuquina-6 (IL-6) a un paciente que requiera el tratamiento mencionado.
- (2) El método de acuerdo con (1) que se mencionó con anterioridad en el cual el mesotelioma es el mesotelioma de pleura.
- (3) El método de acuerdo con (2) que se mencionó con anterioridad en el cual el mesotelioma de pleura es el mesotelioma de pleura maligno.
- (4) El método de acuerdo con cualquiera de (1) a (3) que se mencionaron con anterioridad en los cuales el antagonista de IL-6 es un anticuerpo para el receptor de IL-6.
- (5) El método de acuerdo con (4) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo para el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6.
- (6) El método de acuerdo con (4) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo para el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6.
- (7) El método de acuerdo con (4) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo para el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 del ratón.
- (8) El método de acuerdo con cualquiera de (4) a (7) que se mencionaron con anterioridad en los cuales el anticuerpo para el receptor de IL-6 es un anticuerpo recombinante.

- (9) El método de acuerdo con (6) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 humano es el anticuerpo PM-1.
- (10) El método de acuerdo con (7) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 de ratón es el anticuerpo MR16-1.
- (11) El método de acuerdo con cualquiera de (4) a (10) que se mencionaron con anterioridad en los cuales el anticuerpo para el receptor de IL-6 es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano para el receptor IL-6.
- (12) El método de acuerdo con (11) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo humanizado para el receptor de IL-6 es el anticuerpo humanizado PM-1.
- (13) Un método para inhibir el crecimiento de las células del mesotelioma que comprenden: la administración de un antagonista de la interleuquina-6 (IL-6) a un paciente que requiera tal inhibición.
- (14) El método de acuerdo con (13) que se mencionó con anterioridad en el cual el mesotelioma es el mesotelioma de pleura.
- (15) El método de acuerdo con (14) que se mencionó con anterioridad en el cual el mesotelioma de pleura es el mesotelioma de pleura maligno.
- (16) El método de acuerdo con cualquiera de (13) a (15) que se mencionaron con anterioridad en los cuales el antagonista de IL-6 es un anticuerpo para el receptor de IL-6.
- (17) El método de acuerdo con (16) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo para el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6.

- (18) El método de acuerdo con (16) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo para el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 humano.
- (19) El método de acuerdo con (16) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo para el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 de ratón.
- (20) El método de acuerdo con cualquiera de (16) a (19) que se mencionaron con anterioridad en los cuales el anticuerpo para el receptor de IL-6 es un anticuerpo recombinante.
- (21) El método de acuerdo con (18) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 humano es el anticuerpo PM-1.
- (22) El método de acuerdo con (19) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 de ratón es el anticuerpo MR16-1.
- (23) El método de acuerdo con cualquiera de (16) a (22) que se mencionaron con anterioridad en los cuales el anticuerpo para el receptor de IL-6 es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano para el receptor de IL-6.
- (24) El método de acuerdo con (23) que se mencionó con anterioridad en el cual el anticuerpo humanizado para el receptor de IL-6 es el anticuerpo PM-1 humanizado.

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 1 al indicar las productividades de IL-6 por medio de varias líneas celulares del mesotelioma maligno.

La Fig. 2 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 2 al indicar las productividades (la falta de las mismas) del receptor de IL-6 (IL-6R) por medio de varias líneas celulares del mesotelioma maligno. Además, GAPDH indica la cantidad de ANRm de GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa) utilizada como un control interno.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 3, en el cual la producción del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) por las líneas celulares H2052 y H2452 del mesotelioma maligno es inducida por IL-6 e IL-6R.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 4 en el cual se realizó un experimento similar al Ejemplo 3 para la línea celular H28 del mesotelioma maligno al indicar que esta línea celular produce el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) sin requerir la inducción por parte de IL-6/IL-6R.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 5, en el cual en contraste con la fosforilación de STAT3 debida a la estimulación por parte de IL-6 que es promovida en la línea celular H2025, en la fosforilación de STAT3 debida a la estimulación por parte de IL-6 no es promovida en la línea celular H28, en cuya producción de VEGF no es inducida por IL-6.

La Fig. 6 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 6, en el cual en contraste con la expresión de SOCS3 debida a la estimulación por parte de IL-6 e IL-6R que es inducida en la línea celular H2025, en cuya producción de VEGF es inducida por IL-6, SOCS3 no se expresa de manera no inductiva en la línea celular H28, en cuya producción de VEGF no es inducida por IL-6.

La Fig. 7 es un dibujo que muestra la estructura de un promotor de los plasmidos pGL3-VEGF y pGL3-VEFGmut junto con su vecindad utilizada en el Ejemplo 7.

La Fig. 8 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 7, en el cual en un sistema en el cual el promotor VEGF se acopla al gen reportero de luciferasa, en el caso de alterar el sitio de unión de p-STAT3 dentro del promotor VEGF, la activación del promotor VEGF por parte de IL-6 no se produce.

La Fig. 9 es un dibujo esquemático que muestra el mecanismo de inducción del promotor VEGF (producción de VEGF) debido a la estimulación por parte de IL-6 en la línea celular H2052 tal como se predijo en los resultados de los Ejemplos 5 a 7.

La Fig. 10 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 8, en el cual el crecimiento de la línea celular H2052 aumenta de manera dependiente la concentración de IL-6 en presencia de IL-6R.

La Fig. 11 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 9, en el cual la promoción del crecimiento de la línea celular H2052 por parte de IL-6 e IL-6R se inhibe por parte de MRA.

La Fig. 12 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 10, en el cual el crecimiento de la línea celular H226 aumenta de manera dependiente de la concentración de IL-6 en presencia de IL-6R, y que MRA demuestra los efectos inhibitorios sobre dicho crecimiento.

La Fig. 13 es un gráfico que muestra los resultados del Experimento 8 al indicar que el crecimiento de la línea celular H226 aumenta de manera dependiente la concentración de IL-6 en presencia de IL-6R.

La Fig. 14 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 11, en el cual la promoción del crecimiento de las líneas celulares H2052 y H226 del mesotelioma maligno por parte de IL-6 y del receptor soluble de IL-6 es inhibida por medio del anticuerpo humanizado PM-1.

La Fig. 15 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 12, en el cual la inducción de la producción de VEGF por medio de la estimulación de IL-6

en la líneas celulares MSTO, H226, H2052 y H2452 del mesotelioma maligno es inhibida por parte del anticuerpo humanizado PM-1.

La Fig. 16 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 13, en el cual la fosforilación de STAT3 inducida por la estimulación de IL-6/IL-6R soluble en la líneas celulares H2052 y H2452 es inhibida por parte del anticuerpo humanizado PM-1.

La Fig. 17 es un gráfico que muestra los resultados del Ejemplo 14, en el cual la promoción del crecimiento de las líneas celulares H2052 y H226 por medio de la estimulación de IL-6 y del receptor soluble de IL-6 es inhibida por medio del anticuerpo anti-VEGF

MEJOR MODO DE REALIZAR LA INVENCION

IL-6 es una citoquina a la cual también se la denomina factor 2 estimulador de las células B (BSF2) o interferon β 2. Inicialmente se descubrió que IL-6 era el factor de diferenciación involucrado en la activación de las células linfocíticas B (Hirano, T. et al., Nature (1986) 324, 73-76), después de lo cual se determinó que era una citoquina multifuncional que tiene efectos sobre las funciones de varias células (Akira, S. et al., Adv. In Immunology (1993) 54, 1-78). También se informó que IL-6 induce la maduración de las células linfocíticas T (Lotz, M. et al., J. Exp. Med. (1988) 167, 1253-1258).

IL-6 transmite su actividad biológica por medio de varias proteínas sobre las células. Una de ellas es la proteína de unión con el ligando de los receptores de IL-6 que tienen un peso molecular de alrededor de 80 kD (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981; Yamasaki, K. et al., Science (1987) 241, 825-828). Además de existir en una forma de enlace con la membrana que se expresa sobre la membrana celular por medio de la penetración de la membrana celular, también existen los receptores de IL-6 como receptores solubles de IL-6 principalmente compuestos por una región extracelular.

Otra de ellas es una proteína de la membrana gp130 que tiene un peso molecular de alrededor de 130 kD que está involucrada en la transmisión de la señal de unión de un ligando. IL-6 y los receptores de IL-6 forman un complejo IL-6/receptor de IL-6 y como resultado de la unión subsiguiente con gp130, la actividad biológica de IL-6 se transmite a las células (Taga, T. et al., Cell (1999) 58, 573-591).

Los antagonistas de IL-6 son sustancias que inhiben la transmisión de la actividad biológica de IL-6. Los ejemplos conocidos de estos antagonistas de IL-6 incluyen el anticuerpo para IL-6 (anticuerpo anti-IL-6), el anticuerpo para los receptores de IL-6 (anticuerpo del receptor anti-IL-6), el anticuerpo para gp130 (anticuerpo anti-gp130), la variante IL-6, o IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6.

Se registraron muchos informes con respecto al anticuerpo del receptor (Novich, D. et al., Hybridoma (1991) 10, 137-146; Huang, Y.W. et al., Hybridoma (1993) 12, 621-630; Publicación Internacional Sin Examinar de la Patente N° WO 95-09873; Publicación Francesa Sin Examinar de la Patente N° FR 2694767, y la Patente de los Estados Unidos de América N° US 521628). Se sabe que el anticuerpo humanizado PM-1 se obtiene por medio del trasplante de la región de determinación de complementariedad (CDR) de una de ellas en la forma de anti-PM1 de ratón (Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906) para el anticuerpo humano (Publicación Internacional Sin Examinar de la Patente N° WO 92-19759).

El antagonista de IL-6 que se mencionó con anterioridad es preferentemente un anticuerpo para el receptor de IL-6, y de manera más preferente un anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 humano o un anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 de ratón. Un ejemplo del anticuerpo monoclonal que se mencionó con anterioridad para el receptor de IL-6

humano es el anticuerpo PM-1, mientras un ejemplo del anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 de ratón es preferentemente un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano, un ejemplo del cual es el anticuerpo PM-1 humanizado.

Existen limitaciones particulares sobre el origen, el tipo o la forma del antagonista de IL-6 utilizado en la presente invención con tal que inhiba el crecimiento de las células del mesotelioma y sea útil como ingrediente activo de un agente terapéutico para el mesotelioma.

Los antagonistas de IL-6 son sustancias que inhiben la actividad biológica de IL-6 mediante la interrupción de la transmisión de la señal por parte de IL-6. Los antagonistas de IL-6 son preferentemente sustancias que tienen una acción inhibitoria contra la unión de IL-6, el receptor de IL-6 y gp130. Los ejemplos de los antagonistas de IL-6 incluyen el anticuerpo anti-IL-6, el anticuerpo del receptor anti-IL-6, el anticuerpo anti-gp130, las variantes de IL-6, las variantes del receptor de IL-6 soluble, los péptidos parciales del receptor de IL-6 y las sustancias de bajo peso molecular que demuestran una actividad similar.

El anticuerpo anti-IL-6 utilizado en la presente invención se puede obtener como un anticuerpo monoclonal o policlonal utilizando los métodos conocidos. El anticuerpo monoclonal de origen mamífero es particularmente preferible para el anticuerpo anti-IL-6 utilizado en la presente invención. Los ejemplos de los anticuerpos monoclonales de origen mamífero incluyen los producidos por los hibridomas y los producidos por los huéspedes transformados con un vector de expresión que contenga el gen del anticuerpo utilizando las técnicas de ingeniería genética. Este anticuerpo interrumpe la transmisión de la actividad biológica de IL-6 a las células como resultado de la inhibición de la unión de IL-6 con los receptores de IL-6 mediante la unión con IL-6.

Los Ejemplos de estos anticuerpos incluyen MH166 (Matsuda, T. et al., Eur. J. Immunol. (1998) 18, 951-956) y el anticuerpo SK2 (Sato, K. et al., 21st General Meeting of the Japanese Society for Immunology, Academic Record (1991) 21, 166).

El hibridoma que produce el anticuerpo anti-IL-6 se puede producir básicamente de la manera como se describe a continuación utilizando la tecnología conocida. Es decir que este anticuerpo se puede producir por medio del uso de IL-6 como un antígeno de sensibilización, inmunizando con esto de acuerdo con los métodos comunes de inmunización, fusionando los inmunocitos resultantes con las células huésped conocidas de acuerdo con los métodos comunes de fusión celular y seleccionando luego las células que producen el anticuerpo monoclonal de acuerdo con los métodos comunes de selección.

De manera más específica, la producción del anticuerpo de IL-6 se debe realizar de la manera como se describe a continuación. La IL-6 humana utilizada como agente de sensibilización para adquirir el anticuerpo se obtiene mediante la utilización del gen IL-6/la secuencia de aminoácidos revelada en Eur. J. Biochem. (1987) 168, 543-550; J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541, o, Agr. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688.

Después de insertar la secuencia del gen de IL-6 dentro de un sistema de vector de expresión conocido y transformar las células huésped adecuadas, la proteína de IL-6 a la cual se apunta es purificada por medio de los métodos conocidos a partir de las células huésped o del sobrenadante del cultivo, seguido de la utilización de esta proteína de IL-6 como un antígeno de sensibilización. De igual modo, una proteína fusionada que consiste en la proteína de IL-6 y otra proteína también pueden ser utilizadas como antígeno de sensibilización.

El anticuerpo del receptor anti-IL-6 utilizado en la presente invención se puede obtener en la forma de un anticuerpo policlonal o monoclonal utilizando los

medios conocidos. El anticuerpo monoclonal de origen mamífero es particularmente preferido para el anticuerpo del receptor anti-IL-6 utilizado en la presente invención. Los ejemplos del anticuerpo monoclonal que se originan en las células de mamíferos incluyen a aquéllos producidos por los hibridomas y a aquéllos producidos en un huésped transformado con un vector de expresión que contiene el gen del antígeno por medio de las técnicas de ingeniería genética. Como resultado de esta unión con el anticuerpo con los receptores de IL-6, la unión de IL-6 con los receptores de IL-6 se inhibe, por lo tanto interrumpe la transmisión de la actividad biológica de IL-6 a las células.

Los ejemplos de estos anticuerpos incluyen el anticuerpo MR16-1 (Tamura, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci, USA (1993) 90, 11924-11928), el anticuerpo PM-1 (Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906), el anticuerpo AUK12-20, el anticuerpo AUK64-7 y AUK146-15 (Publicación Internacional No Examinada de la Patente Nº WO 92-19759). Entre estos, el anticuerpo PM-1 es particularmente preferido para ser utilizado como el anticuerpo.

Por otra parte, se ha depositado a nivel internacional la línea celular del hibridoma que produce el anticuerpo PM-1 sobre la base del Tratado de Budapest bajo la designación FERM BP-2988 el 12 de Julio de 1989 en el Organismo Internacional de Depósito de Patentes del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) como PM-1. De igual modo, se ha depositado a nivel internacional la línea celular del hibridoma que produce el anticuerpo MR16-1 sobre la base del Tratado de Budapest bajo la designación FERM BP-5875 el 13 de Marzo de 1997 en el Organismo Internacional de Depósito de Patentes del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) como MR16-1 del hibridoma de ratón – rata.

El híbrdoma que produce el anticuerpo monoclonal del receptor anti-IL-6 se puede producir básicamente de la manera como se describe a continuación utilizando la tecnología conocida. Es decir que este híbrdoma se puede producir mediante la utilización del receptor de IL-6 como antígeno de sensibilización, inmunizando con esto de acuerdo con los métodos comunes de inmunización, fusionando los inmunocitos resultantes con las células huésped conocidas de acuerdo con los métodos comunes de fusión celular y seleccionando luego las células que producen el anticuerpo monoclonal de acuerdo con los métodos comunes de selección.

Más específicamente, la producción del anticuerpo del receptor de IL-6 se debe realizar de la manera como se describe a continuación. Por ejemplo, el receptor de IL-6 humana utilizado como agente de sensibilización para adquirir el anticuerpo se obtiene mediante la utilización del gen receptor de IL-6/la secuencia de aminoácidos divulgada en la Publicación Europea No Examinada de la Patente Nº EP 325474, mientras que el receptor de IL-6 de ratón se obtiene mediante el uso del gen del receptor de IL-6/la secuencia de aminoácidos divulgada en la Publicación Japonesa No Examinada de la Patente Nº 3-155795.

Existen dos tipos de proteínas del receptor de IL-6 que consisten en aquella que es expresada en la membrana celular y la que es liberada por la membrana celular (receptor soluble de IL-6) (Yasakawa, K. et al., J. Biochem. (1990) 108, 673-676). El anticuerpo del receptor soluble de IL-6 está substancialmente compuesto por la región extracelular del receptor de IL-6 que se une a la membrana celular y difiere del receptor de IL-6 unido a la membrana en que falta una región que penetre en la membrana celular o una región que penetre en la membrana celular y en la región intracelular. La proteína del receptor de IL-6 puede utilizar cualquier receptor de IL-6 siempre y cuando pueda

ser utilizado como un antígeno de sensibilización para producir el anticuerpo del receptor anti-IL-6 utilizado en la presente invención.

Después de insertar la secuencia del gen del receptor de IL-6 en un sistema conocido de vector de expresión para transformar las células huésped adecuadas, el receptor de IL-6 al cual se apunta es purificado por medio de los métodos conocidos a partir de las células huésped o del sobrenadante del cultivo, seguido de la utilización de la proteína del receptor de IL-6 purificada como un antígeno de sensibilización. De igual modo, una proteína fusionada que consiste en las células que expresan al receptor IL-6 o a la proteína del receptor de IL-6 y otra proteína también pueden ser utilizadas como antígeno de sensibilización.

El plasmido pIBBSF2R que contiene *Escherichia coli* (*E. coli*) que contiene el ADNc que codifica al receptor IL-6 humano se ha depositado a nivel internacional sobre la base del Tratado de Budapest bajo la designación FERM BP-2232 el 9 de Enero de 1989 en el Organismo Internacional de Depósito de Patentes del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) como HB101-pIBBSF2R.

El anticuerpo anti-gp130 utilizado en la presente invención se puede obtener en la forma de un anticuerpo policlonal o monoclonal utilizando los medios conocidos. El anticuerpo monoclonal de origen mamífero se prefiere de manera particular para el anticuerpo anti-gp130 utilizado en la presente invención. Los anticuerpos monoclonales que se originan en los mamíferos incluyen aquéllos producidos por los hibridomas y aquéllos producidos en un huésped transformado con un vector de expresión que contiene el gen del anticuerpo por medio de las técnicas de ingeniería genética. Este anticuerpo inhibe la unión del complejo IL-6/receptor de IL-6, por lo tanto interrumpe la transmisión de la actividad biológica de IL-6 a las células por medio de la unión con gp130.

Los ejemplos de estos anticuerpos incluyen el anticuerpo AM64 (Publicación Japonesa Sin Examinar de la Patente N° 3-219894), el anticuerpo 4B11, el anticuerpo 2H4 (Patente de los Estados Unidos de América No.5571513) y el anticuerpo B-P8 (Publicación Japonesa Sin Examinar de la Patente N° 8-291199).

El híbridoma que produce el anticuerpo monoclonal anti-gp130 se puede producir básicamente de la manera como se describe a continuación utilizando la tecnología conocida. Es decir que este híbridoma se puede producir por medio del uso de gp130 como un antígeno de sensibilización, inmunizando con esto de acuerdo con los métodos comunes de inmunización, fusionando los inmunocitos resultantes con las células huésped conocidas de acuerdo con los métodos comunes de fusión celular y seleccionando luego las células que producen el anticuerpo monoclonal de acuerdo con los métodos comunes de selección.

Más específicamente, la producción del anticuerpo monoclonal se debe realizar de la manera como se describe a continuación. Por ejemplo, la gp130 utilizada como antígeno de sensibilización para adquirir el anticuerpo se obtiene mediante la utilización del gen gp130/la secuencia de aminoácidos divulgada en la Publicación Europea Sin Examinar de la Patente N° EP 411946.

Después de insertar la secuencia del gen de gp130 dentro de un sistema de vector de expresión conocido y transformar las células huésped adecuadas, la proteína de gp130 a la cual se apunta es purificada por medio de los métodos conocidos a partir de las células huésped o del sobrenadante del cultivo, seguido de la utilización de esta proteína del receptor de gp130 purificada como un antígeno de sensibilización. Además, una proteína fusionada que consiste en las células que expresan gp130 o la proteína de gp130 y otra proteína también pueden ser utilizadas como antígeno de sensibilización.

A pesar de que no existen limitaciones particulares acerca de los mamíferos inmunizados con el antígeno de sensibilización, el mismo es seleccionado de manera preferente teniendo en cuenta la compatibilidad con las células huésped utilizadas para la fusión celular, los ejemplos típicos de lo cual incluyen a los roedores tales como el ratón, las ratas y los hamsters.

La inmunización del animal con antígeno de sensibilización se lleva a cabo de acuerdo con los métodos conocidos. Como un ejemplo típico de un método de ese tipo, la inmunización se lleva a cabo preferentemente por medio de la inyección del antígeno de sensibilización en la cavidad abdominal o a través de la piel de un mamífero. De manera más específica, se mezcla una suspensión del antígeno de sensibilización diluido en una cantidad adecuada con solución salina amortiguada con fosfato (PSB) o solución fisiológica salina con una cantidad adecuada de un adyuvante común como por ejemplo el adyuvante completo de Freund como se desee seguido por la emulsión y la administración varias veces a un mamífero cada 4 a 21 días. De manera adicional, se puede utilizar un portador adecuado cuando se inmuniza con el antígeno de sensibilización.

Después de confirmar que la inmunización se ha llevado a cabo de esta manera y que el nivel del anticuerpo en sangre se ha elevado hasta el nivel adecuado, se eliminan los inmunocitos del mamífero y se utilizan para la fusión celular. Las células del bazo constituyen un ejemplo particularmente preferido de los inmunocitos utilizados para la fusión celular.

Varias líneas celulares conocidas tales como P3X6Ag8. 653 (Keamey, J. F. et al., J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3X63Ag80.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511,519), MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8, 405-415, SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270), FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol., Methods (1980) 35, 1-21), 5194 (Trowbridge, I. S.,

J. Exp. Med. (1978) 277, 131-133) ya se utilizan de manera adecuada como las células de mieloma de mamíferos que sirven como las otras células huésped fusionadas con los inmunocitos que se mencionaron con anterioridad.

La fusión de los inmunocitos que se mencionaron con anterioridad y las células del mieloma se puede llevar a cabo básicamente de acuerdo con los métodos conocidos tales como el método de Milstein, et al. (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46).

De manera más específica, la fusión celular mencionada con anterioridad se lleva a cabo, por ejemplo, en un líquido de cultivo nutritivo común en presencia de un promotor de la fusión celular. Los ejemplos de promotores de fusión que se utilizan incluyen el polietilenglicol (PEG) y el virus Sendai (HVJ) y un asistente tal como el dimetilsulfóxido también se puede agregar para realzar la eficiencia de la fusión como se desee.

La proporción de inmunocitos y de células de mieloma utilizada es preferentemente de 1 a 10 veces más inmunocitos que células de mieloma. Los ejemplos de líquidos de cultivo que se pueden utilizar para la fusión celular que se mencionó con anterioridad incluyen el líquido de cultivo RPMI1640 preferido para el crecimiento de las células de mieloma mencionadas con anterioridad, el líquido de cultivo MEM y otros líquidos de cultivo comunes utilizados para este tipo de cultivo celular. Además, un suplemento sérico como por ejemplo el suero de feto de ternero (FCS) también puede ser utilizado en combinación con el líquido de cultivo que se mencionó con anterioridad.

La fusión celular lleva a cabo la mezcla completa de cantidades predeterminadas de los inmunocitos y de las células de mieloma que se mencionaron con anterioridad en el líquido de cultivo mencionado con anterioridad, agregando la solución PEG, como por ejemplo la solución PEG que tenga un peso molecular promedio de alrededor de 1000 a 6000 y precalentada

hasta 37°C, normalmente a una concentración de 30 a 60% (w/v), y luego mezclando para formar las células fusionadas a las cuales se apunta (hibridoma). A continuación, los agentes de fusión celular y así sucesivamente, que son perjudiciales para el desarrollo del hibridoma pueden ser eliminados por medio de la repetición del procedimiento que consiste en agregar de manera secuencial el líquido de cultivo adecuado y centrifugando luego para eliminar el sobrenadante.

El hibridoma se selecciona por medio de un cultivo en un líquido común de cultivo selectivo tal como el líquido de cultivo de HAT (líquido de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo en el mencionado líquido de cultivo HAT continúa por una duración que por lo general varía entre varios días y varias semanas, que son suficientes para destruir las células que no son ~~las del hibridoma al cual se apunta~~ (células no fusionadas). En el paso siguiente, el hibridoma que produce el anticuerpo al cual se apunta se realiza la selección y la clonación por medio de métodos de dilución limitantes comunes.

Además de obtener el hibridoma que se mencionó con anterioridad por medio de la inmunización de animales que no son humanos con el antígeno, se puede obtener un anticuerpo humano deseado que tiene una actividad de unión con un antígeno deseado o células que expresan el antígeno por medio de la sensibilización de los linfocitos humanos con una proteína del antígeno deseado o las células que expresan el antígeno in vitro, y luego fusionando los linfocitos B sensibilizados con las células de mieloma tales como U266 (remitirse a la Publicación Japonesa de la Patente Examinada N° 1-59878). Además, también se puede adquirir un anticuerpo humano deseado de acuerdo con el método que se mencionó con anterioridad por medio de la administración de antígeno o de células que expresan el antígeno en el animal transgénico que tenga un repertorio de genes del anticuerpo humano (remitirse a las Publicaciones Internacionales

No examinadas de las Patentes No. WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/25585, WO 96/34096 p WP 96/33735).

El hibridoma que produce el anticuerpo monoclonal producido de esta manera se puede sub-cultivar en el líquido de cultivo común y conservarse en nitrógeno líquido por un largo período de tiempo.

Un método en el cual el hibridoma se cultiva de acuerdo con los métodos comunes y se obtiene en la forma del sobrenadante de cultivo, o un método en el cual el hibridoma se hace crecer por medio de la administración a un animal que es compatible con éste seguido de la obtención de la forma de la ascitis, se puede emplear para adquirir el anticuerpo monoclonal del hibridoma. El método anterior es adecuado para obtener el anticuerpo muy puro, mientras que el último método es adecuado para producir el anticuerpo en grandes volúmenes.

Por ejemplo, la producción del hibridoma que produce el anticuerpo del receptor anti-IL-6 se puede realizar de acuerdo con el método divulgado en la Publicación Japonesa de la Patente No Examinada N° 3-139293. Esto se puede realizar utilizando un método en el cual el hibridoma que produce PM-1 depositado a nivel internacional sobre la base del Tratado de Budapest bajo la designación FERM BP-2988 el 12 de Julio de 1989 en el Organismo Internacional de Depósito de Patentes del Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón) se inyecta en la cavidad abdominal del ratón BALB/c para obtener ascitis seguido de la purificación del anticuerpo de PM-1 de la ascitis, o un método en el cual dicho hibridoma es cultivado en un medio tal como el suero de feto de ternero al 10%, el medio RPMI1640 que contiene BM-Condimed H1 al 5% (Boehringer-Mannheim), el medio SFM para hibridoma (Gibco-BRL) o el medio PFHM-11 (Gibco-BRL), seguido por la purificación del anticuerpo PM-1 del sobrenadante del cultivo.

El anticuerpo recombinante producido utilizando la tecnología de recombinación genética por medio de la clonación del gen del anticuerpo de un hibridoma, incorporando en un vector adecuado y luego insertando en un huésped se puede utilizar como el anticuerpo monoclonal en la presente invención (remitirse, por ejemplo, a Borrebaeck, C.A. K. y Larrick, J. W., *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, publishing in the United Kingdom by MacMillan Publishers Ltd., 1990).

Más específicamente, el ARNm que codifica la región variable (V) del anticuerpo se aísla a partir de las células tales como un hibridoma que produce el anticuerpo al cual se apunta. El aislamiento del ARNm se realiza mediante la preparación total del ARN de acuerdo con un método conocido tal como el ~~centrifugado~~ de guanidina (Chirwin, J. M. et al., *Biochemistry* (1979) 18, 5294-5299) o AGPC (Chomczynski, P. et al., *Anal. Biochem.* (1987) 162, 156-159), y la preparación del ARNm utilizando un Kit de Purificación para ARNm (Pharmacia) y así sucesivamente. Además, el ARNm se puede preparar directamente mediante el uso del Kit de Purificación para ARNm QuickPrep (Pharmacia).

El ADNc de la región V del anticuerpo se sintetiza a partir del ARNm resultante utilizando la transcriptasa inversa. La síntesis del ADNc se puede llevar a cabo utilizando, por ejemplo, el Kit de Síntesis de ADNc de Primera Hebra de Transcriptasa Inversa AMV. Además, el Kit 5'-Ampli Finder Race (Clontech) y el método 5'-RACE que utiliza PCR (Frohman, M. A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 8998-9002) se puede utilizar para sintetizar y amplificar el ADNc. El fragmento del ADN al cual se apunta es purificado a partir del producto PCR resultante y se acopla con el ADN vector. Además, un vector recombinante se produce luego a partir de éste y se inserta en la *E. coli* y así sucesivamente seguido de la selección de una colonia para preparar el vector recombinante

deseado. La secuencia básica del ADN que constituye el blanco se confirma luego por medio de un método tal como el método de deoxi.

Una vez que el ADN codifica la región V del anticuerpo al cual se apunta, el mismo se acopla con el ADN que codifica una región constante del anticuerpo deseado (la región C) seguido de la incorporación en un vector de expresión. De una manera alternativa, el ADN que codifica la región V del anticuerpo puede ser incorporado en un vector de expresión que contiene el ADN de la región C del anticuerpo.

A fin de producir el anticuerpo utilizado en la presente invención, un gen del anticuerpo como se describirá más adelante, se incorpora a un vector de expresión que se expresó bajo el control de, por ejemplo, un realzador o un ~~promotor~~. En el paso siguiente, las células huésped se transforman con este vector de expresión para permitir la expresión del anticuerpo.

En la presente invención, se puede utilizar un anticuerpo recombinante genético que ha sido alterado de manera artificial a los fines de reducir la antigenicidad interespecies en humanos, cuyos ejemplos incluyen el anticuerpo quimérico, el anticuerpo humanizado y el anticuerpo humano. Estos anticuerpos alterados se pueden producir utilizando los métodos conocidos.

Los anticuerpos quiméricos se obtienen por medio del acople del ADN que codifica la región V del anticuerpo que se obtiene de la manera como se describió con anterioridad con el ADN que codifica la región C del anticuerpo seguido de la incorporación del producto acoplado en un vector de expresión y la producción por medio de la inserción en una célula (remitirse a la Publicación Europea de la Patente No Examinada No. EP 125023 o la Publicación Internacional de la Patente No Examinada N° WO 92-19759). El anticuerpo quimérico que es útil en la presente invención se puede obtener mediante el uso de este método conocido.

Por ejemplo, los plasmidos que contienen el ADN que codifica las regiones V de la cadena L y la cadena H del anticuerpo quimérico PM-1 han sido designadas como pPM-k3 y pPM-h1, respectivamente, y *Escherichia coli* que retiene estos plasmidos han sido depositados a nivel internacional sobre la base del Tratado de Budapest bajo la designación NCIMB40366 y NCIMB40362, respectivamente, el 12 de Febrero de 1991 en las National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited (23 St machar Drive, Aberdeen AB2 1RY, Scotland, Commonwealth of Great Britain and Northern Ireland).

Los anticuerpos humanizados, a los cuales se hace referencia como anticuerpos reformados, se obtienen mediante el trasplante de la región de determinación de complementariedad (CDR) de los mamíferos que no son humanos tales como el ratón en la región de determinación de complementariedad del anticuerpo humano, y sus técnicas típicas de recombinación genética son conocidas (remitirse a la Publicación Europea de la Patente No Examinada N° EP 25023 o la Publicación Internacional de la Patente No Examinada N° WO 92-19759).

De manera más específica, una secuencia de ADN designada así para acoplar el CDR del anticuerpo del ratón con la región del marco de trabajo (FR) del anticuerpo humano es sintetizada por PCR a partir de una pluralidad de oligonucleótidos producidos de manera tal de tener porciones que se superpongan en sus extremos. El ADN resultante se acopla luego con el ADN que codifica la región C del anticuerpo humano seguida de la incorporación en un vector de expresión y la inserción en un huésped para producir el ADN en el huésped mencionado (remitirse a la Publicación Europea de la Patente No Examinada N° EU 2399400 o a la Publicación Internacional No Examinada de la Patente N° WO 92-19759).

Un FR para el cual la región de determinación de complementariedad forma un sitio de unión satisfactorio con el antígeno es seleccionado para el FR del anticuerpo humano acoplado por medio de la CDR. Los aminoácidos de la región del marco de trabajo de la región variable del anticuerpo pueden ser sustituidos de manera tal que la región de determinación de complementariedad del anticuerpo humano reconfigurada forme un sitio de unión adecuado con el antígeno (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

La región C del anticuerpo humano se utiliza para el anticuerpo quimérico y el anticuerpo humanizado. Un ejemplo de una región C del anticuerpo humano es Cy, y por ejemplo, se pueden utilizar Cy1, Cy2, Cy3 o Cy4. De manera adicional, se puede modificar la región C del anticuerpo humano para mejorar la estabilidad del anticuerpo o su producción.

Los anticuerpos quiméricos están compuestos por una región variable de un anticuerpo de origen mamífero que no sea el de humanos y una región C que se origina en el anticuerpo humano, mientras que los anticuerpos humanizados se componen de una región de determinación de complementariedad de un anticuerpo de origen mamífero que no sean humanos y una región de marco de trabajo y una región C que se originan en el anticuerpo humano, y dado que su antigenicidad en humanos es reducida, los mismos son útiles como anticuerpos utilizados en la presente invención.

Un ejemplo específico preferido de un anticuerpo humanizado utilizado en la presente invención es el anticuerpo humanizado PM-1 (remitirse a la Publicación Internacional No Examinada de la Patente N° WO 92-19759).

Además del método que se describió con anterioridad, otra tecnología conocida para adquirir el anticuerpo humano consiste en una toma panorámica utilizando una librería de anticuerpos humanos. Por ejemplo, un fago que se une a un antígeno también se puede seleccionar utilizando una región variable del

anticuerpo humano como un anticuerpo de cadena única (scFv) y expresándose sobre la superficie de un fago utilizando el método de despliegue del fago. La secuencia de ADN que codifica la región variable del anticuerpo humano que se une al antígeno se puede determinar luego por medio del análisis de los genes del fago seleccionado. Una vez que la secuencia de ADN de scFv que se une al antígeno ha sido identificada, se puede producir un vector de expresión que es equivalente a dicha secuencia para adquirir el anticuerpo humano. Estos métodos ya son conocidos por lo general y se puede hacer referencia a WO 92/01047, WO 92/20781, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388.

El gen del anticuerpo construido de la manera como se describió con anterioridad, se puede expresar y adquirir por medio de los métodos conocidos. En el caso de las células de los mamíferos, el gen del anticuerpo se puede expresar con el ADN o el vector que contiene dicho ADN en el cual un promotor útil comúnmente utilizado, el gen del anticuerpo que se debe expresar, y la poli señal A en sentido descendente desde el lado 3' se unen de manera funcional. Un ejemplo de un promotor/realizador es el promotor/realizador inmediatamente anterior, citomegalovirus humano.

Adicionalmente, los ejemplos de otros promotores/realizadores que deben ser utilizados para expresar el anticuerpo utilizado en la presente invención incluyen los promotores / realizadores de los virus tales como los del retrovirus, el virus polio, el adenovirus o el virus Smeon 40 (SV40), al igual que los promotores/realizadores que se originan en las células de mamíferos tales como el factor de elongación humano 1 α (HEF1 α).

Por ejemplo, en el caso de utilizar el promotor/realizador SV40, el anticuerpo se puede expresar con facilidad de acuerdo con el método de Mulligan et al. (Mulligan, R. C. et al., Nature (1979) 277, 108-1149 o en el caso del

promotor/realizador HEF1 α , el anticuerpo se puede expresar con facilidad de acuerdo con el método de Mizushima et al. (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322).

En el caso de la *Escherichia coli*, el anticuerpo se puede expresar por medio de la unión funcional de un promotor útil comúnmente utilizado, la secuencia de señal para secretar el anticuerpo y el gen del anticuerpo que debe ser expresado. Los ejemplos de promotores incluyen el promotor lacZ y el promotor araB. En caso de utilizar el promotor lacZ, el anticuerpo se debe expresar de acuerdo con el método de Ward et al. (Ward, E. S. et al., Nature (1989) 341, 544-546; Ward, E. S. et al., FASEB J. (1992) 6, 2422-2427), o en el caso de utilizar el promotor araB, el anticuerpo debe ser expresado de acuerdo con el método de Better et al. (Better, M. et al., Science (1988) 240, 1041-1043).

La secuencia de señal pelB (Lei, S. P. et al., J. Bacteriol. (1987) 169, 4379-4383) se debe utilizar para la secuencia de señal para la secreción de anticuerpo en el caso de producir en el periplasma de la *E. coli*. Después de separar el anticuerpo producido en el periplasma, el anticuerpo se utiliza después de replegar de la manera adecuada la estructura del anticuerpo (remitirse, por ejemplo, a WO 96/30394).

Los ejemplos de las fuentes de replicación que se pueden utilizar incluyen a aquéllos que se originan en el SV40, el virus de polioma, el adenovirus o el virus de papiloma bovino (BPV) y a fin de aumentar el número de copias del gen en el sistema de las células huésped, el vector de expresión puede contener un marcador de selección tal como el gen aminoglicosido fosfotransferasa (APH), el gen timidina quinasa (TK), el gen *E. coli* xantina guanina fosforibosil transferasa (Ecogpt) o el gen dihidrofolato reductasa (dhfr).

Se puede utilizar cualquier sistema de producción arbitrario para producir el anticuerpo utilizado en la presente invención. El sistema de producción para la

producción del anticuerpo puede ser un sistema in vitro o un sistema in vivo. Los ejemplos de los sistemas de producción in vitro incluyen los sistemas de producción que utilizan células eucarióticas y un sistema de producción que utiliza células eucarióticas.

En el caso de utilizar células eucarióticas, el sistema de producción puede utilizar células animales, células de plantas o células de hongos. Los ejemplos conocidos de células animales incluyen: (1) las células de mamíferos tales como CHO, COS, mieloma, BHK (riñón de hamster baby), HeLa y células Vero, (2) células de anfibios tales como las células foliculares de rana tree Africana y (3) las células de insectos tales como sf9, sf21 y Tn5. Los ejemplos conocidos de células de plantas incluyen las células que se originan en *Nicotiana tabacum*, y deben ser cultivadas en callos. Los ejemplos conocidos de células de hongos incluyen las células de fermentos tales como las especies de *Saccharomyces* que incluyen el *Saccharomyces cerevisiae* y los mohos tales como *Aspergillus species* que incluyen el *Aspergillus niger*.

En el caso de utilizar células procarióticas, se utiliza un sistema de producción que utiliza células bacterianas. Los ejemplos conocidos de las células bacterianas incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*.

El anticuerpo se obtiene por medio de la inserción del gen del anticuerpo al cual se apunta dentro de estas células por transformación, y luego cultivando las células transformadas in vitro. El cultivo se realiza de acuerdo con los métodos conocidos. Por ejemplo, DMEM, MEM, RPM11640 o IMDM se pueden utilizar para el líquido de cultivo, y un suplemento de suero tal como el suero fetal de ternero (FCS) también se puede utilizar en combinación. De manera adicional, el anticuerpo también se puede producir in vivo por medio de la transferencia de células dentro de las cuales se insertó el gen del anticuerpo en la cavidad abdominal y así sucesivamente de un animal.

Por otra parte, los ejemplos de los sistemas de producción in vivo incluyen los sistemas de producción que utilizan animales y sistemas de producción que utilizan plantas. En el caso de utilizar un animal, los ejemplos de sistemas de producción incluyen a aquéllos que utilizan mamíferos o insectos.

Los ejemplos de mamíferos que se pueden utilizar incluyen las cabras, los cerdos, las ovejas, los ratones y los conejos (Vicki Glaser, *SPECTRUM Biotechnology Applications*, 1993). Se pueden utilizar gusanos de seda para los insectos. En el caso de utilizar plantas, se pueden utilizar, por ejemplo, las plantas de tabaco.

El gen del anticuerpo se inserta dentro de estos animales o plantas seguido de la producción y la recuperación del anticuerpo dentro de los cuerpos de los animales o de las plantas. Por ejemplo, un gen del anticuerpo se inserta en una ubicación intermedia en un gen que codifica una proteína únicamente producida en leche tal como la caseína β de cabra para preparar en la forma de una proteína fusionada. Un fragmento de ADN que contiene la proteína fusionada dentro de la cual se insertó el gen del anticuerpo se inyecta luego dentro del embrión de la cabra y este embrión es luego introducido dentro de la cabra hembra. El anticuerpo deseado se obtiene luego a partir de la leche producida por una cabra transgénica o su progenie que nació de la cabra que recibió el embrión. Una hormona adecuada se puede utilizar en la cabra transgénica para aumentar la cantidad de leche que contiene el anticuerpo deseado producido a partir de la cabra transgénica (Ebert, K. M. et al., *Bio/Technology* (1994) 12, 699-702).

Además, en el caso de utilizar gusanos de seda, un gusano de seda se infecta con baculovirus en el cual el gen del anticuerpo al cual se apunta se insertó seguido de la obtención del anticuerpo deseado a partir del líquido del cuerpo del gusano de seda (Maeda, S. et al., *Nature* (1985) 315, 592-594). Además, en caso de utilizar una planta de tabaco, el gen del anticuerpo al cual se

apunta se inserta dentro del vector de expresión de una planta tal como pMON 530, después de lo cual este vector se inserta dentro de la bacteria tal como *Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria luego es utilizada para infectar una planta de tabaco tal como *Nicotiana tabacum* para obtener el anticuerpo deseado a partir de las hojas de tabaco (Jilian, K. - C. ma, et al., Eur., J. Immunol. (1994) 24, 131-138).

Tal como se describió con anterioridad, en el caso de producir el anticuerpo con un sistema de producción in vitro o in vivo, un huésped puede ser transfectado en forma simultánea incorporando por separado el ADN que codifica la cadena pesada del anticuerpo (cadena H) o la cadena liviana (cadena L) en los vectores de expresión separados, o transformando un huésped por medio de la incorporación del ADN que codifica la cadena H y la cadena L en un vector de expresión único (remitirse a la Publicación Internacional No Examinada de la Patente N° WO 94-11253).

El anticuerpo utilizado en la presente invención puede ser un fragmento del anticuerpo o un producto modificado del mismo con tal de que sea utilizado en forma preferida en la presente invención.

Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, F(ab')₂, Fv o la cadena H y la cadena única Fv (scFv) en la cual Fv o Fv o la cadena H y la cadena L son acoplados con un enlace adecuado.

Más específicamente, después de formar un fragmento de anticuerpo por medio del tratamiento del anticuerpo con una enzima tal como la papaína o la pepsina, o de construir un gen que codifica estos fragmentos de anticuerpo y lo inserta en un vector de expresión, se expresa en las células huésped adecuadas (remitirse a, por ejemplo, Co, M. S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. & Horwitz, A. H., Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496; lamoyi,

E., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 663-666, Bird, R.E. et al., *TIBTECH* (1991) 9, 132-137).

El scFv que se mencionó con anterioridad se obtiene por medio del acople de la región V de cadena H del anticuerpo con la región V de cadena L. En este scFv, la región V de cadena H y la región V de la cadena L se acoplan con un enlace y preferentemente un enlace de péptido (Huston, J. S. et al., *proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1988) 85, 5879-5883). La región V de la cadena H y la región V de la cadena L en scFv pueden tener por origen cualquiera de los orígenes descritos para los anticuerpos que se mencionaron con anterioridad. Un ejemplo de un enlace de péptido utilizado para acoplar las regiones V es un péptido arbitrario de cadena única compuesto por 12-19 residuos de aminoácidos.

El ADN que codifica scFv se obtiene mediante el uso del ADN que codifica a la cadena H o a la región V de la cadena H como patrones, amplificando una porción de ADN que codifica una secuencia deseada de aminoácidos entre estas secuencias por PCR que utiliza un primer par que define a ambos extremos y luego amplificando por combinación con un primer par que define al ADN que codifica a la porción de enlace del péptido al igual que los dos extremos de manera que se una cada cadena H y cada cadena L.

Además, una vez que se produce el ADN que codifica scFv, los vectores de expresión que los contienen al igual que los huéspedes que han sido transformados por dichos vectores de expresión se pueden obtener de acuerdo con los métodos comunes. Además, scFv se puede obtener de acuerdo con los métodos comunes utilizando los huéspedes mencionados.

Estos fragmentos de anticuerpo se pueden producir desde un huésped por medio de la adquisición y de la expresión de sus genes de la misma manera que se describió con anterioridad. El "anticuerpo" al cual se hace referencia en la presente invención incluye estos productos modificados del anticuerpo. Estos

productos modificados del anticuerpo se pueden obtener mediante la realización de modificaciones químicas sobre un anticuerpo resultante. Estos métodos ya se han establecido en este campo.

Tal como se describió con anterioridad, el anticuerpo expresado puede ser separado de las células internas o externas o desde un huésped y puede ser purificado para obtener mayor uniformidad. La separación y la purificación del anticuerpo utilizado en la presente invención se puede llevar a cabo por medio de la cromatografía de afinidad. Los ejemplos de las columnas utilizadas para la cromatografía de afinidad incluyen una columna de proteína A, una columna de proteína G. Los ejemplos de los portadores utilizados para una columna de proteína A incluyen Hyper D, POROS y Sepharose F.F. Otros métodos de ~~separación~~ y de purificación utilizados con las proteínas comunes también se pueden utilizar y no existen limitaciones para los mismos.

Los anticuerpos utilizados en la presente invención se pueden separar y purificar por medio de la selección adecuada y de la combinación, por ejemplo, de una cromatografía que no sea la cromatografía por afinidad que se mencionó con anterioridad, el filtrado, el ultrafiltrado, el "salting out" o salazón o la diálisis. Los ejemplos de otros tipos de cromatografía incluyen la cromatografía por intercambio de iones y el filtrado pro gel. Estos tipos de cromatografía se pueden aplicar a la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC). Además, también se puede utilizar la HPLC de fase inversa.

La concentración del anticuerpo obtenido tal como se describió con anterioridad se puede determinar a través de la medición de la absorbencia óptica, ELISA y así sucesivamente. Es decir que en el caso de medir la absorbencia óptica, después de diluir de manera adecuada con PBS (-), la absorbencia óptica a 280 nm se mide seguido del cálculo de la concentración basada sobre 1,35 OD que representa 1 mg/ml. Además, la medición de la

concentración por medio de ELISA se puede realizar de la manera como se describió con anterioridad. Es decir que 100 μ l de IgG antihumano de cabra (TAG) diluídos a 1 μ g/ml con 0,1 M solución buffer de bicarbonato (pH 9.6) se agregan a una placa con 96 cavidades (Nunc) seguidos por incubación durante toda la noche a 4°C para inmovilizar el anticuerpo sobre la placa. Después del bloqueo, se agregan 100 μ l del anticuerpo utilizado en la presente invención diluido de la manera adecuada, la muestra que contiene el anticuerpo o el IgG humano standard (Cappel) seguido de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente.

Después de lavar la placa, se agregan 100 μ l de igG antihumano rotulado con fosfatasa alcalina (BIOSOURCE) diluídos en 500X seguido de la incubación durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar la placa, la solución del substrato se agrega seguido de la incubación y luego se mide la absorbencia óptica a 405 nm utilizando un Microplate Reader Model 3550 (BioRad) para calcular la concentración del anticuerpo al cual se apunta.

La variante IL-6 utilizada en la presente invención es una sustancia que tiene actividad de unión con el receptor de IL-6 pero no transmite la actividad biológica de IL-6. O sea que, a pesar de que la variante de IL-6 cumple con IL-6 para la unión con el receptor de IL-6, dado que no transmite la actividad biológica de IL-6, la transmisión de la señal por IL-6 se interrumpe.

La variante de IL-6 se produce mediante la introducción de una mutación por la sustitución de un residuo de aminoácido en la secuencia de aminoácidos de la IL-6. A pesar de que no existen limitaciones sobre el origen de IL-6 que sirve de base de la variante de IL-6, se prefiere la IL-6 humana teniendo en cuenta la antigenicidad y así sucesivamente.

Más específicamente, esto se realiza mediante la predicción de la estructura secundaria de la secuencia de aminoácidos de IL-6 utilizando un

programa de modelado molecular conocido tal como WHATIF (Vriend, et al., J. Mol. Graphics (1990) 8, 52-56), y luego evaluando los efectos sobre todos los residuos de aminoácidos que se deben sustituir. Después de determinar un residuo adecuado de aminoácido sustituido, utilizando entonces un vector que contenga una secuencia de base que codifique al gen humano IL-6 como un patrón e introduciendo una mutación tal que el aminoácido se sustituya por PCR realizado de la manera normal, se obtiene un gen que codifica la variante de IL-6. Esto se puede incorporar en un vector de expresión adecuado según sea necesario para obtener la variante de IL-6 en cumplimiento con la expresión del anticuerpo recombinante mencionado con anterioridad, los métodos de producción y de purificación.

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

El péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 utilizado en la presente invención es una sustancia que tiene actividad de unión con el receptor de IL-6 o IL-6, respectivamente, y no transmite la actividad biológica de IL-6. O sea que el péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 inhiben de manera específica la unión de IL-6 con el receptor de IL-6 al capturar al receptor de IL-6 o a IL-6 mediante la unión. Como resultado de ello, la transmisión de la señal por medio de IL-6 se interrumpe dado que la actividad biológica de IL-6 no se transmite.

El péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 es un péptido que está compuesto por una secuencia de aminoácidos de una porción o la totalidad de la región involucrada en la unión entre IL-6 y el receptor de IL-6 en la secuencia de aminoácidos de IL-6 o del receptor de IL-6. Un péptido de ese tipo

está normalmente compuesto por 10 a 80, preferentemente de 20 a 50 y más preferentemente de 20 a 40 residuos de aminoácidos.

El péptido parcial de IL-6 del péptido parcial del receptor de IL-6 se puede producir por medio de un método en el cual la región involucrada en la unión entre IL-6 y el receptor de IL-6 se identifica en la secuencia de aminoácidos de la IL-6 o del receptor de IL-6, y una porción o la totalidad de la secuencia de aminoácidos se conoce normalmente, los ejemplos de lo cual incluyen las técnicas de ingeniería genética y los métodos de la síntesis del péptido.

El péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 se pueden producir utilizando las técnicas de ingeniería genética por medio de la incorporación del ADN que codifica a un péptido deseado en un vector de expresión y obteniendo el péptido deseado en cumplimiento con la expresión del anticuerpo recombinante anteriormente mencionado, los métodos de producción y de purificación.

El péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 se pueden producir utilizando los métodos de síntesis del péptido mediante el uso de un método normalmente utilizado en la síntesis peptídica, tal como un método de síntesis de fase sólida o un método de síntesis de fase líquida.

Más específicamente, esto se podría llevar a cabo de acuerdo con el método que se describe en Zohuiyahuhin-no-Kaihatsu, Vol. 14, Peptide Synthesis, N. Yajima, ed., Hirokwa Shoten Publishing (1991). En el caso de la síntesis de la fase sólida, se utiliza un método en el cual, por ejemplo, una cadena peptídica se elonga por medio de la repetición alternativa de una reacción en la cual un aminoácido que corresponde a la terminal C del péptido que se va a sintetizar se une a un soporte que es insoluble en solvente orgánico, y los aminoácidos en los cuales los grupos α -amino y los grupos funcionales de cadena lateral son protegidos con los grupos de protección adecuados son unidos de manera

secuencial en orden desde la terminal C hasta la terminal N, y una reacción en la cual dichos grupos de protección de los grupos α -amino de los aminoácidos o de la unión peptídica con la resina son eliminados. Los métodos de síntesis peptídica de fase sólida son ampliamente divididos en el método Boc y el método Fmoc en función del tipo de grupos de protección utilizados.

Después de sintetizar el péptido que constituye el objetivo de esta manera, se llevan a cabo una reacción de desprotección y una reacción para dividir la cadena peptídica desde el soporte. En la reacción para dividir la cadena peptídica, normalmente se utilizan fluoruro de hidrógeno o ácido sulfónico trifluorometano en el método Boc, mientras que por lo general se utiliza TEA en el método Fmoc. En el método Boc, por ejemplo, la resina del péptido protegido que se mencionó con anterioridad se trata en fluoruro de hidrógeno en presencia de anisól. En el paso siguiente, los grupos de protección se eliminan y el péptido es dividido a partir del soporte seguido de la recuperación del péptido. Luego se obtiene un péptido crudo por congelamiento-secado del producto. Por otra parte, en el método Fmoc, por ejemplo, una reacción de desprotección y una reacción para dividir la cadena peptídica a partir del soporte se puede llevar a cabo utilizando el mismo procedimiento tal como se describió con anterioridad en TFA.

El péptido crudo resultante se puede separar y purificar si se recurre a la HPLC. La elución se debe realizar bajo las condiciones óptimas utilizando un solvente con base de acetonitrilo-agua normalmente utilizado para la purificación de proteínas. La fracción que corresponde al pico del perfil de cromatografía resultante es luego separada y sometida a congelamiento-secado. La fracción del péptido purificada de esta manera luego se identifica por medio del análisis del peso molecular utilizando la espectrometría de masa, el análisis de composición de aminoácido o el análisis de la secuencia de aminoácidos.

Los ejemplos específicos de los péptidos parciales de IL-6 y de los péptidos parciales del receptor de IL-6 se divulgan en la Publicación Japonesa No Examinada de la Patente Nº 2-188600, en la Publicación Japonesa No Examinada de la Patente Nº 7-324097, en la Publicación Japonesa No Examinada de la Patente Nº 8-311098 y en la Patente de los Estados Unidos de América Nº 5210075.

La actividad inhibitoria de la transmisión de la señal de IL-6 del antagonista de IL-6 utilizado en la presente invención se puede evaluar por medio de los métodos normalmente utilizados. De manera más específica, la línea del mieloma humano que depende de IL-6 (S6B45, KPMM2), la línea celular del linfoma T humano de Lennert KT3 o la línea celular MH60 que depende de la IL-6 o BSF2 ~~se~~ se cultivan y a continuación se agrega IL-6 mientras simultáneamente en presencia del antagonista de IL-6 y la medición de la recaptación de ³H-timidina por parte de las células que dependen de la IL-6.

Además, el enlace de IL-6 rotulada con ¹²⁵I con el receptor de IL-6 que expresa las células se mide mediante el cultivo del receptor de IL-6 que expresa las células en la forma de células U266 y a continuación se agrega el antagonista de IL-6. En el sistema de ensayo que se mencionó con anterioridad, se proporciona un grupo negativo de control que no contiene el antagonista de IL-6 además del grupo en el cual el antagonista de IL-6 está presente y la comparación de los resultados obtenidos de los dos grupos hace posible evaluar la actividad inhibitoria de IL-6 del antagonista de IL-6.

Tal como se indicará en los ejemplos que se describirán más adelante, dado que se han observado efectos inhibitorios del crecimiento sobre las células del mesotelioma para el anticuerpo del receptor anti-IL-6, se sugirió que el anticuerpo del receptor anti-IL-6 y otros antagonistas de IL-6 son útiles como agentes terapéuticos para el mesotelioma.

El objeto al que apunta el tratamiento en la presente invención es un mamífero. El mamífero objeto del tratamiento es con preferencia un humano.

El agente terapéutico para el mesotelioma o el inhibidor del crecimiento celular del mesotelioma de la presente invención se puede administrar a nivel sistémico o a nivel local ya sea por vía oral o bien por vía parenteral. Por ejemplo, se pueden seleccionar la infusión endovenosa u otra forma de inyección endovenosa, la inyección intramuscular, la inyección intratorácica, la inyección intraperitoneal, la inyección subcutánea, los supositorios, la enema o las píldoras orales con capa entérica y así sucesivamente y el método de administración se puede seleccionar de un modo adecuado de acuerdo con la edad y la sintomatología del paciente. La dosis efectiva se selecciona dentro del rango de ~~0.01~~ 0.01 mg a 100 mg por kilogramo de peso corporal por administración. De manera alternativa, se puede seleccionar por paciente una dosis de 1 a 1000 mg y preferentemente de 5 a 50 mg.

La dosis y el método de administración preferidos en el caso del anticuerpo del receptor anti-IL-6, por ejemplo, es tal que la cantidad de anticuerpo libre presente en la sangre es la dosis efectiva, un ejemplo específico del cual es un método por medio del cual se administra utilizando un método tal como el goteo endovenoso u otra forma de inyección endovenosa o de inyección subcutánea y así sucesivamente de acuerdo con un esquema de administración tal como dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas o una vez cada cuatro semanas en una administración única o dividida entre varias administraciones a una dosis de 0.5 mg a 40 mg, y con preferencia de 1 mg a 20 mg, por mes (4 semanas) por 1 kilogramo de peso corporal. El esquema de administración se puede ajustar de manera tal de prolongar el intervalo de administración de dos veces por semana o una vez por semana a una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas o una vez cada cuatro semanas

mientras se observan la condición del paciente y las tendencias registradas en los valores de las pruebas realizadas en sangre.

El agente terapéutico del mesotelioma o el inhibidor del crecimiento celular del mesotelioma de la presente invención pueden contener un portador o un aditivo aceptables desde el punto de vista farmacéutico en función de la vía de administración. Los ejemplos de tales portadores y aditivos incluyen el agua, los solventes orgánicos aceptables desde el punto de vista farmacéutico, el colágeno, el alcohol de polivinilo, la pirrolidona de polivinilo, el polímero de carboxivinilo, la carboximetil celulosa sódica, el poliacrilato sódico, el arginato sódico, el dextran soluble en agua, el almidón de carboximetil sódico, la pectina, la metil celulosa, la etil celulosa, la goma xanthan, la goma arábica, la caseína, la gelatina, el agar, la diglicerina, el propilenglicol, el polietilenglicol, la Vaselina, la parafina, el alcohol estearilo, el ácido esteárico, la albúmina sérica humana (HSA), el manitol, el sorbitol, la lactosa y los surfactantes aceptables para ser utilizados como aditivos farmacéuticos. A pesar de que los aditivos utilizados son seleccionados de manera adecuada o combinados a partir de los aditivos que se mencionaron con anterioridad de acuerdo con la forma de la droga, los mismos no se limitan a los que se indicaron con anterioridad.

EJEMPLOS

A pesar de que a continuación se suministra una explicación detallada de la presente invención a través de sus ejemplos y de los ejemplos de referencia, la presente invención no se limita a los mismos.

Ejemplo 1 – Producción de IL-6 por las Líneas Celulares del Mesotelioma Maligno

El cultivo de las líneas celulares del mesotelioma maligno MSTO, H2052, H28, H226 y H2452 se inició a una concentración celular de 5×10^4 /perforación en una placa con 24 perforaciones que contiene líquido de cultivo (RPMI que

contiene 10% de suero de feto de ternero (FCS), el líquido del cultivo celular se reemplazó al día siguiente, después de lo cual las células se cultivaron durante 3 días más y a continuación se midieron las concentraciones de IL-6 en el sobrenadante de cultivo utilizando un sistema de Inmunoensayo de enzima quimioluminiscente completamente automatizado (Fujirebio, Lumipulse) y corrigiendo la cantidad de la proteína celular. Dichos resultados se muestran en la Fig. 1. El experimento se repitió tres veces. A pesar de que la línea celular H28 no produjo IL-6, las otras cuatro líneas produjeron IL-6. Las líneas celulares H2052 y H226 produjeron niveles de IL-6 particularmente altos.

Ejemplo 2 – Expresión de IL-6R en las Líneas Celulares del Mesotelioma Maligno

Se midieron los niveles de expresión del receptor de IL-6 para cinco líneas celulares del mesotelioma maligno en el nivel del ARNm. Las células KT-3 se utilizaron para el control positivo y los sinoviocitos se utilizaron para el control negativo. Estas células se cultivaron durante 48 horas en RPMI que contiene 10% FCS, y ARNm que codifica al receptor de IL-6 (IL-6R) en las células se midió por medio de PCR transcrito reverso (RT-PCR) utilizando el GeneAmp FCR System (Applied Biosystems) para el dispositivo de detección. Dichos resultados se muestran en la Fig. 1. La Fig. 2 (al fondo) indica la cantidad de ARNm de GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa) utilizada para el control interno.

De acuerdo con estos resultados, se cree que las células del mesotelioma maligno expresan apenas cualquier receptor de IL-6. Dado que el líquido pleural en los casos del mesotelioma maligno de pleura consiste de el líquido de sanguíneo de la pleura, se presume que el receptor soluble de IL-6 está presente en grandes cantidades, y se cree que está involucrado en la transmisión de la irritación de IL-6.

Ejemplo 3 – Inducción de la Producción de VEGF por medio de la Estimulación de IL-6 (1)

Las células tumorales de las líneas celulares del mesotelioma maligno H2052 y H2452 fueron cultivadas en tres series en placas con 24 cavidades a una concentración celular inicial de 5×10^4 /cavidad en el medio RPMI1640. Al día siguiente, el líquido del cultivo celular fue reemplazado y a continuación se comenzó la estimulación por medio de (1) IL-6 recombinante (10 ng/ml), (2) IL-6 recombinante (10 ng/ml) + IL-6R soluble recombinante (100 ng/ml), y (3) inhibición por parte del anticuerpo del receptor anti-IL-6, el anticuerpo PM-1 humanizado (remitirse a WO 92/19759) (25 µg/ml) (RPMI se utilizó para el control del medio). Después de cultivar durante 3 días más, las concentraciones del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en los sobrenadantes del cultivo se midieron utilizando el Quantikine Human VEGF Immunoassay Kit (Sistemas R y D) y se corrigieron por la cantidad de proteína celular.

Tales resultados se muestran en la Fig. 3. Como resulta claro a partir de estos gráficos, la producción del VEGF se indujo por medio de la estimulación de IL-6 tanto en la línea celular H2052 como en la línea celular H2452.

Ejemplo 4 – Inducción de la Producción de VEGF por medio de la Estimulación de IL-6 (2)

El experimento del Ejemplo 3 se repitió utilizando la línea celular H28 del mesotelioma maligno. Dichos resultados se muestran en la Fig. 4. Como resulta claro a partir de estos resultados, a pesar de que la línea celular H28 produce altos niveles de VEGH, ésta no respondió a la estimulación por parte de IL-6.

Ejemplo 5 – Fosforilación de STAT3 por medio de la Estimulación de IL-6

La línea celular H2025, en cuya producción de VEGF está inducida por IL-6 y la línea celular H28, en cuya producción de VEGF no está inducida

por IL-6, fueron incubadas en presencia del IL-6 recombinante (10 ng/ml) y del receptor de IL-6 recombinante soluble (100 ng/ml) junto con el transductor de la señal y el activador de transcripción 3 (STAT3) seguido por el análisis de la fosforilación desde STAT3 hasta p-STAT3 en la hora 0, la hora 0.5 y la hora 1 de incubación por manchado Western. Los mencionados resultados se muestran en la Fig. 5.

Tal como resulta claro a partir de la Fig. 5, se observó una fosforilación significativa de STAT3 para la línea celular H2052 30 minutos después de la estimulación de IL-6. En contraste con esto, se observó solamente una leve fosforilación de STAT3 en respuesta a la estimulación de IL-6 para la línea celular H28. Además, p-STAT3 en la Fig. 5 indica STAT3 fosforilado, mientras que STAT3 indica la suma de STAT3 fosforilado más no fosforilado.

Ejemplo 6 – Inducción de SOCS3 por medio de la Estimulación de IL-6

La línea celular H2025, en la cual la producción de VEGF es inducida por IL-6, y la línea celular H28, en la cual la producción de VEGF no es inducida por IL-6, fueron estimuladas por medio de incubación en presencia de IL-6 recombinante (10 ng/ml) y del receptor IL-6 soluble recombinante (100 ng/ml) y a continuación se midieron los niveles de expresión del supresor inducido de la citoquina de señalización 3 (SOCS3) y de la gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH) a través de la medición de los niveles del ARNm que los codifica después de la amplificación de RT-PCR en la hora 0, en la hora 2 y en la hora 4 de la incubación. Dichos resultados se muestran en la Fig. 6.

Según lo que surge con claridad de la Fig. 6, se observó la inducción de SOCS3 ARNm 2 horas después de la estimulación de IL-6 en la línea

celular H2052. Se observó continuamente una alta expresión de SOCS3 en la línea celular H28.

Ejemplo 7 – Ensayo del Promotor VEGF

Se produjeron un plásmido pGL3-VEGF, que controla la expresión del gen luciferasa por medio del promotor VEGF, y un plásmido pGL3-VEGFmut, que controla la expresión del gen luciferasa por medio de un promotor mutado de VEGF (Fig. 7).

50.000 células H2052 fueron transfectadas con 1 µg de pGL3-VEGF o pGL3-VEGFmut, y las células transfectadas fueron estimuladas con IL-6 recombinante con 1 µg de pGL3-VEGF o pGL3-VEGFmut, y las células transfectadas fueron estimuladas con IL-6 recombinante (10 ng/ml) y receptor de IL-6 soluble recombinante (100 ng/ml). Después de estimularla durante 2 días, se examinó la actividad de luciferasa inducida a partir del promotor VEGF y del promotor VEGF mutado. Los resultados mencionados se muestran en la Fig. 8.

Según lo que surge con claridad de la Fig. 8, en caso de haber eliminado el sitio de unión de STAT3 fosforilado a partir del promotor VEGF, la activación del promotor VEGF debida a la estimulación de IL-6 no se siguió observando. Sobre la base de los resultados de los Ejemplos 5, 6 y 7 que se mencionaron con anterioridad, se creyó que la mayor producción de VEGF debida a la estimulación de la línea celular H2052 estaba mediada por un sistema JAK-STAT. El sistema previsto se muestra en la Fig. 9.

Ejemplo 8 – Promoción del Crecimiento de H2052 y de H226 por medio del Agregado de IL-6 y del Receptor de IL-6 Soluble

Las células de la línea celular H2052 fueron diseminadas en una placa con 96 cavidades que contenía el medio RPMI que contenía FCS al 10% en 500 células/cavidad, a continuación se cultivó en cinco series durante 6 a 7

días en presencia o ausencia del receptor de IL-6 soluble recombinante a 100 ng/ml y en presencia de varias concentraciones (0,1, 10 ó 100 ng/ml) de IL-6. Dichos resultados se muestran en la Fig. 10 y en la Fig. 13. Según surge con claridad de estos gráficos, la línea celular H2052 y la línea celular H226 crecen en presencia del receptor de IL-6 soluble recombinante dependiendo de la concentración de IL-6 (100 ng/ml).

Ejemplo 9 – Inhibición de la Promoción del Crecimiento de las Células H2052 debido al Agregado de IL-6 y de IL-6R por el Anticuerpo para IL-6R (Anticuerpo Anti-IL-6R)

Con el propósito de determinar si la promoción del crecimiento de las células H2052 por parte de IL-6 y del receptor de IL-6 es inhibida o no por el anticuerpo anti-IL-6R, las células H2052 fueron diseminadas en una placa con 96 cavidades que contenía el medio RPMI que contenía FCS al 10% en 500 células/cavidad y a continuación se cultivaron en tres series durante 7 días en presencia de IL-6 soluble recombinante a 10 ng/ml y el receptor de IL-6 soluble recombinante a 100 ng/ml y en presencia de varias concentraciones (0.1 ó 25 µg/ml) del anticuerpo humanizado PM-1. A continuación del cultivo, la cantidad de crecimiento de las células H2052 (OD 450) se determinó por medio del ensayo MTS. Dichos resultados se muestran en la Fig. 11. Como resultado de ello, se determinó que el anticuerpo anti-IL-6 inhibe el crecimiento en función de la concentración. Por otra parte, no se observaron efectos inhibitorios en el caso de agregar IgG1 humano en vez de MRA en la misma concentración que un control.

Ejemplo 10 – Promoción del Crecimiento de las Células H226 por medio del Agregado de IL-6 y del Receptor de IL-6 Soluble y de la Inhibición por parte del Anticuerpo anti-IL-6R

Las células de la línea celular H226 fueron diseminadas en una placa con 96 cavidades que contenía el medio RPMI que contenía FCS al 10% a una concentración de 500 células/cavidad y a continuación de esto se procedió al cultivo en tres series durante 7 días en presencia del receptor de IL-6 soluble recombinante a 100 ng/ml y en presencia de varias concentraciones (0, 1, 10 ó 100 ng/ml) de IL-6. Los mencionados resultados se muestran en la Fig. 12. Según surge con claridad del gráfico, las células H226 que producen altos niveles de IL-6 crecieron en función de la concentración de IL-6 en presencia del receptor de IL-6 soluble recombinante (100 ng/ml) mientras que su crecimiento fue inhibido por medio del anticuerpo anti-IL-6R de la misma manera que las células H2052 producen altos niveles de IL-6.

Ejemplo 11 – Inhibición de la Promoción del Crecimiento de la Línea Celular H2052 y de la Línea Celular H226 Inducida por medio del Agregado de IL-6 y del Receptor de IL-6 Soluble por medio del Anticuerpo del Receptor Anti-IL-6

Las células de la línea celular H2052 y de la línea celular H225 fueron diseminadas en una placa con 96 cavidades y 200 células/cavidad en el medio RPMI que contenía CFS al 10% y a continuación se cultivó en cinco series durante 6 días en presencia de IL-6 (10 ng/ml) y receptor de IL-6 soluble (100 ng/ml) y en presencia de varias concentraciones (0, 1 µg/ml, 5 µg/ml) del anticuerpo humanizado PM-1. A continuación del cultivo, se midieron los índices de crecimiento celular de las línea celular H2052 y de la línea celular H226 por medio del ensayo MTS. Los índices de crecimiento celular indicaron cuántas veces aumentó el crecimiento celular en comparación con la ausencia del agregado de IL-6/sIL-6R. Dichos resultados se muestran en la Fig. 14. Como resultado de ello, se determinó que el anticuerpo del receptor anti-IL-6 inhibió completamente el crecimiento promoviendo la acción inducida por el agregado de IL-6/sIL-6R en la línea celular R2052 y la línea R226. Por otra

parte, no se observaron efectos inhibitorios del crecimiento en el caso de agregar las mismas concentraciones de IgG1 humano (Sigma) como un control en lugar del anticuerpo del receptor anti-IL-6.

Ejemplo 12 – Inhibición de la inducción de la Producción de VEGF Inducida por la Estimulación de IL-6 por el Anticuerpo del Receptor Anti-IL-6

Se realizó un estudio sobre la inhibición de la inducción de la producción de VEGF inducida por la estimulación de IL-6 en las líneas celulares del mesotelioma maligno MSTO, H226, H2052 y H2452 por medio del anticuerpo del receptor anti-IL-6 bajo las mismas condiciones que en el Ejemplo 3 con excepción de las concentraciones del anticuerpo humanizado PM-1 (0, 1 µg/ml, 5 µg/ml). Dichos resultados se muestran en la Fig. 15. Como resultado de ello, se determinó que el anticuerpo del receptor anti-IL-6 inhibió completamente la inducción de la producción de VEGF inducida por la estimulación de IL-6/sIL-6R. Por otra parte, no se observó la acción inhibitoria sobre la inducción de la producción de VEGF en el caso de agregar las mismas concentraciones de IgG1 humano (Sigma) como un control en lugar del anticuerpo del receptor anti-IL-6.

Ejemplo 13 – Inhibición de la Fosforilación de STAT3 por parte del Anticuerpo del Receptor Anti-IL-6

Se realizó un estudio para determinar si la fosforilación de STAT3 inducida por la estimulación de IL-6 (10 ng/ml) y el receptor de IL-6 soluble (100 ng/ml) es inhibida por 5 µg/ml del anticuerpo del receptor anti-IL-6 en la línea celular H2052 y la línea celular H2452 que produce VEGF. Dichos resultados se muestran en la Fig. 16. Como resultado de ello, se determinó que el anticuerpo del receptor anti-IL-6 inhibió de manera significativa STAT3 fosforilado (p-STAT3) inducido por la estimulación de IL-6/sIL-6R en las células del mesotelioma maligno. Por otra parte, no se observó la inhibición

significativa de la fosforilación de STAT3 en el caso de agregar la misma concentración de IgG1 humano (Sigma) como un control en lugar del anticuerpo del receptor anti-IL-6.

Ejemplo 14 – Efecto del Anticuerpo Anti-VEGF sobre el Crecimiento de las Células del Mesotelioma Maligno

Las células de la línea celular H2052 y de la línea celular H226 fueron diseminadas en una placa con 96 cavidades y 200 células/cavidad en el medio RPMI que contenía CFS al 10% y a continuación se cultivó en cinco series durante 6-7 días en presencia de IL-6 (10 ng/ml) y receptor de IL-6 soluble recombinante (100 ng/ml) y en presencia de 1 µg/ml del anticuerpo anti-VEGF. A continuación del cultivo, se examinaron las cantidades de crecimiento por medio del ensayo MTS. La misma concentración de IgH1 humano (Sigma) se utilizó para el control en lugar del anticuerpo anti-VEGF. Dichos resultados se muestran en la Fig. 17. Como resultado de ello, el anticuerpo anti-VEGF no inhibió el crecimiento celular inducido por la estimulación de IL-6/sIL-6R. Sobre la base de este resultado, se determinó claramente que la acción del crecimiento sobre las células del mesotelioma maligno inducida por la estimulación de IL-6/sIL-6R no estaba mediada por VEGF.

Ejemplo de Referencia 1 – Preparación del Receptor de IL-6 Soluble Humano

El receptor soluble de IL-6 fue producido por PCR utilizando un plasmido pBSF2R.236 que contiene el ADN que codifica al receptor de IL-6 obtenido de acuerdo con el método de Yamasaki, et al. (Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828). Luego, el plasmido pBSF2R.236 fue digerido con restrictasa SphI para obtener el ADNc del receptor de IL-6 que luego se insertó en mp18 (Amersham). Se introdujo una mutación en el ADNc del receptor de IL-6 por PCR con el Sistema de Mutagénesis In Vitro (Amersham) utilizando un oligoprimero sintético diseñado de modo tal de insertar un codón

de detención en el ADNc del receptor de IL-6. Como resultado de este procedimiento, se insertó un codón de detención en la ubicación del aminoácido 345 y se obtuvo el ADNc que codifica al receptor de IL-6 soluble.

Con el propósito de expresar el ADNc que codifica al receptor de IL-6 soluble en las células CHO, se acopló con el plasmido pSV (Pharmacia) para obtener el plasmido psVL344. El ADNc del receptor del IL-6 soluble dividido con HindIII-Sall luego se insertó en el plasmido pECEdhfr que contiene el ADNc dhfr para obtener el plasmido pECEdhfr344 de expresión celular CHO.

Luego, se utilizaron 10 µg del plasmido pECEdhfr344 para transfectar la línea celular DXB-11 de dhfr-CHO (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) de acuerdo con el método de precipitación de fosfato de calcio (Chen, C. et al., Mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745-2751). Las células CHO transfectadas luego fueron cultivadas durante 3 semanas en líquido de cultivo selectivo α MEM libre de nucleosido que contenía 1 mM de glutamina, FCS dializado al 10%, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycinina.

Las células CHO seleccionadas luego fueron evaluadas por medio de un método de dilución limitante para obtener un clon único de la célula CHO. Este clon de la célula CHO fue amplificado con metotrexato a una concentración de 20 nM a 200 nM hasta obtener la línea 5E27 de la célula CHO que produce el receptor de IL-6 soluble humano. La línea 5E27 de la célula CHO fue cultivada en el Medio de Dulbecco Modificado por Iscova (IMDM, Gibco) que contenía FBS al 5%. Después de recuperar el sobrenadante del cultivo, la concentración del receptor de IL-6 soluble en el sobrenadante del cultivo fue medida por medio de ELISA. Como resultado de ello, se confirmó que el receptor de IL-6 soluble estaba presente en el sobrenadante del cultivo.

Ejemplo de Referencia 2 – Preparación del Anticuerpo Anti-Humano IL-6

Se inmunizó a un ratón BALB/c con 10 µg de IL-6 recombinante (Hirano, T. et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41) junto con el adyuvante completo de Freund, y esto continuó una vez por semana hasta que el anticuerpo anti-IL-6 estuvo en condiciones de ser detectado en el suero. Los inmunocitos fueron extirpados de los ganglios linfáticos locales y se fusionaron con la línea celular P301 del mieloma utilizando polietilenglicol 1500. Se seleccionó un hibridoma de acuerdo con el método de Oi, et al. utilizando el líquido de cultivo HAT (Métodos Selectivos en Inmunología Celular, W. H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) para establecer un hibridoma que produjo el anticuerpo anti-humano IL-6.

Se realizó un ensayo de unión con IL-6 de la manera como se describió con anterioridad sobre el hibridoma que produjo el anticuerpo IL-6 anti-humano. Específicamente, una microplaca flexible de polivinilo con 96 cavidades (Dynatech Laboratories, Alexandria, VA) se cubrió durante toda la noche a 4°C con 100 µg de Ig de cabra anti-ratón (10 µg/ml, Cooper Biomedical, Malvern, PA) en 0.1 M de solución buffer de carbonato de hidrógeno-carbonato (pH 9.6). En el paso siguiente, la placa fue tratada durante 2 horas a temperatura ambiente con 100 µg de PBS que contenía albúmina de suero bovino al 1% (BSA).

Después de lavar la placa con PBS, se agregó el sobrenadante del cultivo del hibridoma en cada cavidad y a continuación se sometió a incubación durante toda la noche a 4°C. Se lavó la placa y se agregó IL-6 recombinante rotulado con ¹²⁵I en cada cavidad a 2000 cpm/0.5 ng/cavidad y a continuación se midió la radioactividad de cada cavidad después del lavado utilizando un contador gamma (Beckman Instruments, Fullerton, CA). 32 de 216 clones de hibridoma fueron positivos de acuerdo con el ensayo de unión

de IL-6. Finalmente se obtuvo MH166-BSF2 estable para estos clones. El anticuerpo anti-IL-6 MH166 producido por dicho hibridoma tenía el subtipo IgG1k.

En el paso siguiente, se investigó la actividad neutralizadora sobre el crecimiento del hibridoma por medio del anticuerpo MH166 utilizando el clon MH60.BSF2 del hibridoma de ratón que depende de IL-6. Las células MH60.BSF2 fueron divididas entre las cavidades de una microplaca a $1 \times 10^4/200$ $\mu\text{g}/\text{cavidad}$ y a continuación se agregó una muestra que contenía el anticuerpo MH166 y se cultivó durante 48 horas, luego se cultivó de manera adicional durante 6 horas después de agregar ^3H -timidina (New England Nuclear, Boston, MA) a $0.5 \mu\text{Ci}/\text{cavidad}$. Las células se colocaron luego sobre ~~un~~ papel de filtro de vidrio y se trataron con una cosechadora automática (Labo Mash Science, Tokyo, Japón). Se utilizó el anticuerpo anti-IL-6 de conejo para el control.

Como resultado de esto, el anticuerpo MH166 que depende del volumen inhibió la recaptación de ^3H -timidina por parte de las células MH60.BSF2 inducidas por IL-6. Por lo tanto, se demostró claramente que el anticuerpo MH166 neutraliza la actividad de IL-6.

Ejemplo de Referencia 3 -- Preparación del Anticuerpo del Receptor Anti Humano IL-6

El anticuerpo del receptor anti-IL-6 MT18 producido de acuerdo con el método de Hirata, et al. (Hirata, Y. et al., J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906) se unió a la Sefarosa 4B activada (farmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) de acuerdo con el protocolo adjunto para purificar el receptor de IL-6 (Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828). La línea celular U266 del mieloma humano fue solubilizada con p-paraaminofenil metano sulfonil fluorido hidrocioruro (Wako Chemicals) que contenía digitonina al 1% (Wako

Chemicals), 10 mM trietanolamina (pH 7,8) y 0.15 M NaCl (digitonina buffer) y luego se mezcló con el anticuerpo MT18 unido a los glóbulos de Sefarosa 4B. A continuación, los glóbulos fueron lavados seis veces con solución amortiguadora de digitonina hasta obtener el receptor de IL-6 parcialmente purificado para la inmunización.

Se inmunizó a un ratón BALB/c cuatro veces cada 10 días con el receptor de IL-6 anteriormente mencionado parcialmente purificado obtenido a partir de 3×10^8 células U266 seguido de la producción del hibridoma de acuerdo con los métodos comunes. La actividad de unión del sobrenadante del cultivo del hibridoma desde las cavidades de crecimiento positivo hasta el receptor IL-6 se investigó de acuerdo con el método que se describió con anterioridad. 5×10^7 células U266 fueron rotuladas con ^{35}S -metionina (2.5 mCi) y fueron solubilizadas con la solución amortiguadora de digitonina que se mencionó con anterioridad. Las células U266 solubilizadas luego se mezclaron con el anticuerpo MT18 unido a los glóbulos 4B de Sefarosa que tienen un volumen de 0.04 ml y a continuación se procedió al lavado seis veces con la solución amortiguadora de digitonina, eluyendo el receptor de IL-6 rotulado con ^{35}S -metionina con 0.25 ml de solución amortiguadora de digitonina (pH 3.4) y neutralizando con 0.025 ml de 1 M Tris (pH 7.4).

Se mezclaron 0.05 ml del sobrenadante del cultivo del hibridoma con 0.01 ml de Proteína G Sefarosa (Pharmacia). Después del lavado, la Sefarosa se incubó con 0.005 ml de solución del receptor de IL-6 rotulada con ^{35}S -metionina preparada de la manera como se describió con anterioridad. El inmunoprecipitado se analizó luego con SDS-PAGE y se investigó el sobrenadante del cultivo del hibridoma que reacciona con el receptor de IL-6. Como resultado de esto, se estableció el clon PM-1 del hibridoma de reacción

positiva (FERM EP-2998). El anticuerpo producido del hibridoma PM-1 tiene el subtipo IgG1x.

La actividad inhibitoria de unión con IL-6 del anticuerpo producido por el hibridoma PM-1 o el receptor de IL-6 humano se investigó utilizando la línea celular U2666 de mieloma humano. Se preparó IL-6 recombinante humano a partir de *E. coli* (Hirano, T. et al., Immunol. Lett. (1988) 17, 41-45) y se rotuló con ^{125}I utilizando el reactivo Bolton-Hunter (New England Nuclear, Boston, MA) (Taga, T. et al., J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981).

Se cultivaron 4×10^5 células con 70% (v/v) de sobrenadante del cultivo de PM-1 de hibridoma y 14000 cpm de IL-6 rotulado con ^{125}I durante 1 hora. 70 μl de muestra fueron acodados sobre 300 μl de FCS en un tubo microfugo de polietileno de 400 μl y a continuación se procedió al centrifugado y a la medición de la radioactividad de las células.

Como resultado de esto, se determinó con claridad que el anticuerpo producido por el hibridoma PM-1 inhibe la unión de IL-6 con el receptor de IL-6.

Ejemplo de Referencia 4 – Preparación del Anticuerpo del Receptor de IL-6 Anti-Ratón

El anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 de ratón se preparó de acuerdo con el método descrito en Saito, T. et al., J. Immunol. (1991) 147, 168-173.

Las células CHO que producen el receptor de IL-6 soluble de ratón fueron cultivadas en el líquido de cultivo IMDM que contenía FCS al 10% y a continuación se procedió a la purificación del receptor de IL-6 soluble de ratón del sobrenadante del cultivo utilizando una columna de afinidad en la cual el anticuerpo RS12 del receptor IL-6 anti-ratón (remitirse a Saito, T. et al. que se mencionaron con anterioridad) se inmovilizó en Affigel 10 gel (BioRad).

50 μ g del receptor resultante de IL-6 soluble de ratón se mezclaron con el adyuvante completo de Freund y se inyectaron en el abdomen de una rata de Wistar. La rata fue inmunizada de manera adicional con el adyuvante incompleto de Freund comenzando dos semanas más tarde. Las células de bazo de rata luego se recolectaron el día 45 y después de fusionar 2×10^8 células con 1×10^7 células de la línea P3UI de mieloma de ratón utilizando 50% PEG1500 (Boehringer-Mannheim) de acuerdo con los métodos comunes, las células fusionadas fueron seleccionadas para el hibridoma con el medio HAT.

Después de agregar el sobrenadante para el cultivo del hibridoma a una placa recubierta con anticuerpo IgG anti-rata conejo (Cappel), se dejó reaccionar el receptor de IL-6 soluble de ratón. En el paso siguiente, el hibridoma que produjo el anticuerpo para el receptor de IL-6 soluble de ratón fue seleccionado por medio de ELISA utilizando IgG anti-conejo oveja rotulado con fosfatasa alcalina del anticuerpo del receptor de IL-6 anti-ratón conejo. Los clones del hibridoma de los cuales se confirmó que producían el anticuerpo fueron subseleccionados dos veces hasta obtener un clon único de hibridoma. El clon mencionado fue designado como MR16-1.

La actividad neutralizadora durante la transmisión de la información por parte de IL-6 de ratón de este anticuerpo que produce el hibridoma se investigó de acuerdo con la recaptación de ^3H -timidina utilizando las células MH60.BSF2 (Matsuda, T. et al., J. Immunol (1988) 18, 951-956). 1×10^4 células/200 μ l/cavidad de células MH60.BSF2 se prepararon en una placa con 96 cavidades. 10 pg/ml de IL-6 de ratón y 12.3 a 1000 ng/ml del anticuerpo MR16-1 o del anticuerpo RS12 se agregaron a esta placa y se cultivaron durante 44 horas a 37°C y CO_2 al 5% y a continuación se agregó 1 μCi /cavidad de ^3H -timidina. La recaptación de ^3H -timidina luego se midió 4 horas más

tarde. Como resultado de esto, el anticuerpo MR16-1 inhibió la recaptación de ^3H -timidina por medio de las células MH60.BSF2.

Por lo tanto, se determinó claramente que el anticuerpo producido por el hibridoma MR16-1 (FERM PB-5875) inhibe la unión de IL-6 con el receptor de IL-6.

REIVINDICACIONES:

Habiendo así especialmente descripto y determinado la naturaleza de la presente invención y la forma como la misma ha de ser llevada a la práctica se declara reivindicar como de propiedad y derecho exclusivo:

1. Un agente terapéutico para el mesotelioma que contiene un antagonista de la interleuquina-6 (IL-6) como su ingrediente activo.
2. Un agente terapéutico para el mesotelioma de acuerdo con la reivindicación 1 en la cual el mesotelioma es el mesotelioma de pleura.
3. Un agente terapéutico para el mesotelioma de acuerdo con la reivindicación 2 en la cual el mesotelioma de pleura es el mesotelioma de pleura maligno.
4. Un agente terapéutico para el mesotelioma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en las cuales el antagonista de IL-6 es el anticuerpo para el receptor de IL-6.
5. Un agente terapéutico para el mesotelioma de acuerdo con la reivindicación 4 en la cual el anticuerpo para el receptor de IL-6 es el anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6.
6. Un agente terapéutico para el mesotelioma de acuerdo con la reivindicación 4 en la cual el anticuerpo para el receptor de IL-6 es el anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 humano.
7. Un agente terapéutico para el mesotelioma de acuerdo con la reivindicación 4 en la cual el anticuerpo para el receptor de IL-6 es el anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 de ratón.
8. Un agente terapéutico para el mesotelioma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 en las cuales el anticuerpo para el receptor de IL-6 es el anticuerpo recombinante.

9. Un agente terapéutico para el mesotelioma de acuerdo con la reivindicación 6 en la cual el anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 humano es el anticuerpo PM-1.
10. Un agente terapéutico para el mesotelioma de acuerdo con la reivindicación 7 en la cual el anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 de ratón es el anticuerpo MR16-1.
11. Un agente terapéutico para el mesotelioma de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 10 en las cuales el anticuerpo para el receptor de IL-6 es el anticuerpo quimérico, el anticuerpo humanizado o el anticuerpo humano.
12. Un agente terapéutico para el mesotelioma de acuerdo con la reivindicación 11 en la cual el anticuerpo humanizado para el receptor de IL-6 es el anticuerpo PM-1 humanizado.
13. Un inhibidor del crecimiento contra las células del mesotelioma que contiene un antagonista de la interleuquina-6 (IL-6) como su ingrediente activo.
14. Un inhibidor del crecimiento de acuerdo con la reivindicación 13 en la cual, el mesotelioma es el mesotelioma de pleura.
15. Un inhibidor del crecimiento de acuerdo con la reivindicación 14 en la cual, el mesotelioma de pleura es el mesotelioma de pleura maligno.
16. Un inhibidor del crecimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15 en las cuales el antagonista de IL-6 es el anticuerpo para el receptor de IL-6.
17. Un inhibidor del crecimiento de acuerdo con la reivindicación 16 en la cual el anticuerpo para el receptor de IL-6 es el anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6.

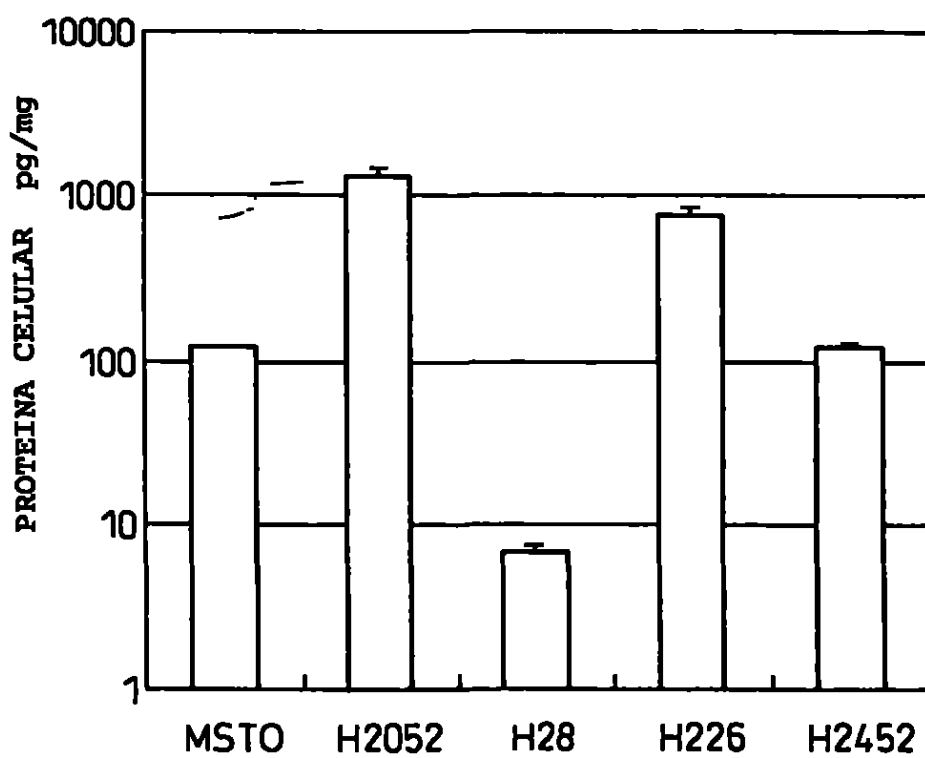
18. Un inhibidor del crecimiento de acuerdo con la reivindicación 16 en la cual el anticuerpo para el receptor de IL-6 es el anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 humano.
19. Un inhibidor del crecimiento de acuerdo con la reivindicación 16 en la cual el anticuerpo para el receptor de IL-6 es el anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 de ratón.
20. Un inhibidor del crecimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 19 en las cuales el anticuerpo para el receptor de IL-6 es el anticuerpo recombinante..
21. Un inhibidor del crecimiento de acuerdo con la reivindicación 18 en la cual el anticuerpo monoclonal para el receptor IL-6 humano es el anticuerpo PM-1.
22. Un inhibidor del crecimiento de acuerdo con la reivindicación 19 en la cual el anticuerpo monoclonal para el receptor de IL-6 de ratón es el anticuerpo MR16-1.
23. Un inhibidor del crecimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 22 en las cuales el anticuerpo para el receptor IL-6 es el anticuerpo quimérico, el anticuerpo humanizado o el anticuerpo humano.
24. Un Inhibidor del crecimiento de acuerdo con la reivindicación 23 en la cual el anticuerpo humanizado para el receptor de IL-6 es el anticuerpo PM-1 humanizado.

p.: CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

RESUMEN

La presente invención proporciona un agente terapéutico para el mesotelioma que contiene un antagonista de la interleuquina-6 (IL-6) tal como el anticuerpo para el receptor de IL-6 (IL-6R) y un inhibidor del crecimiento celular del mesotelioma que contiene un antagonista de IL-6 tal como el anticuerpo para IL-6R.

Fig. 1



$\frac{2}{17}$

Fig.2

IL-6R

GAPDH

KT-3

MSTO

H2052

H226

H2452

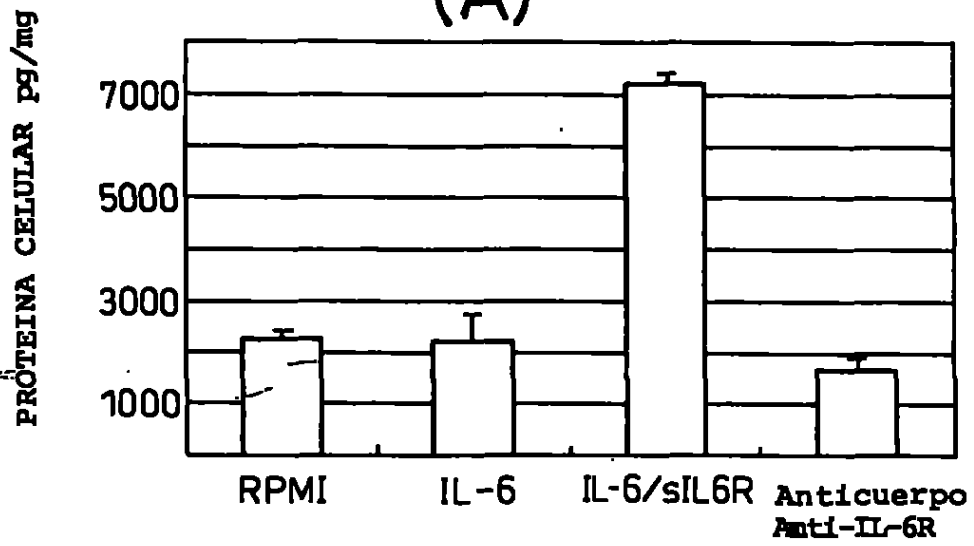
H28

sinoviocitos

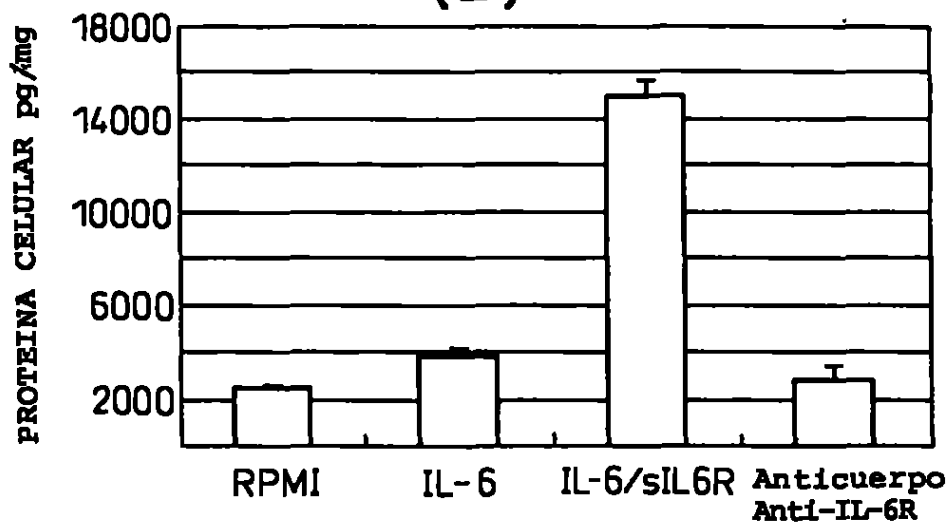
3/17

Fig.3

(A)

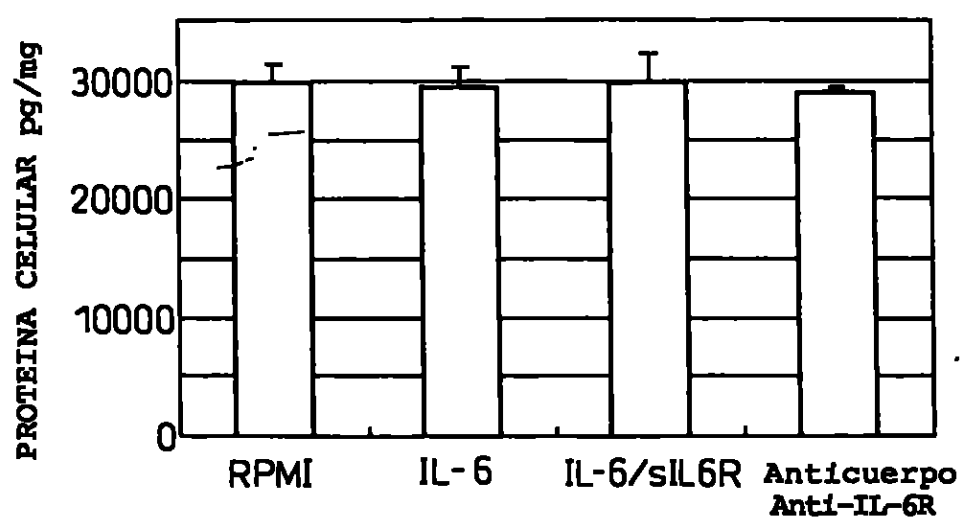


(B)



$\frac{4}{17}$

Fig.4



5/17

Fig.5

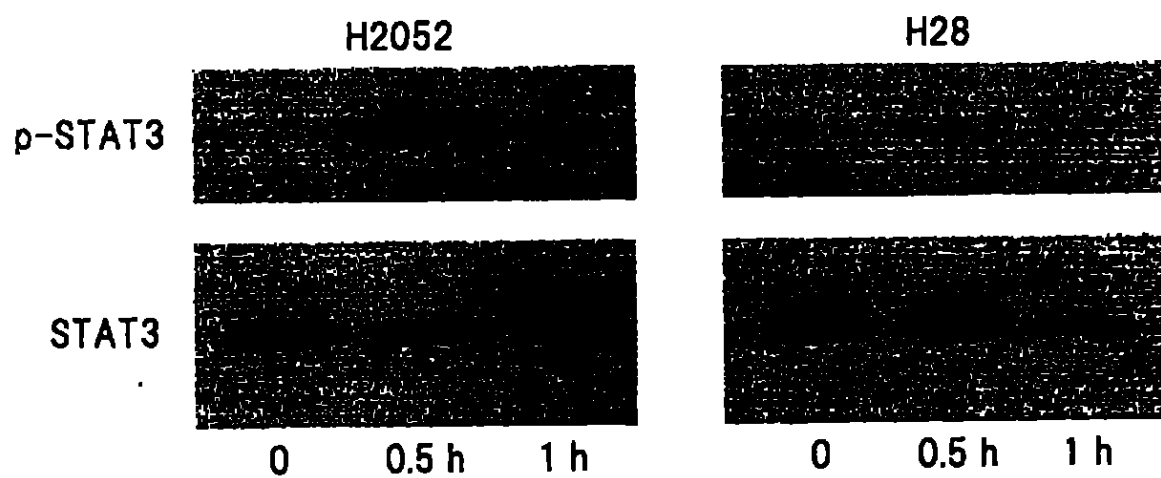
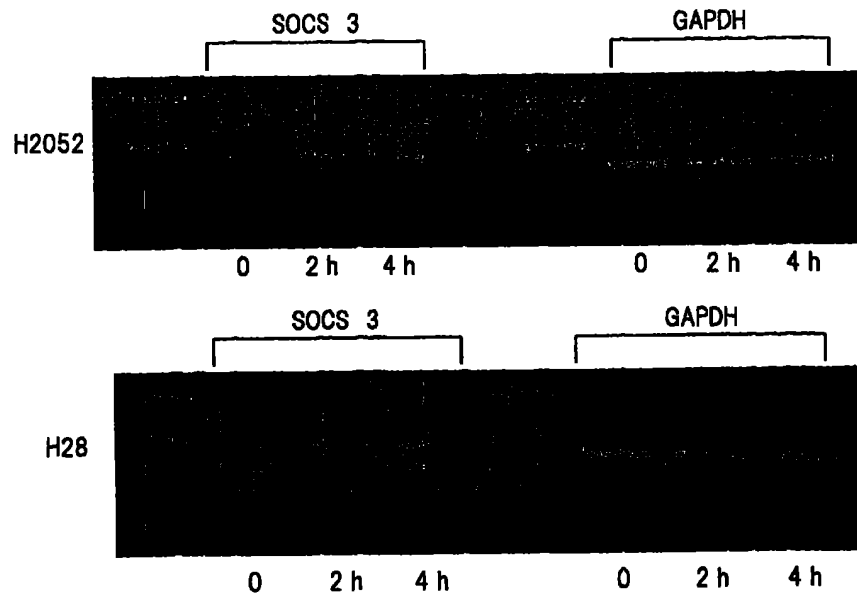


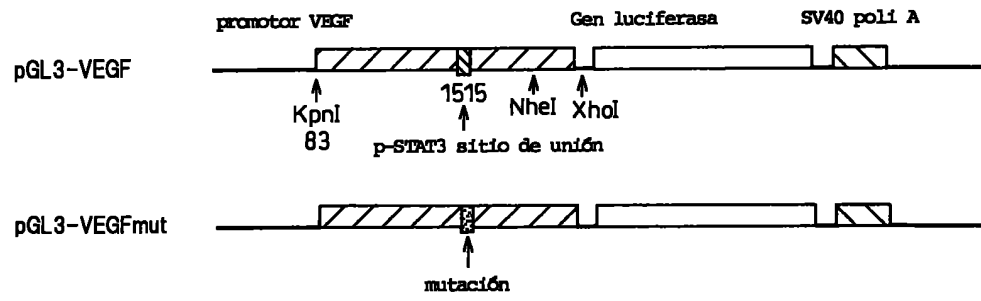
Fig 6



6/17

148

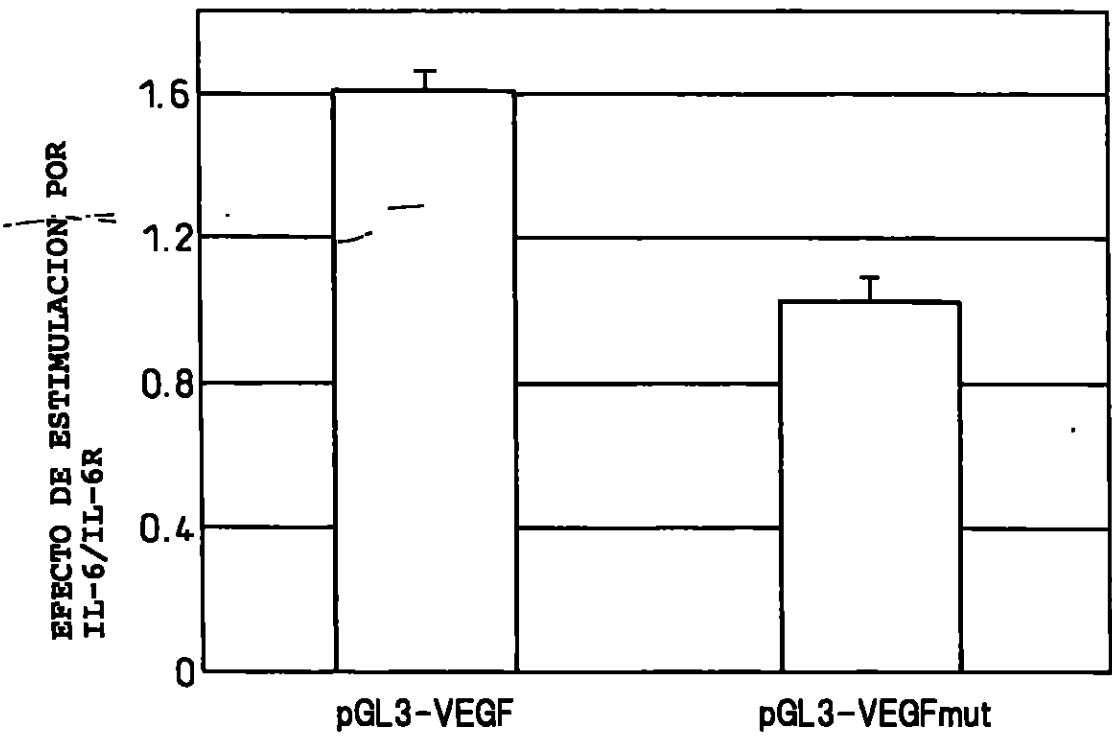
Fig 7

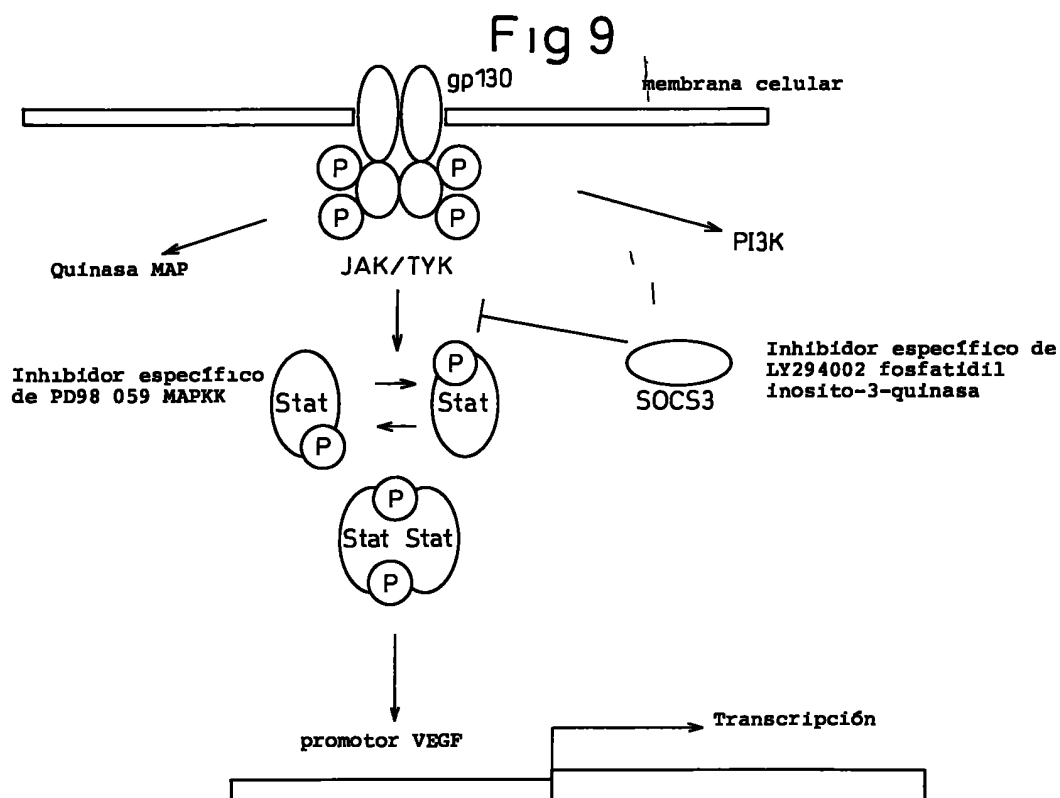


7/17

149

Fig.8





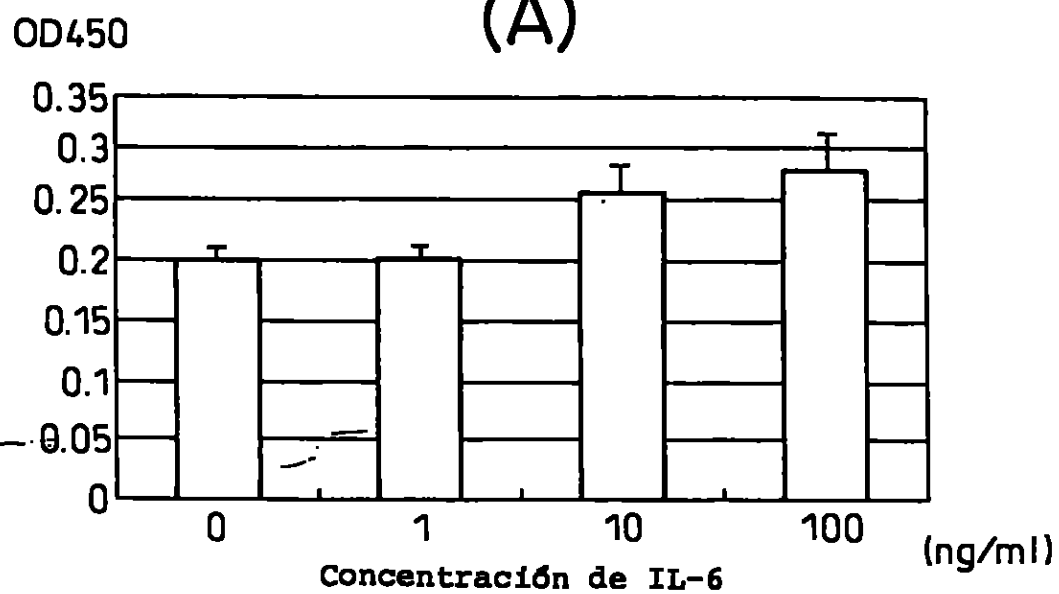
9/17

1st

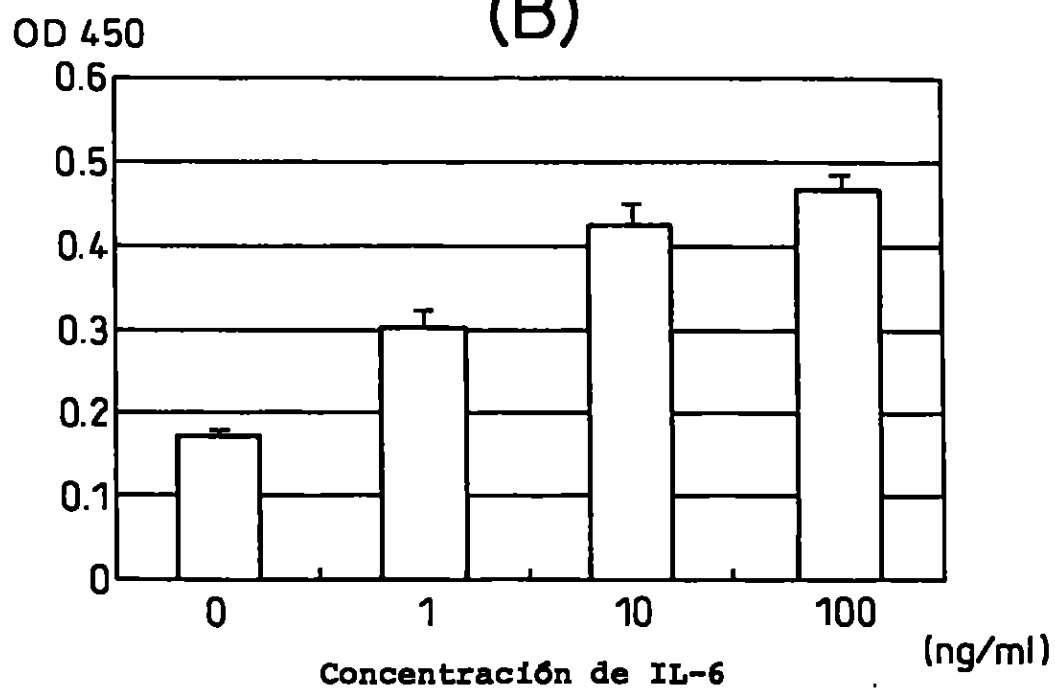
10/17

Fig.10

(A)



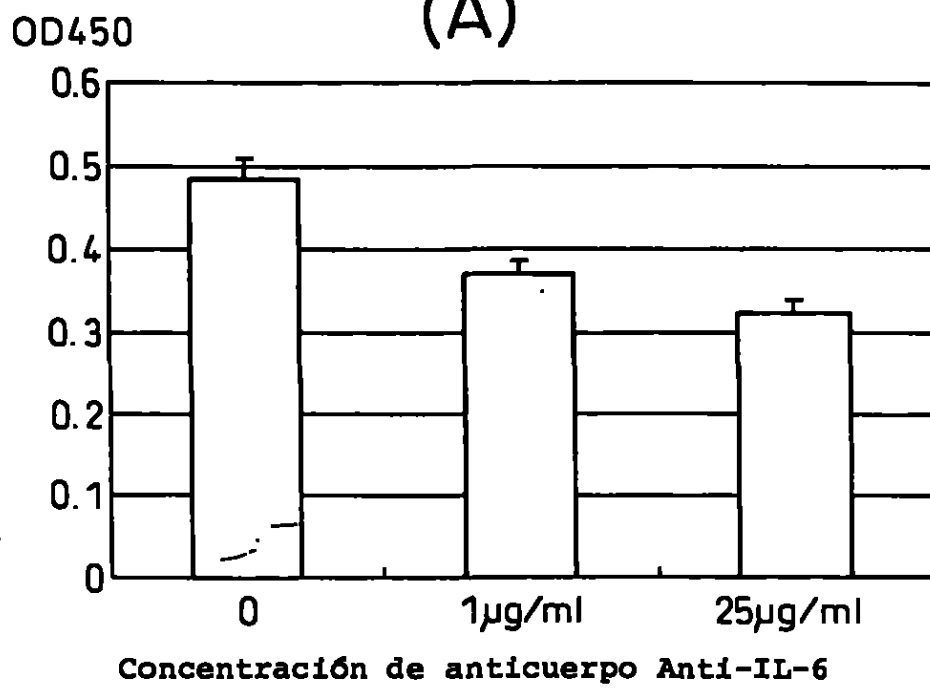
(B)



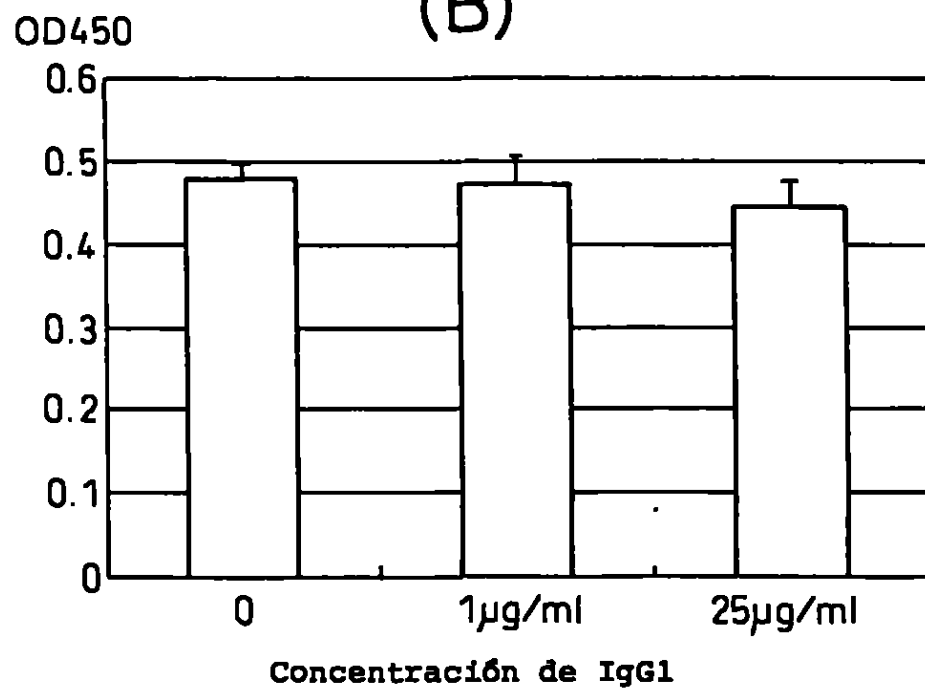
11/17

Fig. 11

(A)



(B)



12/17

Fig.12

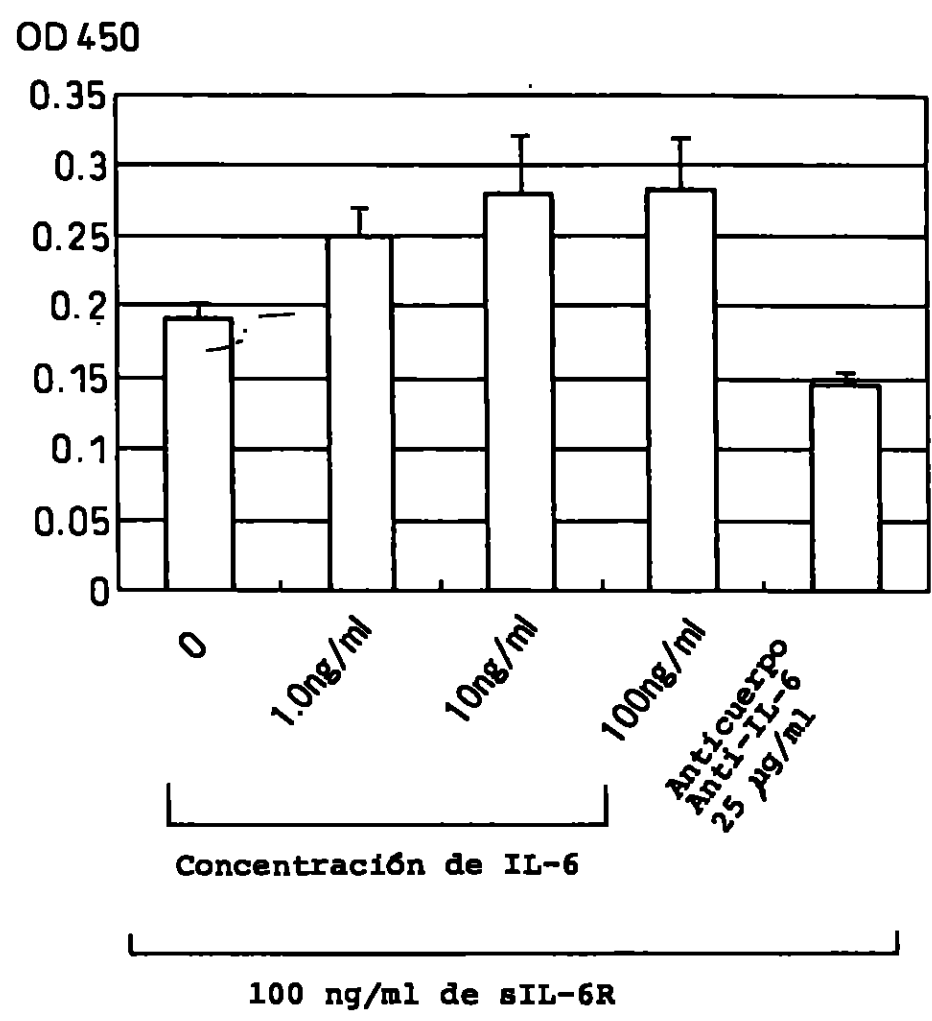
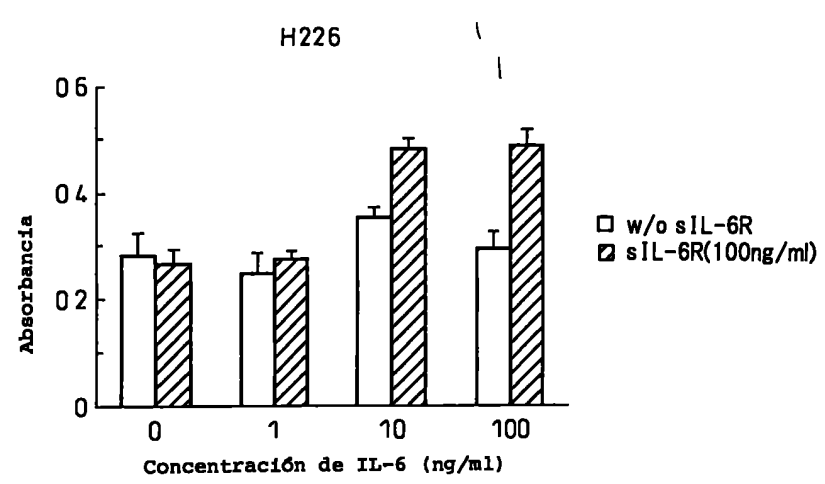


Fig 13



13/17

58

14/17

Fig.14

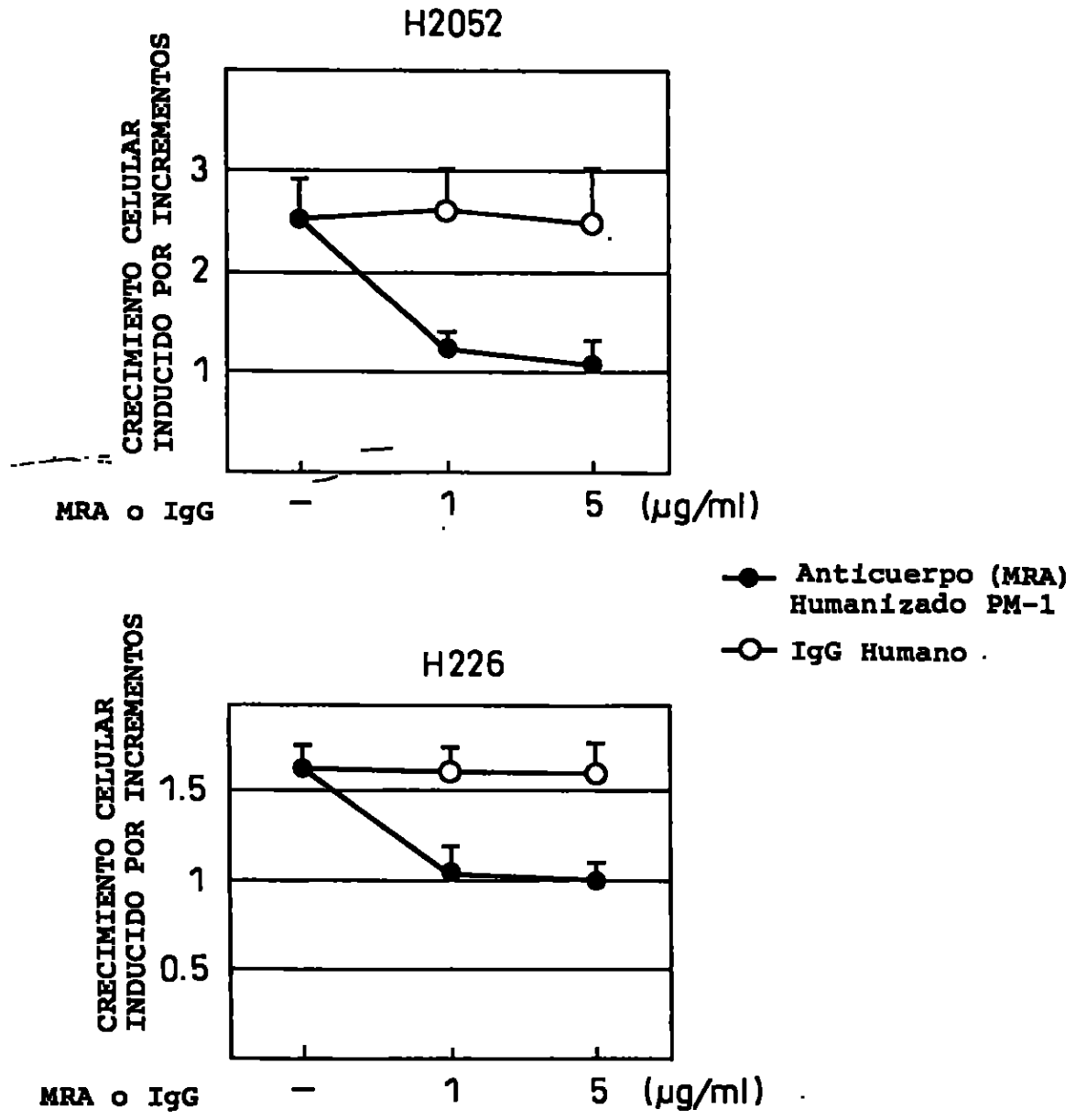
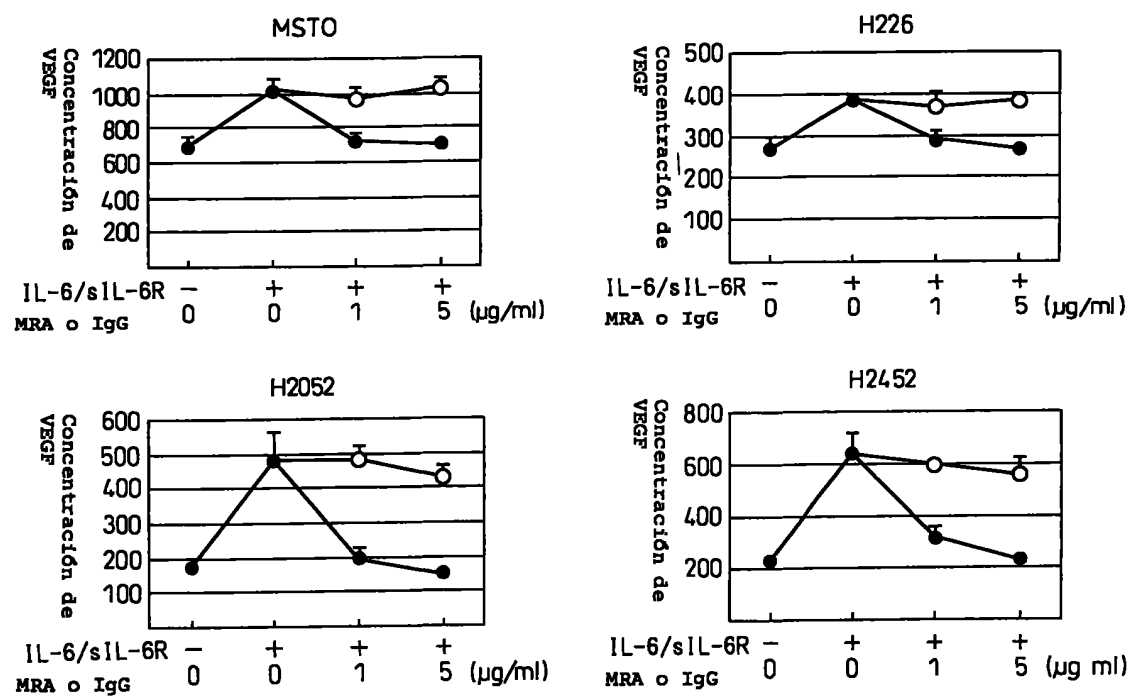


Fig15

● Anticuerpo (MRA) PM-1 HUMANIZADO
○ IgG Humano



15/17

15/17

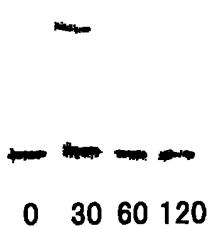
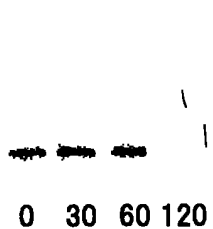
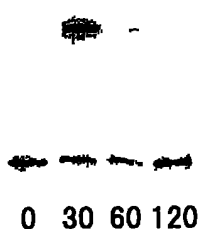
Fig 16

H2052

ANTICUERPO
HUMANIZADO PM-1
(5 μ g/ml)

IgG (5 μ g/ml)

p-STAT3



STAT3

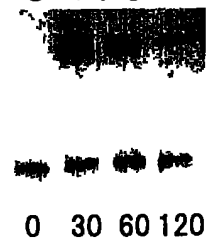
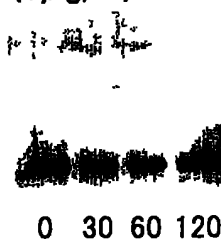
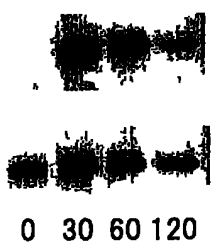
(min)

H2452

ANTICUERPO
HUMANIZADO PM-1
(5 μ g/ml)

IgG (5 μ g/ml)

p-STAT3



STAT3

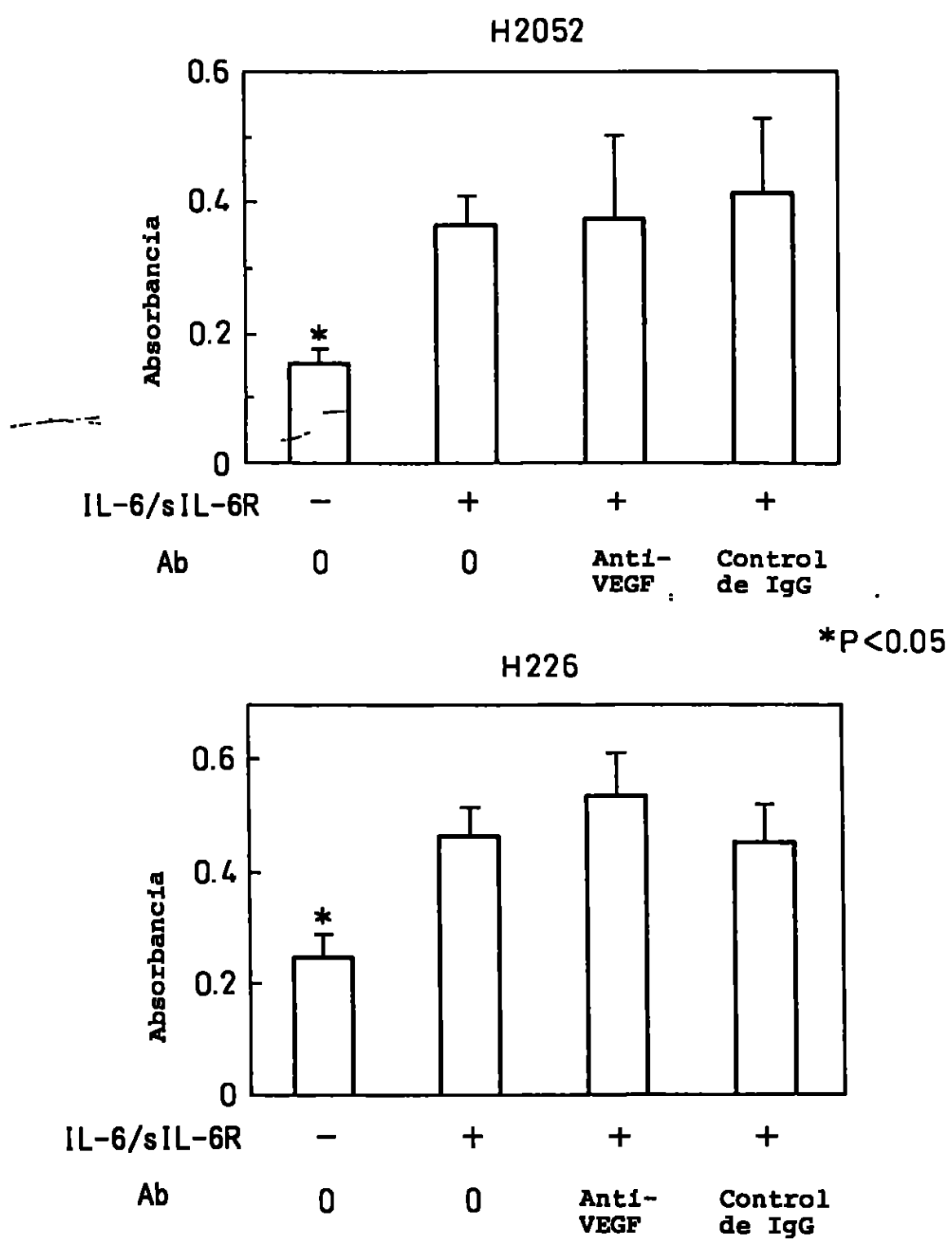
(min)

16/17

2

17/17

Fig.17



Depositor
Name: CHUGAI SEIYAKU
KABUSHIKI KAISHA
Representative: Osamu Nagayama

160
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

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

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

1. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

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

(Deposition Number)

FERM BP-5875

2. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under 1 above was accompanied by:

- x a scientific description
- x a proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

3. RECEIPT AND ACCEPTANCE

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

4. RECEIPT OF TRANSFER

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

5. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

National Institute of Bioscience and Human-Technology

Agency of Industrial Science and Technology

Director General Michio Oishi

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

March 13, 1997

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

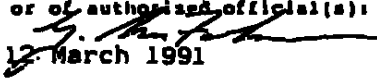
I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR:	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:
Escherichia coli DH5- α pPM-h1	NCIMB 40362
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by:	
☐ a scientific description	
☒ a proposed taxonomic designation	
(Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 12 February 1991 (date of the original deposit) ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion)	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: NCIMB Ltd., Address: 23 St Machar Drive, Aberdeen. AB2 1RY	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: 12 March 1991

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

INTERNATIONAL FORM

TO
Dr. Mary M. Bandig,
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 DHS ₄ 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., Address: 23 St Machar Drive, Aberdeen. AB2 1RY	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorised official(s):  Date: 12 March 1991

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015674

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ A61K45/00, 39/395, A61P35/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ A61K45/00, 39/395, A61P35/00

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

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

CA (STN), MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	H.Bielefeldt-Ohmann et al., Interleukin-6 involvement in mesothelioma pathobiology: inhibition by interferon α immunotherapy, Cancer Immunol.Immunother., 1995, Vol.40, pages 241 to 250	1-24
A	Hiroshi SUZUKI et al., Anti-human interleukin-6 receptor antibody inhibits human myeloma growth in vivo, Eur.J.Immunol., 1992, Vol.22, pages 1989 to 1993	1-24
X	JP 8-245414 A (PRIVATE BIOLOGICALS CORP.), 24 September, 1996 (24.09.96), Full text & WO 96/40966 A & AU 9660381 A	1-3,13-15

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 November, 2004 (19.11.04)

Date of mailing of the international search report
07 December, 2004 (07.12.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

16A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/015674

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 01/42484 A1 (HUMAN GENOME SCIENCES, INC.), 14 June, 2001 (14.06.01), Full text & AU 2001/20663 A & US 2002/0037523 A1 & EP 1244807 A1 & JP 2004-500810 A	1-3,13-15
A	T. NAKANO et al., Interleukin 6 and its relationship to clinical parameters in patients with malignant pleural mesothe- lioma, British Journal of Cancer, 1998, Vol.77, No.6, pages 907 to 912	1-24
A	Masaaki HIGASHIHARA, M.D., Increased Secretion of Interleukin-6 in Malignant Mesothelioma Cells from a Patient with Marked Thrombocy- tosis, Cancer, Vol.70, No.8, 1992, pages 2105 to 2108	1-24

Expediente No		06044336.	No de Folia
Item		No de unidades	
1	CD		
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA		
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones:

Arte final.

165 ~~166~~

1



.....

167
166.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 08-044338-00000-0000 Fax: 2008-05-10 17:30:42
Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra: 11 PATENTEYII Ene 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios: 187

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 34,622
FECHA : MAYO 10 DE 2006

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	54928395	10/05/2006	26,445,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50003-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.
		TOTAL :	\$ 463,000.00

SOM: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS



RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Go 14419-841-003-3

167
XIX



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

1

Delegatura de Propiedad Industrial División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION () MODELO DE UTILIDAD ()	()	()
Indicación de que se solicita la concesión de una patente	()	()
Dato de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	()
Descripción de la invención	()	()
Dibujos de ser estos pertinentes	()	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

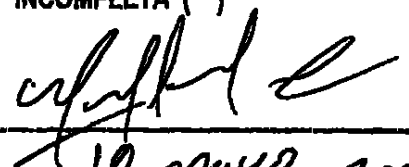
Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
Dato de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	()
Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño	()	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
Dato de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud	()	()
Representación gráfica del Esquema Trazado	()	()
Comprobante de Pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA () INCOMPLETA ()	()	()

Responsable

1 de


10 Mayo 2006