



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

06-94692

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO

AGENTES TERAPEUTICOS PARA TRASTORNOS DEL OIDO INTERNO

QUE CONTIENEN UN ANTAGONISTA DEL IL-6 COMO UN

INGREDIENTE ACTIVO

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A 61K 45/00

71. SOLICITANTE

CHUGAI SEIYAKU KARIUSHIKI KAISHA y KEIO UNIVERSITY

DOMICILIO

TOKYO, JAPON

74. APODERADO

EMILIO FERRERO
C.C. 438.019 de Usaquén

82. BOGOTÁ, D. C.,

55-



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-094692- -00000-0000
Fec: 2006-09-20 16:36:34 Dep. 2020 NUECREACIONE adición
Tra. 11 PATENTE/MI
Eve: 378 FASENACIONAL/
Act 411 PRESENTACION Folios: 157

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL

24/10/06 -

SOLICITUD DE:

- 1

☒ Patente de Invención.
☒ Capítulo I.
- ☐ Patente de Modelo de Utilidad.
☐ Capítulo II.

2
SOLICITANTE
(71)

Nombre: CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI
KAISHA y KEIO UNIVERSITY
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de Japón.

Dirección: 5-1, Ukima 5-chome
Kita-ku
Tokyo 1158543
Japón

y

15-45, Mita 2-chome
Minato-ku
Tokio 1088345
Japón

Domicilio: Tokyo 1158543
Japón

y

Tokio 1088345
Japón

respectivamente

IDENTIFICACIÓN

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

3
REPRESENTANTE
APODERADO

Nombre: EMILIO FERRERO
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11
Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@camyp.com
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

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

4
INVENTOR (ES)
(72)

1. Masato FUJIOKA
c/o Keio University School of Medicine
35, Shinanomachi, Shinjuku-Ku
Tokio 1608582
Japón

3. Kaoru OGAWA
c/o Keio University School of Medicine
35, Shinanomachi, Shinjuku-Ku,
Tokio 1608582,
Japón

5. Sho KANZAKI
c/o Keio University School of Medicine
35, Shinanomachi, Shinjuku-Ku
Tokio 1608582,
Japón
2. Hirotaka James OKANO
c/o Keio University School of Medicine,
35, Shinanomachi, Shinjuku-Ku
Tokio 1608582,
Japón

4. Hideyuki OKANO
c/o Keio University School of Medicine
35, Shinanomachi, Shinjuku-Ku
Tokio 1608582,
Japón

5

PCT (86)Solicitud Internacional No. PCT/JP2005/006202Fecha: 24 de marzo de 2005Publicación Internacional No. WO 2005/089802 A1Fecha: 29 de septiembre de 2005

6

Título (54)**AGENTES TERAPEUTICOS PARA TRASTORNOS DEL OIDO INTERNO QUE
CONTIENEN UN ANTAGONISTA DE IL-6 COMO UN INGREDIENTE ACTIV**

7

Clasificación Internacional (51) A61K 045/000

8

PrioridadSI ☒ NO ☐**(33) País de Origen**JP
JP**(32) Fecha**24 de marzo de 2004
15 de septiembre de 2004**(31) Número de Solicitud**2004-087270
2004-268800

9

Comprobante de pago No.: 06-71,888**Fecha: 18 de septiembre de 2006**

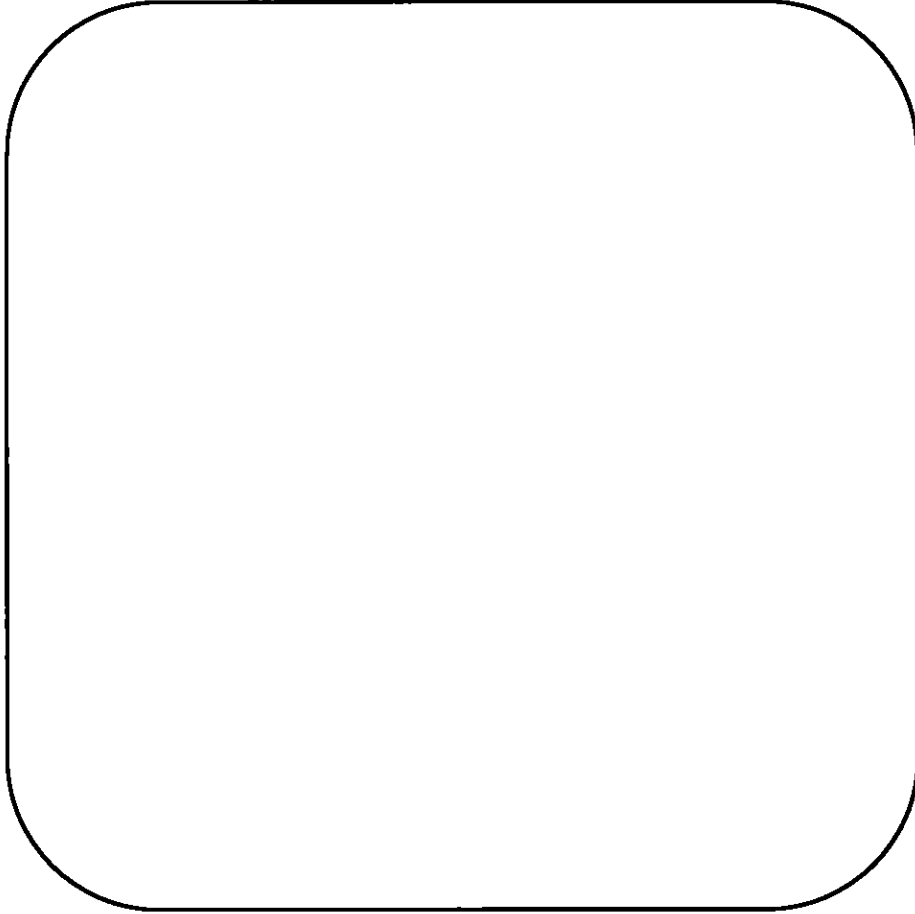
10

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 :

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

JDF

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2005/089802 A1
2. ☒ **Forma PCT/ISA/210**. Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Extracto de publicación.

**NO SE REALIZARON MODIFICACIONES EN
FASE INTERNACIONAL**

CAVELIER

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

179

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseñanzas, 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

14778
6002

KEIO UNIVERSITY

domiciliado (s) en/of 15-45, Mita 2-chome,

Minato-ku, Tokyo 108-8345, Japan

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 aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

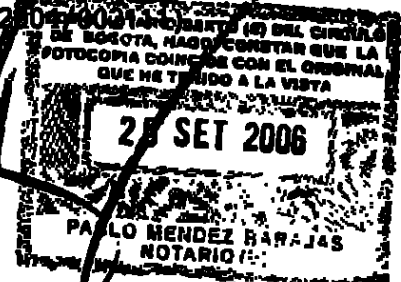
Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso-administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en

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 or 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 in favor of the above-named attorneys-at-law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all

© CAVELIER ABOGADOS
 WPPODE01-179 (MINUTA 12.1.1.2.5)

(International Application)
 No. PCT/JP2006/001400

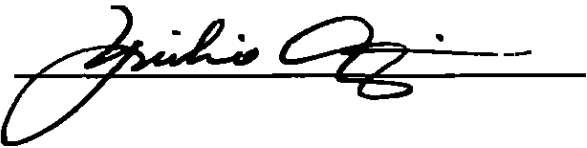


todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseñas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con estos derechos; acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

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 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 June 1, 2005
en/in Tokyo, Japan

por/by Yuichiro Anzai, President

Firma/Signature 



7

CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de

es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de

de la compañía

sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de

que la dirección de dicha compañía es

y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en

Ciudad

País

Hoy del mes de de 200

NOTARIAL CERTIFICATION (COMPANY)

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature of

is authentic, that the signatory currently acts in the position of

of the company

a company currently existing and organized under the laws of

that the address is

and that the signatory has the power to grant this document.

The Notary Public is aware and attests to the above facts upon examination of the corresponding documents.

Given and signed in

City

Country

This day of 200

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country:

This public document

2. has been signed by:

3. acting in the capacity of:

4. bears the seal/stamp of:

Certified

5. at: 6. the

7. by

8. No.

9. Seal/stamp 10. Signature

CAVELIER ABOGADOS
WPP0DE01-179 (MINUTA 12.1.1.2.5)

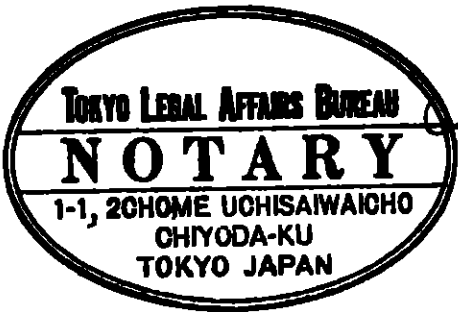
COMO NOTARIO SEXTO (R) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
20 SET 2006

Registration No. 1207 2005

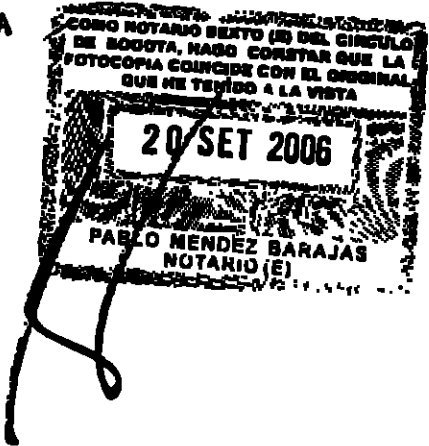
NOTARIAL CERTIFICATE

I, the undersigned Notary, do hereby certify that Tomofumi ISAHAYA, an agent of Yuichiro ANZAI, President of KEIO UNIVERSITY, who has been authorized to sign the attached document, has stated in my very presence that said Yuichiro ANZAI acknowledged himself to have signed the attached document, and that his signature is true and genuine.

Dated: on this 8th day of August, 2005



Tadahiko Mitsuda
TADAHIKO MITSUDA
NOTARY



平成17年登録第7207号
証 証

囑託人慶應義塾理事長安西祐一郎の代理人藤早智史は、本公証人に対し、囑託人が別添文に署名したことを自認している旨陳述した。



よって、これを認証する。

平成17年 8 月 8 日、本公証人役場において
東京都千代田区内幸町2丁目1番1号 霞ヶ関公証役場
東京法務局所属

公証人
Notary

満田忠彦
TADAHIKO MITSUDA



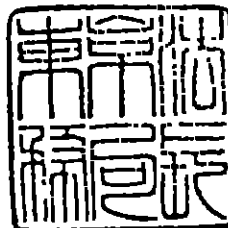
証 明

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17年 8 月 8 日

東京法務局長

戸田信久



APOSTILLE

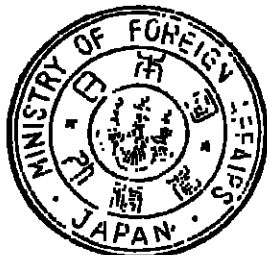
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN
This public document
2. has been signed by TADAHIKO MITSUDA
3. acting in the capacity of Notary of the Tokyo Legal Affairs Bureau
4. bears the seal/stamp of TADAHIKO MITSUDA

Certified

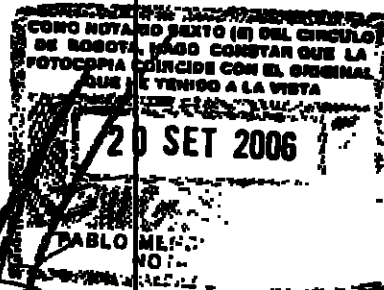
5. at Tokyo
6. AUG - 8 2006
7. by the Ministry of Foreign Affairs
8. 05- N0001952
9. Seal/stamp:

10. Signature



K. Oyabe
Kazutoyo OYABE

For the Minister for Foreign Affairs



TRADUCCIÓN OFICIAL 214/2005 DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL APROBADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE LA REPÚBLICA DE COLOMBIA Y MEDIANTE EL CUAL KEIO UNIVERSITY EMPRESA DOMICILIADA EN 15-45, MITA 2-CHOME, MINATO-KU, TOKIO 1088-8345, JAPÓN OTORGA PODER A EMILIO FERRERO, TPA 31929, GONZALO PERDOMO, TPA 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ TPA 23555 Y A GERMÁN CAVELIER, TPA 832. EXPEDIDO Y FIRMADO EL 1 DE JUNIO DE 2005 EN TOKIO, JAPÓN, POR YUICHIRO ANZAI, PRESIDENTE. FIRMA ILEGIBLE.

REGISTRO NÚMERO 1207 2005

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

Yo, el notario abajo firmante, por la presente certifico que Tomofumi ISAHAYA, agente de Yuichiro ANZAI, presidente de KEIO UNIVERSITY, quien ha sido autorizado para firmar el documento adjunto, ha declarado en mi presencia que dicho Yuichiro ANZAI reconoció él mismo haber firmado el documento adjunto y que su firma es verídica y genuina.

Fechado el 8 de agosto de 2005.

FIRMADO: TADAHIKO MITSUDA, NOTARIO

OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE TOKIO

NOTARIO, 1-1, 2CHOME UCHISAIWAICHO, CHIYODA-KU, TOKIO

APOSTILLA:

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

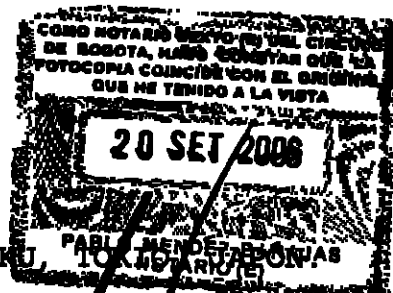
1. JAPÓN

Este documento público

2. ha sido firmado por TADAHIKO MITSUDA

3. quien actúa en su calidad de NOTARIO DE LA OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE TOKIO

4. lleva el sello de TADAHIKO MITSUDA



CERTIFICADO

5. en Tokio

6. el 8 de agosto de 2005

7. por el Ministerio de Relaciones Exteriores

8. Número 05 No 001952, ✓

9. Sello:

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, JAPÓN

10. Firma: KAZUTOYO OYABE

A nombre del Ministro de Relaciones Exteriores

COLO-14776891-001-6

WPCL002G ID 7108

Bogotá, 26 de septiembre de 2005.

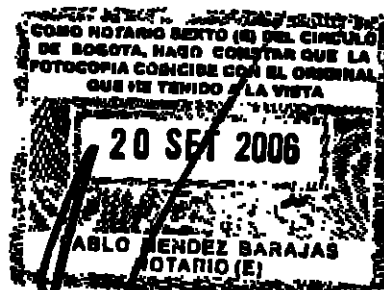
Eduardo Calado

Eduardo Calado Riquelme

TRADUCTOR OFICIAL

BOGOTÁ - COLOMBIA

Act. 311 Febrero de 1991



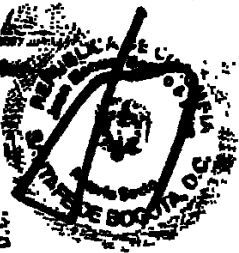
COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTIAGO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE

Eduardo Calado

Nagua-la

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA SANTIAGO DE BOGOTA.

27 SEP 2005



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 SEP 27 P 1:26

UCS

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTIAGO DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

47194b

Eduardo Calado

COTA FIRMADA ADECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENAN
LAS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTIAGO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME TRUENO A LA VISTA

20 SET 2006

PAULO MERDEZ BARAJAS
NOTARIO (E)

[Handwritten signature]

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 4° 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 nra (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Consal de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplente, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

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

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

In addition, we authorize (authorize) the above named attorneys at law to obtain the protection of my (our) industrial property and against unfair competition, for which purpose I (we) authorize (authorize) me (us) before any authorities of persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, contentious administrative and judicial, as well as before Arbitration Court, to obtain 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

10-10-10

COMO NOTARIO DEBTO DE DEL CIRCUITO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA CONCIDE CON EL ORIGINAL
QUE HE TENIDO A LA VISTA
20 SET 2006
PABLO MENDEZ JARA
NOTARIO (E)

[Handwritten signature]



...puedan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan
suministrar 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

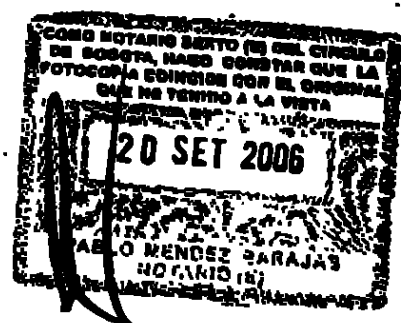
at/in Tokyo, Japan

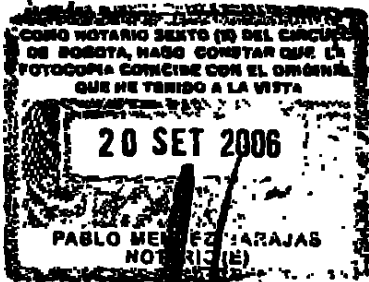
for/by Osamu NAGAYAMA

President, CEO

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

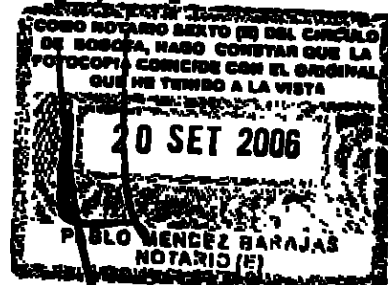
The foregoing was duly proven by the certified copy of the company register issued by Tokyo Legal Affairs Bureau, Japanese Government, dated July 21, 2004.

Dated this 7th day of October, 2004

Norio Akiyama
Notary Public Norio Akiyama



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



RECEIVED
JUN 21 1966

COMO NOTARIO PUBLICO (E) DEL CIRCULO
DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA
FOTOCOPIA CLASIFICA CON EL ORIGINAL
QUE ME TIENEN A LA VISTA

20 SE 2006

PABLO RUIZ TARAJAS
NOTARIO (E)



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



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

4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at Tokyo

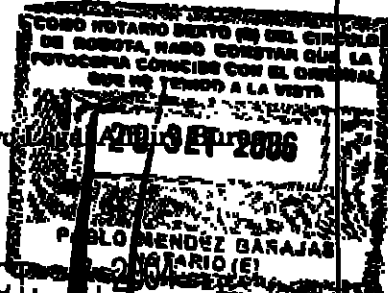
6.

7. by the Ministry of Foreign Affairs

8. 04- NO 003170

9. Seal/stamp:

10. Signature



Shinichi HAGIWARA

For the Minister for Foreign Affairs

76
16

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

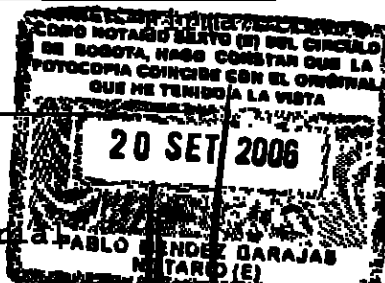
A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento escrito en inglés y español por medio del cual CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA, domiciliado en el 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokio 115-8543 Japón, por el presente ratifica la solicitud de patente No. 04.090.189 presentada por el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

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

Firma Ilegible

Firma

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA



Registro No. 561 de 2001

Certificado Notarial

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

Expedido hoy 7 de Octubre de 2004

Firma ilegible
Notario Público Norio Akiyama

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

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

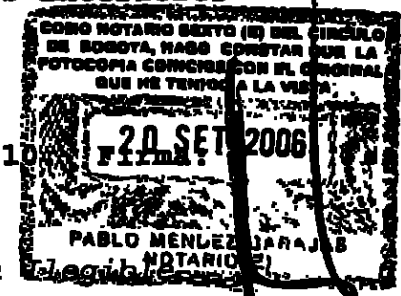
Sellos rojos al lado de la firma y en la parte superior del documento.

APOSTILLA
(Convention de La Haye du 5 octubre 1961)

- 1. País: JAPÓN
- Este documento público
- 2. ha sido firmado por Norio Akiyama
- 3. actuando en calidad de Notario de la Oficina de Asuntos Legales de Tokio
- 4. lleva el sello/estampilla de

Certificado

- 5. en Tokio
- 6. OCT. 7.2004
- 7. por el Ministerio de Relaciones Exteriores
- 8. 04 - No. 003170 ✓
- 9. Sello/estampilla

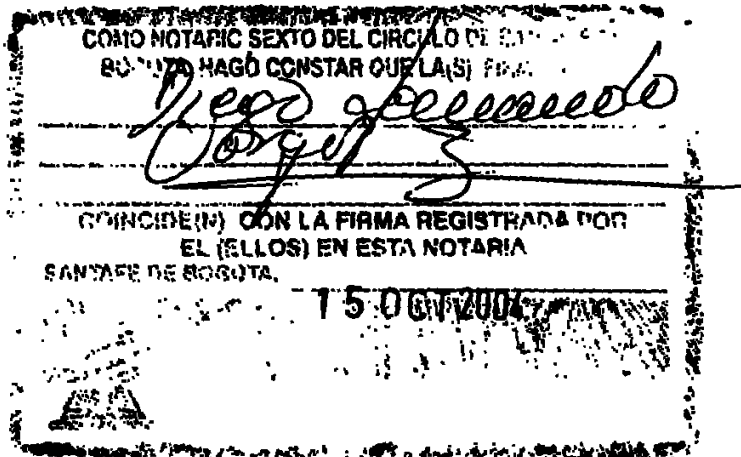


Firma Shinichi HAGIWARA

Por el Ministro de Relaciones Exteriores

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

DVZ/ID-6065/WPCL002G/COLO 14419-841-001-7 **DIEGO F. VARGAS Z.**
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLES - INGLES - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999²



NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

JUN OCT 15 P 12:46

UCS
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTI FE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

055123

Diego Jaramillo
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS



ABOGADOS

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4a N° 72-36
BOGOTÁ, 8 - COLOMBIA

CESION

Yo, (nosotros) abajo firmado (s)

1. →

2. →

3. →

4. →

5. →

domiciliado(s) en

1.

2.

3.

4.

5.

declaro(amos) bajo juramento ser único(s) y verdadero(s) inventor(es)

de la invención: AGENTES TERAPEUTICOS PARA TRASTORNOS
DEL OIDO INTERNO QUE CONTIENEN UN ANTAGONISTA
DE IL-6 COMO UN INGREDIENTE ACTIVO

(solicitud internacional PCT/JP2005/006202)

declaro(amos) así mismo que cedo(amos) y transfiero(amos), sin

Limitación, a favor de la sociedad

1) CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

2) KEIO UNIVERSITY
constituida y existente de conformidad con las leyes de
JAPON

domiciliada en

1) 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115-8543, Japan

2) 15-45, Mita 2-chome, Minato-ku, Tokyo 108-8345

todos los derechos inherentes a dicha invención y que la citada
Compañía queda facultada para solicitar en su nombre la patente
de invención correspondiente en la República de Colombia.

Dado y firmado hoy/Given and signed this

en/in Tokyo, Japan

por/by August 25, 2006

Firma/Signature

1) Masato Fujioka
Masato FUJIOKA

2) Hiroataka James OKANO
Hiroataka James OKANO

3) Kaoru OGAWA
Kaoru OGAWA

4) Hideyuki OKANO
Hideyuki OKANO

5) Sho KANZAKI
Sho KANZAKI

ASSIGNMENT

I (we), the undersigned

1. Masato FUJIOKA

2. Hiroataka James OKANO

3. Kaoru OGAWA

4. Hideyuki OKANO

5. Sho KANZAKI

of

1. c/o Keio University School of Medicine, 35,
Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan2. c/o Keio University School of Medicine, 35,
Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan3. c/o Keio University School of Medicine, 35,
Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan4. c/o Keio University School of Medicine, 35,
Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan5. c/o Keio University School of Medicine, 35,
Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

state(s) under oath to be sole and true inventor(s) of the invention:

THERAPEUTIC AGENTS FOR INNER EAR DISORDERS CONTAINING

AN IL-6 ANTAGONIST AS AN ACTIVE INGREDIENT

(International Application No. PCT/JP2005/006202)

state as well, that assign, without reservations or limitations in favour

of 1) CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

2) KEIO UNIVERSITY

a corporation constituted and existing in conformity with the laws of

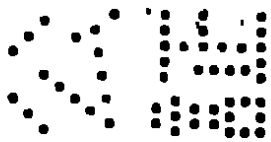
JAPAN

domiciled in

1) 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo 115-8543, Japan

2) 15-45, Mita 2-chome, Minato-ku, Tokyo 108-8345, Japan

all rights inherent to said invention and that the above mentioned
company hereby is enabled to apply, in its name, for the
corresponding patent invention, in the Republic of Colombia



19

Registration No. / 492 , 2006

NOTARIAL CERTIFICATE

I, a Notary Public, do hereby certify that Mr. Tatsuya NAGAI, an agent of Mr. Masato FUJIOKA, Mr. Hirotaka James OKANO, Mr. Kaoru OGAWA, Mr. Hideyuki OKANO and Mr. Sho KANZAKI, has stated that said Mr. Masato FUJIOKA, Mr. Hirotaka James OKANO, Mr. Kaoru OGAWA, Mr. Hideyuki OKANO and Mr. Sho KANZAKI acknowledge themselves to have signed the attached document.

Dated: on this 31st day of August, 2006



Tadahiko Mitsuda
TADAHIKO MITSUDA
NOTARY

認

証

囑託人藤岡正人、岡野ジェイムス洋尚、小川郁、岡野栄之及び神崎晶の代理人永井達也は、本公証人に対し、囑託人が別添文に署名したことを自認している旨陳述した。



よって、これを認証する。

平成18年 8 月 31 日、本公証人役場において
東京都千代田区内幸町2丁目1番1号 霞ヶ関公証役場
東京法務局所属

公証人
Notary

満田忠久



TADAHIKO MITSUDA

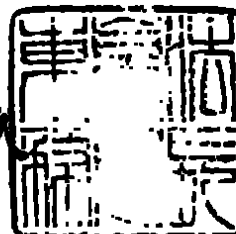
証 明

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18年 8 月 31 日

東京法務局長

戸田信久



APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: JAPAN
This public document
2. has been signed by TADAHIKO MITSUDA
3. acting in the capacity of Notary of the Tokyo Legal Affairs Bureau
4. bears the seal/stamp of TADAHIKO MITSUDA
Certified
5. at Tokyo
6. AUG 31 2006
7. by the Ministry of Foreign Affairs
8. 06- N0 001797
9. Seal/stamp:
10. Signature



K. Oyabe

Kazutoyo OYABE
For the Minister for Foreign Affairs

21

TRADUCCIÓN OFICIAL 224/2006 DE UN DOCUMENTO EN INGLÉS Y EN ESPAÑOL, REALIZADA POR EDUARDO CALADO NOGUERA, TRADUCTOR OFICIAL AUTORIZADO POR RESOLUCIÓN 541 DEL 27 DE FEBRERO DE 1976 POR EL MINISTERIO DE JUSTICIA Y DEBIDAMENTE REGISTRADO ANTE EL MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES DE COLOMBIA. DE ACUERDO CON DICHO DOCUMENTO 1) MASATO FUJIOKA, 2) HIROTAKA JAMES OKANO; 3) KAORU OGAWA; 4) HIDEYUKI OKANO Y SHO KANZAKI, RESIDENTES TODOS EN C/O KEIO UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE, 35, SHINANOMACHI, SHINJUKU-KU, TOKIO 160-8582, JAPÓN DECLARAN BAJO JURAMENTO SER LOS INVENTORES ÚNICOS Y VERDADEROS DE LA INVENCION **AGENTES TERAPÉUTICOS PARA TRASTORNOS DEL OIDO INTERNO, QUE CONTIENEN UN ANTAGONISTA DE IL-6 COMO INGREDIENTE ACTIVO (SOLICITUD INTERNACIONAL PCT/JP2005/0062202)**. ADEMÁS QUE CEDEN SIN RESERVAS NI LIMITACIONES EN FAVOR DE 1) CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA Y 2) KEIO UNIVERSITY, ENTIDADES CONSTITUIDAS Y EXISTENTES DE CONFORMIDAD CON LAS LEYES DE JAPÓN, DOMICILIADAS RESPECTIVAMENTE EN 1) 5-1, UKIMA 5-CHOME, KITA-KU, TOKIO 115-8543, JAPÓN Y 2) 15-45, MITA 2-CHOME, MINATO-KU, TOKIO 108-8345, JAPÓN., TODOS LOS DERECHOS INHERENTES A DICHA INVENCION Y QUE LA CITADA COMPAÑIA QUEDA FACULTADA PARA SOLICITAR EN SU NOMBRE LA PATENTE CORRESPONDIENTE EN LA REPUBLICA DE COLOMBIA. DADO Y FIRMADO EN TOKIO, JAPÓN EL 25 DE AGOSTO DE 2006 POR 1) MASATO FUJIOKA; 2) HIROTAKA JAMES OKANO; 3 KAORA OGAWA; 4) HIDEYUKI OKANO Y 5) SHO KANZAKI

REGISTRO NÚMERO 1492, 2006

CERTIFICACIÓN NOTARIAL

Yo, notario público Por la presente certifico que TATSUYA NAGAL, agente de MASATO FUJIOKA, HIROTAKA JAMES OKANO, KAORU OGAWA, HIDEYUKI OKANO Y SHO KANZAKI ha declarado que dichos MASATO FUJIOKA, HIROTAKA JAMES OKANO, KAORU OGAWA, HIDEYUKI OKANO Y SHO KANZAKI reconocieron haber firmado el documento adjunto. Fechado hoy 31 de agosto de 2006.

FIRMADO: TADAHIKO MITSUDA, notario

122
SELLO: OFICINA DE ASUNTOS JURÍDICOS DE TOKIO, NOTARIO, 1-1,
2CHOME, UCHISAIWAICHO, CHIYODA-KU, TOKIO, JAPÓN.

FIRMADO TADAHIKO MITSUDA, NOTARIO

APOSTILLA

(CONVENCIÓN DE LA HAYA DEL 5 DE OCTUBRE DE 1961)

1. PAÍS: JAPÓN

Este documento público

2. ha sido firmado por TADAHIKO MITSUDA

3. quien actúa en su calidad de NOTARIO DE LA OFICINA DE ASUNTOS
JURÍDICOS DE TOKIO

4. lleva el sello/estampilla DE TADAHIKO MITSUDA

CERTIFICADO

5. en TOKIO 6. el 31 de agosto de 2006

7. por el Ministerio de Asuntos Exteriores

8. 06- no 001797

9. Sello/estampilla: MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, JAPÓN

10. Firma: KAZUTOYO OYABE, A NOMBRE DEL MINISTERIO DE ASUNTOS
EXTERIORES.

COLO-14778-841-002-4

WPCL002G ID.8109

Bogotá, 15 de septiembre de 2006.

Edmundo Calado
Edmundo Calado Riquelme
"TRADUCTOR OFICIAL"
CER - 89423 CUB
Dec. Mi. Febrero de 1991

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

486835
Eduardo Albaladejo
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 SET 18 P 12:37

ues

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

CERTIFICACION

Certifico que el delegado Tatsuya Nagai manifesto ante el suscrito que los señores Masato Fujioka, Hirotake James Okano, Kaoru Ogawa, Hideyuki Okano, y Sho Kanzaki reconocen sus firmas que aparecen en el documento adjunto como legitimamente suya.

**Agosto 31, 2006 En el despacho notarial 2-1-1, Uchisaiwai-Cho, Chiyoda-Ku. Tokio
Notario adscrito al Departamento de Asuntos Juridicos de Tokio.**

Tadahiko Mitsuda -firma y sello oficial-

CERTIFICADO

Certifico que la firma que aparece arriba es del notario adscrito al Departamento de Asuntos Juridicos de Tokio, y su sello estampado es tambien legitimo.

**Agosto 31, 2006 Jefe del Departamento de Asuntos Juridicos de Tokio.
Nobuhisa Toda -sello oficial-**

**La presente traducción oficial se ha efectuado bajo amparo de APOSTILLE
No. 001797 del Ministerio de Asuntos Extranjeros del Japon, y con fecha
Agosto 31, 2006.**

**Traductor Oficial
Japonés - Español
Tsutomu Muramatsu
Resolución No. 908 Mayo 6 1987**

Muramatsu

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

486836

Tzotoma Norantka

CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPEÑA
LAS FUNCIONES INDICADAS

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2009 SET 18 P 12:37

UCS

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

24
24

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 9 月 29 日 (29.09.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/089802 A1

(51) 国際特許分類: A61K 45/00, 39/395, A61P 19/08,
25/02, 37/16, 29/00, 31/12, 35/00, 43/00

義塾大学 医学部内 Tokyo (JP). 神崎 晶 (KANZAKI,
Sho) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町 3 5 地
産産義塾大学 医学部内 Tokyo (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/006202

(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 3 7 森ビ
ル 青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2005 年 3 月 24 日 (24.03.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,
US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-087270 2004 年 3 月 24 日 (24.03.2004) JP
特願2004-268800 2004 年 9 月 15 日 (15.09.2004) 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). 学校法人慶應義塾 (KEIO UNI-
VERSITY) [JP/JP]; 〒1088345 東京都港区三田 2 丁目
1 5 番 4 5 号 Tokyo (JP).

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 藤岡 正人 (FU-
JIOKA, Masato) [JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃
町 3 5 番地 慶應義塾大学 医学部内 Tokyo (JP). 岡野
洋尚 ジェイムス (OKANO, Hirotaka James) [JP/JP]; 〒
1608582 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大学
医学部内 Tokyo (JP). 小川 郁 (OGAWA, Kaoru) [JP/JP];
〒1608582 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應義塾大
学 医学部内 Tokyo (JP). 岡野 栄之 (OKANO, Hideyuki)
[JP/JP]; 〒1608582 東京都新宿区信濃町 3 5 番地 慶應

添付公開書類:
— 国際調査報告書 v

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

(54) Title: THERAPEUTIC AGENT FOR AURIS INTERNA DISORDER CONTAINING IL-6 ANTAGONIST AS ACTIVE IN-
GREDIENT

(54) 発明の名称: IL-6 アンタゴニストを有効成分として含有する内耳障害治療剤

(57) Abstract: A therapeutic and/or preventive agent for auris interna disorder, comprising an IL-6 antagonist, preferably anti-IL-6R
antibody as an active ingredient.

(57) 要約: IL-6 アンタゴニスト、好ましくは抗 IL-6R 抗体を有効成分として含有する内耳障害治療および/または予
防剤。

WO 2005/089802 A1

DESCRIPTION

THERAPEUTIC AGENTS FOR INNER EAR DISORDERS CONTAINING
AN IL-6 ANTAGONIST AS AN ACTIVE INGREDIENT

5

Technical Field

The present invention relates to a therapeutic and/or preventive agent for inner ear disorders. The preventive and/or therapeutic agent of the present invention comprises an interleukin-6 (IL-6) antagonist.

10

Background Art

Among hearing loss, those that result from labyrinthine (cochlear) or retrocochlear (8th cranial nerve) causes are called sensorineural hearing loss. Causes of sensorineural hearing loss are varied, and include, for example, Meniere's disease, drug-induced inner ear disorders (inner ear disorders due to anti-cancer agents such as aminoglycosides and cisplatin), viral inner ear disorders, purulent inner ear disorders, temporal bone fracture and acoustic nerve tumor. Sudden deafness, senile deafness and noise deafness are also among the sensorineural hearing loss. Noise deafness develops when the inner ear is injured by loud noises from chain saws, internal combustion engines, heavy equipment, guns, airplanes and the like, and is associated with gun firing, snow mobiles, air flight, rock concerts and the like.

15

20

25

Various factors are considered to cause sensorineural hearing loss, in which acute immune reactions responses are known to cause permanent hearing loss (Sato H. et al., Laryngoscope. 2002 Sep;112(9):1627-34). In immune responses in the cochlea caused by the injection of keyhole limpet hemocyanin (KLH) into the inner ear or the subarachnoid, it has been reported, TNF- α and IL-1 β have been expressed, TNF- α causes an aggravated disease in the cochlea, and TNF- α inhibitors can partially suppress hearing loss, *ibid*.

30

35

However, there are no reports up to now on the contribution of IL-6 to sensorineural hearing loss.

Non-patent document 1:

Satoh H. et al., Laryngoscope. 2002 Sep;112(9):1627-

5 34

Disclosure of the Invention

The present invention is intended to provide a novel pharmaceutical composition for the treatment and/or prevention of inner ear disorders.

10 After intensive and extensive research, the present inventors have demonstrated that IL-6 is associated with the pathogenesis of sensorineural hearing loss and that IL-6 antagonists have a therapeutic effect on sensorineural hearing loss.

15 Thus the present invention provides a therapeutic and/or preventive agent for sensorineural hearing loss, said agent comprising an IL-6 antagonist as an active ingredient.

20 The above inner ear disorders are for example sensorineural hearing loss which is caused by, for example, Meniere's disease, drug-induced inner ear disorders, viral inner ear disorders, purulent inner ear disorders, temporal bone fracture or acoustic nerve tumor, or they are sudden deafness, senile deafness or noise deafness.

25 Alternatively, the above inner ear disorders are vestibular disorders, and the vestibular disorders are caused by Meniere's disease, vestibular neuronitis or drug-induced inner ear disorders.

30 Said IL-6 antagonist is, for example, an antibody against IL-6 receptor. This IL-6 receptor antibody may be, for example, a monoclonal antibody against IL-6 receptor, preferably a monoclonal antibody against human IL-6 receptor or a monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor. Said monoclonal antibody against human IL-6 receptor is for example PM-1 antibody, and said monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor is for

35

27
27

example MR16-1 antibody.

Said antibody against IL-6 receptor is preferably a recombinant antibody. This recombinant antibody is, for example, a chimeric antibody, a humanized antibody, or a human antibody. This humanized antibody is for example a humanized PM-1 antibody.

The present invention may also be described as follows:

[1] The use of an IL-6 antagonist for the manufacture of a therapeutic and/or preventive agent for inner ear disorders.

[2] The use according to [1] wherein said inner ear disorders are sensorineural hearing loss.

[3] The use according to [2] wherein said sensorineural hearing loss is sensorineural hearing loss caused by Meniere's disease, drug-induced inner ear disorders, viral inner ear disorders, purulent inner ear disorders, temporal bone fracture or acoustic nerve tumor.

[4] The use according to [2] wherein said sensorineural hearing loss is sudden deafness, senile deafness or noise deafness.

[5] The use according to [1] wherein said inner ear disorders are vestibular disorders.

[6] The use according to [5] wherein said vestibular disorders are vestibular disorders caused by Meniere's disease, vestibular neuronitis or drug-induced inner ear disorders.

[7] The use according to any of [1] to [6] wherein said IL-6 antagonist is an antibody against IL-6 receptor.

[8] The use according to [7] wherein said antibody against IL-6 receptor is a monoclonal antibody against IL-6 receptor.

[9] The use according to [8] wherein said antibody against IL-6 receptor is a monoclonal antibody against human IL-6 receptor.

28

[10] The use according to [8] wherein said antibody against IL-6 receptor is a monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor.

5 [11] The use according to any of [7] to [10] wherein said antibody against IL-6 receptor is a recombinant antibody.

[12] The use according to [9] wherein said monoclonal antibody against human IL-6 receptor is PM-1 antibody.

10 [13] The use according to [10] wherein said monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor is MR16-1 antibody.

15 [14] The use according to any of [7] to [13] wherein said antibody against IL-6 receptor is a chimeric antibody, a humanized antibody, or a human antibody against IL-6 receptor.

[15] The use according to [14] wherein said humanized antibody against IL-6 receptor is a humanized PM-1 antibody.

20 The present invention may also be described as follows:

[1] A therapeutic and/or preventive method for inner ear disorders which comprises administering an IL-6 antagonist.

25 [2] The method according to [1] wherein said inner ear disorders are sensorineural hearing loss.

30 [3] The method according to [2] wherein said sensorineural hearing loss is sensorineural hearing loss caused by Meniere's disease, drug-induced inner ear disorders, viral inner ear disorders, purulent inner ear disorders, temporal bone fracture or acoustic nerve tumor.

35 [4] The method according to [2] wherein said sensorineural hearing loss is sudden deafness, senile deafness or noise deafness.

[5] The method according to [1] wherein said inner ear disorders are vestibular disorders.

[6] The method according to [5] wherein said vestibular disorders are vestibular disorders caused by Meniere's disease, vestibular neuronitis or drug-induced inner ear disorders.

5 [7] The method according to any of [1] to [6] wherein said IL-6 antagonist is an antibody against IL-6 receptor.

[8] The method according to [7] wherein said antibody against IL-6 receptor is a monoclonal antibody
10 against IL-6 receptor.

[9] The method according to [8] wherein said antibody against IL-6 receptor is a monoclonal antibody against human IL-6 receptor.

[10] The method according to [8] wherein said
15 antibody against IL-6 receptor is a monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor.

[11] The method according to any of [7] to [10] wherein said antibody against IL-6 receptor is a recombinant antibody.

20 [12] The method according to [9] wherein said monoclonal antibody against human IL-6 receptor is PM-1 antibody.

[13] The method according to [10] wherein said monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor is MR16-1
25 antibody.

[14] The method according to any of [7] to [13] wherein said antibody against IL-6 receptor is a chimeric antibody, a humanized antibody, or a human antibody against IL-6 receptor.

30 [15] The method according to [14] wherein said humanized antibody against IL-6 receptor is a humanized PM-1 antibody.

Brief Explanation of the Drawings

Fig. 1 shows the result of Example 1, and is a graph
35 showing the degree of reduction of hearing threshold level (dB) for the group that received an anti-IL-6R humanized antibody (MR16-1) of the present invention and

the control group that received the mouse immunoglobulin G in the mouse model of hearing loss created using three types of frequencies.

5 Fig. 2 is an electrophoretogram showing the result of RT-PCR in Example 2 indicating changes with time in various cytokines in the cochlea of SD rats after they were subjected to acoustic load.

10 Fig. 3 is a graph showing the result of quantitative RT-PCR in Example 2 indicating changes with time in TNF- α in the cochlea of SD rats after they were subjected to acoustic load.

15 Fig. 4 is a graph showing the result of quantitative RT-PCR in Example 2 indicating changes with time in IL-6 in the cochlea of SD rats after they were subjected to acoustic load.

Fig. 5 is a graph showing the result of quantitative RT-PCR in Example 2 indicating changes with time in IL-1 β in the cochlea of SD rats after they were subjected to acoustic load.

20 Fig. 6 is a photograph substituted for drawings showing the result in which IL-6 was detected with anti-mouse IL-6 antibody using Vectastain ABC kit in the tissue of SD rats six hours after they were subjected to acoustic load in Example 2.

25 Fig. 7 is a photograph substituted for drawings showing the result in which IL-6 was detected with anti-mouse IL-6 antibody using Vectastain ABC kit in the tissue of SD rats six hours after they were subjected to acoustic load in Example 2.

30 Fig. 8 is an electrophoretogram showing the result in which the expression of total STAT3, Erk and Akt, as well as phosphorylated STAT3, Erk and Akt was determined in the inner ear Corti's organ of C57BL/6J mice that received MR16-1 (the anti-IL-6R humanized antibody
35 prepared in Reference Example 4) of the present invention or rat IgG (control) after they were subjected to a very loud sound of 124 dB for two hours.

Best Mode for Carrying out the Invention

The therapeutic agent of the present invention has an effect of suppressing the progression of hearing ability reduction in the tissue damage of the cochlea, i.e. sensorineural hearing loss in the inner ear. Specifically, the therapeutic agent of the present invention has an effect of suppressing hearing ability reduction in the high frequency region in sensorineural hearing loss. As diseases in which damaged hair cells are involved, as in sensorineural hearing loss, there can be mentioned vestibular disorders. In sensorineural hearing loss, the cochlea has been damaged, and the cochlea and the vestibule are responsible for different sensations, but their structures are similar in that hair cells and supporting cells have been covered by the lymph, and their similar tissue constitution and physical properties are responsible for physiological functions. Thus, it has been designed such that a similar mechanism detects different sensations based on the difference whether the hair cells detected sound vibrations or they detected lymph movement by acceleration. Damage to either of the cochlea and the vestibule lead to the reduced function, and sensitivity to drugs is extremely similar. Thus, the therapeutic agent of the present invention is effective for the treatment of inner ear disorders such as sensorineural hearing loss and vestibular disorders.

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

32
32

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

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

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

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

The above IL-6 antagonist is preferably an antibody against IL-6 receptor, preferably a monoclonal antibody against human IL-6 receptor or a monoclonal antibody

against mouse IL-6 receptor. As the above monoclonal antibody against human IL-6 receptor, there can be illustrated PM-1 antibody, and as the above monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor, there can be
 5 illustrated MR16-1 antibody. The above antibody is preferably a chimeric antibody, a humanized antibody or a human antibody, for example a humanized PM-1 antibody. A humanized antibody is an altered antibody also referred to as a reshaped human antibody.

10 IL-6 antagonists for use in the present invention may be of any origin, any kind, and any form, as long as they are useful for the treatment and/or prevention of inner ear disorders.

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

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

Examples of such antibodies include MH166 (Matsuda

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

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

 Specifically, anti-IL-6 antibody may be obtained in
15 the following manner. For example, a human IL-6 for use as the sensitizing antigen to obtain antibody can be obtained using the IL-6 gene/amino acid sequence disclosed in Eur. J. Biochem (1987) 168, 543-550, J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541, or Argic. Biol. Chem.
20 (1990) 54, 2685-2688.

 After a suitable host cell is transformed by inserting the IL-6 gene sequence into a known expression vector system, the IL-6 protein of interest is purified from the host cell or the culture supernatant thereof,
25 and the purified IL-6 protein can be used as the sensitizing antigen. Alternatively, a fusion protein of the IL-6 protein and another protein may be used as the sensitizing antigen.

 Anti-IL-6 receptor antibodies for use in the present
30 invention can be obtained as polyclonal or monoclonal antibodies using a known method. As the anti-IL-6 receptor antibodies for use in the present invention, monoclonal antibodies of, in particular, mammalian origin are preferred. Monoclonal antibodies of a mammalian
35 origin include those produced by a hybridoma and those produced by a host which has been transformed with an expression vector containing genetically engineered

antibody genes. The antibodies, via binding to IL-6 receptor, inhibit the binding of IL-6 to IL-6 receptor, and thereby block the transduction of the biological activity of IL-6 into the cell.

5 Examples of such 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. Immunol. (1989) 143, 2900-2906), or AUK12-20 antibody, AUK64-7 antibody or AUK146-15 antibody (International
10 Patent Publication WO 92-19759) and the like. Among them, PM-1 antibody is most preferred.

 Incidentally, the hybridoma cell line which produces PM-1 antibody has been internationally deposited under the provisions of the Budapest Treaty as PM-1 on July 12,
15 1989 with the Patent Microorganism Depository of National Institute of Industrial Science and Technology at Chuo 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japan, as FERM BP-2998. The hybridoma cell line which produces MR16-1 antibody has been internationally deposited under
20 the provisions of the Budapest Treaty as MR16-1 on March 13, 1997 with the Patent Microorganism Depository of National Institute of Industrial Science and Technology at Chuo 6, 1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japan, as FERM BP-5875.

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

35 Specifically, anti-IL-6 receptor antibody may be prepared in the following manner. For example, the human IL-6 receptor used as the sensitizing antigen for

obtaining antibody can be obtained using the IL-6
receptor gene sequence/amino acid sequence disclosed in
European Patent Application EP 325474, and the mouse IL-6
receptor can be obtained using the IL-6 receptor gene
disclosed in Japanese Unexamined Patent Publication
5 (Kokai) 3-155795.

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

After the gene sequence of IL-6 receptor is inserted
into a known expression vector system to transform an
appropriate host cell, the desired IL-6 receptor protein
may be purified from the host cell or a culture
25 supernatant thereof using a known method, and the
purified IL-6 receptor protein may be used as the
sensitizing antigen. Alternatively, cells that are
expressing IL-6 receptor or a fusion protein of the IL-6
receptor protein and another protein may be used as the
30 sensitizing antigen.

Escherichia coli (E. coli) that has a plasmid
pIBIBSF2R containing cDNA encoding human IL-6 receptor
has been internationally deposited under the provisions
of the Budapest Treaty as HB101-pIBIBSF2R on January 9,
35 1989 with the Patent Microorganism Depository of National
Institute of Industrial Science and Technology at Chuo 6,
1-1, Higashi 1-chome, Tsukuba city, Ibaraki pref., Japan,

as FERM BP-2232.

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

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

An anti-gp130 monoclonal antibody-producing hybridoma can be basically created using a known procedure as described below. Thus, gp130 may be used as a sensitizing antigen and is immunized in the conventional method of immunization. The immune cells thus obtained are fused with known parent cells in the conventional cell fusion process, and then the monoclonal antibody-producing hybridomas are screened by the conventional screening method to prepare the desired hybridoma.

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

After a suitable host cell is transformed by inserting the gp130 gene sequence into a known expression

vector system, the gp130 protein of interest is purified from the host cell or from the culture supernatant thereof in a conventional method. The purified gp130 receptor protein can be used as the sensitizing antigen.

5 Alternatively, a fusion protein of the gp130 protein and another protein may be used as the sensitizing antigen.

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

Immunization of animals with a sensitizing antigen is carried out using a known method. A general method,
15 for example, involves the intraperitoneal or subcutaneous injection of a sensitizing antigen to the mammal. Specifically, a sensitizing antigen which has been diluted and suspended in an appropriate amount of phosphate buffered saline (PBS) or physiological saline
20 etc. is mixed, as desired, with an appropriate amount of a common adjuvant, for example Freund's complete adjuvant. After being emulsified, it is preferably administered to a mammal several times every 4 to 21 days. Alternatively a suitable carrier may be used at
25 the time of immunization of the sensitizing antigen.

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

The mammalian myeloma cells as the other parent cells which are fused with the above-mentioned immune cells preferably include various known cell lines such as
35 P3X63Ag8.653 (Kearney, J. F. et al., J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1

(Kohler, G. and Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, D.H. et al., Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276, 269-270), FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35; 1-21), S194 (Trowbridge, I.S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323), R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277; 131-133) and the like.

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

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

The preferred ratio of the immune cells and the myeloma cells to be used is, for example, 1 to 10 times more immune cells than the myeloma cells. Examples of culture media to be used for the above cell fusion include RPMI1640 medium and MEM culture medium suitable for the growth of the above myeloma cell lines, and the conventional culture medium used for this type of cell culture and, besides, a serum supplement such as fetal calf serum (FCS) may be added.

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

centrifugation to remove the supernatant, cell fusion agents etc. which are undesirable for the growth of the hybridoma can be removed.

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

15 In addition to obtaining the above hybridoma by immunizing an animal other than the human with an antigen, it is also possible to sensitize human lymphocytes in vitro with a desired antigen protein or
20 sensitized B lymphocytes are fused with human myeloma cells, for example U266, to obtain the desired human antibody having the activity of binding to the desired antigen or the desired antigen-expressing cells (see Japanese Post-examined Patent Publication (Kokoku) No. 1-
25 59878). Furthermore, a transgenic animal having a repertoire of all human antibody genes is immunized with the antigen or the antigen-expressing cells to obtain the desired human antibody in the method described above (see International Patent Publication WO 93/12227, WO
30 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 and WO 96/33735).

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

In order to obtain monoclonal antibodies from said hybridoma, a method can be used in which said hybridoma

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

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

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

Specifically, mRNA encoding the variable (V) region of the desired antibody is isolated from antibody-producing cells such as a hybridoma. The isolation of

mRNA is conducted by preparing total RNA using, for example, a known method such as the guanidine ultracentrifuge method (Chirgwin, J.M. et al., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299), the AGPC method (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159), and then mRNA is prepared from the total RNA using the mRNA Purification kit (manufactured by Pharmacia) and the like. Alternatively, mRNA can be directly prepared using the QuickPrep mRNA Purification Kit (manufactured by Pharmacia).

cDNA of the V region of antibody may be synthesized from the mRNA thus obtained using a reverse transcriptase. cDNA may be synthesized using the AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit and the like. Alternatively, for the synthesis and amplification of cDNA, the 5'-Ampli FINDER RACE Kit (manufactured by Clontech) and the 5'-RACE method (Frohman, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) that employs polymerase chain reaction (PCR) may be used. The desired DNA fragment is purified from the PCR product obtained and may be ligated to vector DNA. Moreover, a recombinant vector is constructed therefrom and then is introduced into E. coli etc., from which colonies are selected to prepare the desired recombinant vector. The base sequence of the desired DNA may be confirmed by a known method such as the dideoxy method.

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

In order to produce the antibody for use in the present invention, the antibody gene is integrated as

described below into an expression vector so as to be expressed under the control of the expression regulatory region, for example an enhancer and/or a promoter. Subsequently, the expression vector may be transformed
5 into a host cell and the antibody can then be expressed therein.

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

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

For example, a plasmid that contains DNA encoding the L chain V region or the H chain V region of chimeric PM-1 antibody was designated as pPM-k3 or pPM-h1,
25 respectively, and E. coli having the plasmid has been internationally deposited under the provisions of the Budapest Treaty as NCIMB 40366 and NCIMB 40362, respectively, on February 12, 1991 with the National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited.

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

Patent Publication WO 92-19759).

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

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

For example, for chimeric antibody or humanized antibody, the C region of human antibody is used. As the C region of human antibody, there can be mentioned Cy, and Cy1, Cy2, Cy3, and Cy4, for example, can be used. The C region of human antibody may be modified to improve the stability of antibody or the production thereof.

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

As a preferred embodiment of the humanized antibody for use in the present invention, there can be mentioned

humanized PM-1 antibody (see International Patent Publication WO 92-19759).

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

20 Antibody genes constructed as described above may be expressed and obtained in a known method. In the case of mammalian cells, expression may be accomplished using a vector containing a commonly used useful promoter, the antibody gene to be expressed, DNA in which the poly A signal has been operably linked at 3' downstream thereof
25 or a vector containing said DNA. Examples of the promoter/enhancer include human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer.

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

35 For example, expression may be readily accomplished by the method of Mulligan et al. (Mulligan, R. C. et al., Nature (1979) 277, 108-114) when SV40 promoter/enhancer

is used, or by the method of Mizushima et al. (Mizushima, S. and Nagata, S., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) when HEFl α promoter/enhancer is used.

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

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

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

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

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

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

By introducing via transformation the gene of the desired antibody into these cells and culturing the transformed cells in vitro, the antibody can be obtained. Culturing is conducted in the known methods. For example, as the culture liquid, DMEM, MEM, RPMI1640, and IMDM can be used, and serum supplements such as fetal calf serum (FCS) may be used in combination. In addition, antibodies may be produced in vivo by implanting cells into which the antibody gene has been introduced into the abdominal cavity of an animal and the like.

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

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

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

When silkworms are used, baculovirus into which the desired antibody gene has been inserted is infected to the silkworm, and the desired antibody can be obtained from the body fluid of the silkworm (Maeda, S. et al., Nature (1985) 315, 592-594). Moreover, when tobacco is used, the desired antibody gene is inserted into an expression vector for plants, for example pMON 530, and then the vector is introduced into a bacterium such as *Agrobacterium tumefaciens*. The bacterium is then infected to tobacco such as *Nicotiana tabacum* to obtain the desired antibody from the leaves of the tobacco (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138).

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

Publication WO 94-11523).

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

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

scFv can be obtained by ligating the V region of H chain and the V region of L chain of antibody. In scFv, the V region of H chain and the V region of L chain are preferably ligated via a linker, preferably a peptide linker (Huston, J.S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA
25 (1988) 85, 5879-5883). The V region of H chain and the V region of L chain in scFv may be derived from any of the above-mentioned antibodies. As the peptide linker for ligating the V regions, any single-chain peptide comprising, for example, 12-19 amino acid residues may be
30 used.

DNA encoding scFv can be obtained using DNA encoding the H chain or the H chain V region of the above antibody and DNA encoding the L chain or the L chain V region of the above antibody as the template by amplifying the
35 portion of the DNA encoding the desired amino acid sequence among the above sequences by the PCR technique with the primer pair specifying the both ends thereof,

and by further amplifying the combination of DNA encoding the peptide linker portion and the primer pair which defines that both ends of said DNA be ligated to the H chain and the L chain, respectively.

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

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

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

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

 Separation and purification of the antibody for use
35 in the present invention may be accomplished by combining, as appropriate, chromatography other than the above-mentioned affinity chromatography, filtration,

ultrafiltration, salting-out, dialysis and the like. Chromatography includes, for example, ion exchange chromatography, hydrophobic chromatography, gel-filtration and the like. These chromatographies can be applied into high performance liquid chromatography (HPLC). Alternatively, reverse-phase HPLC can be used.

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

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

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

of IL-6 and, thereby, it blocks signal transduction by IL-6.

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

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

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

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

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

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

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

Preparation of the IL-6 partial peptide or the IL-6 receptor partial peptide by the peptide synthesis method can be effected using a method commonly used in peptide synthesis such as the solid phase synthesis or the liquid phase synthesis.

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

reaction in which said protecting group of the α -amino group of the amino acid or the peptide coupled to the resin is eliminated are alternately repeated to elongate the peptide chain. The solid phase peptide synthesis methods are divided into the Boc method and the Fmoc method depending on the type of protecting group to be used.

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

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

Specific examples of the IL-6 partial peptide or the IL-6 receptor partial peptide are disclosed in Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) 2-188600, Japanese Unexamined Patent Publication (Kokai) 7-324097, Japanese

Unexamined Patent Publication (Kokai) 8-311098, and United States Patent Publication US 5210075.

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

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

As described in the Example below, anti-IL-6 receptor antibody exhibited a therapeutic effect on inner ear disorders, suggesting that IL-6 antagonists such as
25 anti-IL-6 receptor antibody are effective as a therapeutic agent for inner ear disorders.

The subject to be treated in the present invention is mammals. The subject mammal to be treated is preferably humans.

30 The preventive or therapeutic agents of the present invention may be administered, either orally or parenterally, systemically or locally. For example, intravenous injection such as drip infusion, intramuscular injection, intrapleural injection,
35 intraperitoneal injection, subcutaneous injection, suppositories, intestinal lavage, oral enteric coated tablets, and the like can be selected, and the method of

administration may be chosen, as appropriate, depending on the age and the condition of the patient. The effective dosage is chosen from the range of 0.01 mg to 100 mg per kg of body weight per administration.

5 Alternatively, the dosage in the range of 1 to 1000 mg, preferably 5 to 50 mg per patient may be chosen.

Preferred dosages and preferred methods of administration are such that, in the case of anti-IL-6 receptor antibody, the amounts wherein free antibody is present in the blood are effective dosages. In specific examples, 0.5 mg to 40 mg per kg of body weight, preferably 1 mg to 20 mg, per month (4 weeks) are administered in one to several doses, for example in the administration schedule of twice per week, once per week, 10 once every two weeks, once every four weeks and the like by intravenous injection such as drip infusion and subcutaneous injection. The administration schedule can be adjusted by observing the disease conditions and blood levels of laboratory tests by, for example, extending the administration interval from twice per week or once per 15 week to once per two weeks, once per three weeks, once per four weeks, and the like.

The preventive and/or therapeutic agents for inner ear disorders of the present invention may contain 25 pharmaceutically acceptable carriers or additives depending on the route of administration. Examples of such carriers or additives include water, a pharmaceutical acceptable organic solvent, collagen, polyvinyl alcohol, polyvinylpyrrolidone, a carboxyvinyl 30 polymer, carboxymethylcellulose sodium, polyacrylic sodium, sodium alginate, water-soluble dextran, carboxymethyl starch sodium, pectin, methyl cellulose, ethyl cellulose, xanthan gum, gum Arabic, casein, gelatin, agar, diglycerin, propylene glycol, polyethylene glycol, Vaseline, paraffin, stearyl alcohol, stearic 35 acid, human serum albumin (HSA), mannitol, sorbitol, lactose, a pharmaceutically acceptable surfactant and the

like. Additives used are chosen from, but not limited to, the above or combinations thereof depending on the dosage form.

Examples

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

Example 1

10 Experimental procedure

(1) Measurement of hearing ability of mice before acoustic load

15 For 4 week-old male C57BL/6J mice, hearing ability by the auditory brainstem response (ABR) was measured on the day before acoustic load. Before measurement, xyladine and ketamine were intraperitoneally injected to effect sufficiently deep anesthesia, and during measurement additional anesthesia with ketamine was conducted as needed.

20 (Auditory Brain-evoked Response) To know the magnification of noise induced hearing loss in this noise condition, we tested the threshold shift with auditory brainevoked response (ABR). ABR measurements were performed using waveform storing and stimulus control of
25 Scope software of PowerLab system (model: PowerLab2/20, ADInstruments CastleHill, Australia), EEG recording with extracellular amplifier Digital Bioamp system (model: BAL-1, Tucker-Davis Technologies FL/USA). Sound stimuli were produced by a coupler type speaker (model: ES1spc,
30 BioResearchCenter Nagoya/Japan) inserted into the external auditory canal of mice. Tone burst stimuli, 0.1ms rise/fall time (cosine gate) and 1ms flat segment, were generated and the amplitude were specified by sound generator and attenuation Real-Time Processor and
35 Programable Attenuator (model: RP2.1 and PA5, Tucker-Davis Technologies FL/USA). Sound level calibration were done using Sound Level Meter (model: LA-5111, Ono Sokki

Yokohama/Japan). For recording, stainless steel needle electrodes were placed at the vertex and ventro-lateral to the left and right ears. Generally, ABR waveforms were recorded for 12.8 ms at a sampling rate of 40,000 Hz using 50-5000 Hz bandpass filter settings, waveforms from 256 stimuli at a frequency of 9 Hz were averaged. ABR waveforms were recorded in 5-dB SPL intervals down from a maximum amplitude until no waveform could be visualized. Frequencies of sounds given for the measurement of hearing ability threshold level were three types of 4 kHz, 12 kHz and 20 kHz, and the hearing ability threshold level of each was measured.

(2) Creation of hearing loss model

In an acoustic load instrument (an instrument in which the masking noise of the RION Audiometry AA67N was used as the sonifier, and as the amplifier a SONY SRP-P150 and a FOSTEX D-1405 were used for amplification, and then loaded with a speaker having a diameter of about 12 cm in a closed space), mice were housed in a metal-mesh cage with a height of 3 cm that was allowed to stand directly, at a distance of 1 cm, under the speaker. The cage was radially compartmentalized by metal nets with similar properties, and four animals were simultaneously housed in separate chambers. Then, under the condition that had previously been set up to provide a sound pressure of 124 ± 1 db in the acoustic load instrument (a plurality of measurements during the two hour loading by a CASELA CEL-231), the animals were subjected to a load of a very loud sound for two hours. The acoustic load used was 4 kHz SPL Octave band noise. Also, a thermometer was placed in the acoustic load instrument to determine the temperature before and after the acoustic load.

(3) Drug administration

After the above (2), the animals were divided into two groups (A and B), and 2 mg/body of IgG and 2 mg/body of MR16-1 (the anti-IL-6R humanized antibody prepared in

Reference Example 4) were immediately given to the rats of each group. The administration was set as a blind test, and the technicians were informed of the administration in each group until the end of measurement of hearing ability.

(4) Measurement of hearing ability threshold level

In a manner similar to the above (1), hearing ability was measured one week after acoustic load and drug administration. After confirming deep anesthesia, the mice after measurement were decapitated to extract the temporal bone, which was fixed and then stored for histological examination.

(5) Analysis of results

The difference between the hearing ability obtained in the above (4) and the hearing ability before treatment obtained in the above (1) was taken for each individual, and the degree of reduction in the hearing ability threshold level (dB) was calculated. The mean degree of reduction in the hearing ability threshold level (dB) was calculated for each of the MR16-1-administration group and the control group for each frequency.

Results

For one animal that died at the time of anesthesia in the above (4), the hearing ability could not be measured, and thus it was excluded. The number of animals for which the degree of hearing ability threshold level was obtained was n=4 for the MR16-1-administration group, and n=2 for the IgG-administration group. The temperature in the acoustic load instrument was 25°C before the load and 27°C after the load. The results are shown in the following Table 1 and Fig. 1.

Table 1

Frequency used	IgG-administration control group	MR16-1-administration group	Difference in changes in the threshold level
4 kHz	22.5	37.5	-15
12 kHz	35	27.5	+ 7.5
20 kHz	55	28.8	+26.3

Discussion

Acoustic trauma is a physical external force that is called sound pressure, and thus the model used in this experiment is considered to be a physical tissue-damaged model of the cochlea. In this experiment, very loud sounds centering on a frequency of 4 kHz have been applied. In the cochlea, sensors that perceive sounds are spatially dispersed depending on the frequency (tonotropic), and thus the fact that the hearing ability reduction in the control group is significant at 4 kHz and it becomes smaller as it becomes away therefrom to the high frequency region may be accounted for by the fact that since the very loud sound was loaded at the 4 kHz region the tissue nearer to the region is more severely damaged.

On the other hand, in the IL-6 receptor antibody-administration group, at 12 kHz and 20 kHz, the reduction in hearing ability has been more suppressed as compared to the control group as it becomes further away from the site wherein the very loud sound was loaded and the tissue was directly damaged. The foregoing suggests that IL-6 receptor antibody has an effect of suppressing the special progression of hearing ability reduction in the tissue damage in the cochlea, i.e. sensorineural hearing loss in the inner ear disorders, or has an effect of suppressing the hearing ability reduction in the high frequency region in sensorineural hearing loss.

Example 2. The expression of inflammatory cytokines in the cochlea after acoustic trauma

A hearing loss model was created using 3-4 week-old male SD rats by a method similar to Example 1. At 3 hours, 6 hours, 12 hours, 24 hours, 3 days, 5 days, 7 days and 28 days after acoustic load, the temporal bone was extracted from each rat. While taking care to prevent the lymph in the cochlea from leaking, the cochlea was only extracted, and the expression of various inflammatory cytokines was determined by the RT-PCR method. The result is shown in Fig. 2. As can be seen from Fig. 2, in the cochlea of the acoustic trauma model, elevated expression was noted of TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-1 receptor antagonist (IL-1RA) and IL-6. On the other hand, no expression of IL-12p40 or GM-CSF was noted.

Then, changes in TNF- α , IL-6 and IL-1 β with time were determined by a quantitative RT-PCR method. The quantitative RT-PCR method employed 18S rRNA as an internal control (reference gene) and analyzed the data by the $\Delta\Delta C_t$ method. The results are shown in Fig. 3 to Fig. 5. As can be seen from Fig. 3 to Fig. 5, the expression of TNF- α , IL-1 β and IL-6 was noted indicating the peak of the amount expressed in early stages within 24 hours after acoustic trauma.

Also, using the tissue at six hours after acoustic load, the lyophilized sections were immunohistologically stained. The animals used were SD rats, a hearing loss model was created as in Example 1, and the animals were decapitated six hours after the noise load. After extracting the temporal bone immediately, it was fixed in 4% paraformaldehyde for six hours, and demineralized with a 0.5 mol/l EDTA solution to obtain a sample, which was rapidly frozen in liquid nitrogen and sliced at a thickness of 7 μ m using the cryostat (CM3000, Leica) to obtain a lyophilized section. The section was immunohistologically stained. The stain used the Vectastain ABC kit, and the DAB solution was used to develop color. As the stain control, a stain performed

without adding the primary antibody was adopted. The results are shown in Fig. 6 to Fig. 7. As can be seen from Fig. 6 to Fig. 7, in the cochlea at six hours after acoustic load, the expression of IL-6 was noted in the basement membrane directly under the cochlear lateral wall and Corti's organ.

5 Example 3. Confirmation of efficacy of systemic administration of an IL-6 antagonist

10 In a manner similar to Example 1, male C57BL/6J mice were subjected to a load of a very loud sound of 124 dB for two hours, immediately followed by the intraperitoneal administration of MR16-1 at 2 mg/body and rat IgG at 2 mg/body. Eight hours after the administration of the antibody, the temporal bone was
15 extracted and bilateral inner ears were extracted to dissect Corti's organ, which were divided into the first rotation (apex) and the second rotation (basal), and each of them was collected from both the left and the right, and combined. Using the Western blot method, the
20 expression of total STAT3, Erk and Akt, and phosphorylated STAT3, Erk and Akt was determined. The result is shown in Fig. 8. As can be seen from Fig. 8, the signals of phosphorylated STAT3, phosphorylated Erk and phosphorylated Akt that were strongly noted in the
25 control group were suppressed in the MR16-1-administration group. This result confirmed that the systemically administered MR16-1 exhibits efficacy in the cochlea.

30 This result and the result in Example 2 suggest that the effect by MR16-1 of suppressing IL-6 signals expressed in the cochlea soon after acoustic trauma contributes to the action mechanism of suppressing the hearing ability reduction by the intraperitoneal administration of MR16-1 shown in Example 1.

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

 Soluble IL-6 receptor was prepared by the PCR method

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

In order to express the cDNA of soluble IL-6 receptor in CHO cells, it was ligated to a plasmid pSV (manufactured by Pharmacia) to obtain a plasmid pSVL344. The cDNA of soluble IL-6 receptor that was cleaved with Hind III-Sal I was inserted to plasmid pECEdhfr containing the cDNA of dhfr to obtain a plasmid pECEdhfr344 that can be expressed in the CHO cells.

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

The selected CHO cells were screened by the limiting dilution method to obtain a single CHO cell clone. The CHO cell clone was amplified in 20 nM - 200 nM methotrexate (MTX) to obtain a CHO cell line 5E27 that produces human soluble IL-6 receptor. The CHO cell line 5E27 was cultured in an Iscov-modified Dulbecco's medium

(IMDM, manufactured by Gibco) containing 5% FBS. The culture supernatant was collected and the concentration of soluble IL-6 receptor in the culture supernatant was determined by ELISA. The result confirmed that soluble IL-6 receptor is present in the culture supernatant.

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

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

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

30 After washing it in PBS, 100 µl of the hybridoma culture supernatant was added to each well, and then was incubated overnight at 4 °C. The plate was washed, ¹²⁵I-labeled recombinant IL-6 was added to each well to a concentration of 2000 cpm/0.5 ng/well, and then radioactivity of each well after washing was determined by a gamma counter (Beckman Gamma 9000, Beckman

Instruments, Fullerton, CA). Of 216 hybridoma clones, 32 were positive in the IL-6 binding assay. From these clones, stable MH166.BSF2 was finally obtained. Anti-IL-6 antibody MH166 produced by said hybridoma has a subtype of IgG1 κ .

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

As a result, MH166 antibody inhibited, in a dose dependent manner, the incorporation of ^{3} H-thymidine of MH60.BSF2 cells induced by IL-6. This revealed that MH166 antibody neutralizes the activity of IL-6.

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

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

six times with the digitonin buffer to prepare the partially purified IL-6 receptor to be used for immunization.

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

0.05 ml of the hybridoma culture supernatant was mixed with 0.01ml of Protein G Sepharose (manufactured by Pharmacia). After washing, Sepharose was incubated with 0.005 ml ^{35}S -labeled IL-6 receptor solution prepared as described above. The immunoprecipitate was analyzed by SDS-PAGE to investigate the hybridoma culture supernatant that reacts with IL-6 receptor. As a result, a reaction-positive hybridoma clone PM-1 (FERM BP-2998) was established. The antibody produced from the hybridoma PM-1 has a subtype of IgG1k.

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

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

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

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

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

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

20 The mouse soluble IL-6 receptor (50 µg) thus obtained was mixed with Freund's complete adjuvant, which was then injected to the abdomen of Wistar rats. From two weeks after the administration, the animals were boosted with Freund's incomplete adjuvant. On day 45, rat spleen cells were harvested, and about 2 × 10⁸ cells thereof were fused with 1 × 10⁷ mouse myeloma cells P3U1 using a 50% PEG1500 (manufactured by Boehringer Mannheim) according to the conventional method, and then were screened by the HAT culture medium.

30 After the hybridoma culture supernatant was added to the plate coated with rabbit anti-rat IgG antibody (manufactured by Cappel), mouse soluble IL-6 receptor reacted. Subsequently, using rabbit anti-mouse IL-6 receptor antibody and alkaline phosphatase-labeled sheep

35

anti-rabbit IgG, hybridomas producing antibody directed against mouse soluble IL-6 receptor were screened by ELISA. Hybridoma clones for which antibody production was confirmed were subscreened twice to obtain a single hybridoma clone. The clone was designated as MR16-1.

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

Thus, it was demonstrated that the antibody produced by the hybridoma MR16-1 (FERM BP-5875) inhibits the binding of IL-6 to IL-6 receptor.

CLAIMS

1. A therapeutic and/or preventive agent for inner ear disorders comprising an IL-6 antagonist as an active ingredient.

5 2. The therapeutic and/or preventive agent according to claim 1 wherein said inner ear disorders are sensorineural hearing loss.

 3. The therapeutic and/or preventive agent according to claim 2 wherein said sensorineural hearing
10 loss is sensorineural hearing loss caused by Meniere's disease, drug-induced inner ear disorders, viral inner ear disorders, purulent inner ear disorders, temporal bone fracture or acoustic nerve tumor.

 4. The therapeutic and/or preventive agent
15 according to claim 2 wherein said sensorineural hearing loss is sudden deafness, senile deafness or noise deafness.

 5. The therapeutic and/or preventive agent according to claim 1 wherein said inner ear disorders are
20 vestibular disorders.

 6. The therapeutic and/or preventive agent according to claim 5 wherein said vestibular disorders are vestibular disorders caused by Meniere's disease, vestibular neuronitis or drug-induced inner ear
25 disorders.

 7. The therapeutic and/or preventive agent according to any one of claims 1 to 6 wherein said IL-6 antagonist is an antibody against IL-6 receptor.

 8. The therapeutic and/or preventive agent
30 according to claim 7 wherein said antibody against IL-6 receptor is a monoclonal antibody against IL-6 receptor.

 9. The therapeutic and/or preventive agent according to claim 8 wherein said antibody against IL-6 receptor is a monoclonal antibody against human IL-6
35 receptor.

 10. The therapeutic and/or preventive agent according to claim 8 wherein said antibody against IL-6

receptor is a monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor.

11. The therapeutic and/or preventive agent according to any one of claims 7 to 10 wherein said
5 antibody against IL-6 receptor is a recombinant antibody.

12. The therapeutic and/or preventive agent according to claim 9 wherein said monoclonal antibody against human IL-6 receptor is PM-1 antibody.

13. The therapeutic and/or preventive agent
10 according to claim 10 wherein said monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor is MR16-1 antibody.

14. The therapeutic and/or preventive agent according to any one of claims 7 to 13 wherein said antibody against IL-6 receptor is a chimeric antibody, a
15 humanized antibody, or a human antibody against IL-6 receptor.

15. The therapeutic and/or preventive agent according to claim 14 wherein said humanized antibody against IL-6 receptor is a humanized PM-1 antibody.

20 16. The use of an IL-6 antagonist for the manufacture of a preventive and/or therapeutic agent for inner ear disorders.

17. The use according to claim 16 wherein said inner ear disorders are sensorineural hearing loss.

25 18. The use according to claim 17 wherein said sensorineural hearing loss is sensorineural hearing loss caused by Meniere's disease, drug-induced inner ear disorders, viral inner ear disorders, purulent inner ear disorders, temporal bone fracture or acoustic nerve
30 tumor.

19. The use according to claim 17 wherein said sensorineural hearing loss is sudden deafness, senile deafness or noise deafness.

35 20. The use according to claim 16 wherein said inner ear disorders are vestibular disorders.

21. The use according to claim 20 wherein said vestibular disorders are vestibular disorders caused by

Meniere's disease, vestibular neuronitis or drug-induced inner ear disorders.

22. The use according to any one of claims 16 to 21 wherein said IL-6 antagonist is an antibody against IL-6 receptor.

23. The use according to claim 22 wherein said antibody against IL-6 receptor is a monoclonal antibody against IL-6 receptor.

24. The use according to claim 23 wherein said antibody against IL-6 receptor is a monoclonal antibody against human IL-6 receptor.

25. The use according to claim 23 wherein said antibody against IL-6 receptor is a monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor.

26. The use according to any one of claims 22 to 25 wherein said antibody against IL-6 receptor is a recombinant antibody.

27. The use according to claim 24 wherein said monoclonal antibody against human IL-6 receptor is PM-1 antibody.

28. The use according to claim 25 wherein said monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor is MR16-1 antibody.

29. The use according to any one of claims 22 to 28 wherein said antibody against IL-6 receptor is a chimeric antibody, a humanized antibody, or a human antibody against IL-6 receptor.

30. The use according to claim 29 wherein said humanized antibody against IL-6 receptor is a humanized PM-1 antibody.

31. A therapeutic and/or preventive method for inner ear disorders of a subject which comprises administering an IL-6 antagonist to the subject.

32. The therapeutic and/or preventive method according to claim 31 wherein said inner ear disorders are sensorineural hearing loss.

33. The therapeutic and/or preventive method

according to claim 32 wherein said sensorineural hearing loss is sensorineural hearing loss caused by Meniere's disease, drug-induced inner ear disorders, viral inner ear disorders, purulent inner ear disorders, temporal bone fracture or acoustic nerve tumor.

34. The therapeutic and/or preventive method according to claim 32 wherein said sensorineural hearing loss is sudden deafness, senile deafness or noise deafness.

35. The therapeutic and/or preventive method according to claim 31 wherein said inner ear disorders are vestibular disorders.

36. The therapeutic and/or preventive method according to claim 35 wherein said vestibular disorders are vestibular disorders caused by Meniere's disease, vestibular neuronitis or drug-induced inner ear disorders.

37. The therapeutic and/or preventive method according to any one of claims 31 to 36 wherein said IL-6 antagonist is an antibody against IL-6 receptor.

38. The therapeutic and/or preventive method according to claim 37 wherein said antibody against IL-6 receptor is a monoclonal antibody against IL-6 receptor.

39. The therapeutic and/or preventive method according to claim 38 wherein said antibody against IL-6 receptor is a monoclonal antibody against human IL-6 receptor.

40. The therapeutic and/or preventive method according to claim 38 wherein said antibody against IL-6 receptor is a monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor.

41. The therapeutic and/or preventive method according to any one of claims 37 to 40 wherein said antibody against IL-6 receptor is a recombinant antibody.

42. The therapeutic and/or preventive method according to claim 39 wherein said monoclonal antibody against human IL-6 receptor is PM-1 antibody.

73
73

43. The therapeutic and/or preventive method according to claim 40 wherein said monoclonal antibody against mouse IL-6 receptor is MR16-1 antibody.

5 44. The therapeutic and/or preventive method according to any one of claims 37 to 43 wherein said antibody against IL-6 receptor is a chimeric antibody, a humanized antibody, or a human antibody against IL-6 receptor.

10 45. The therapeutic and/or preventive method according to claim 44 wherein said humanized antibody against IL-6 receptor is a humanized PM-1 antibody.

74

ABSTRACT

5 A therapeutic and/or preventive agent for inner ear disorders comprising an IL-6 antagonist, preferably an anti-IL-6R antibody, as an active ingredient.

1/7

Fig.1

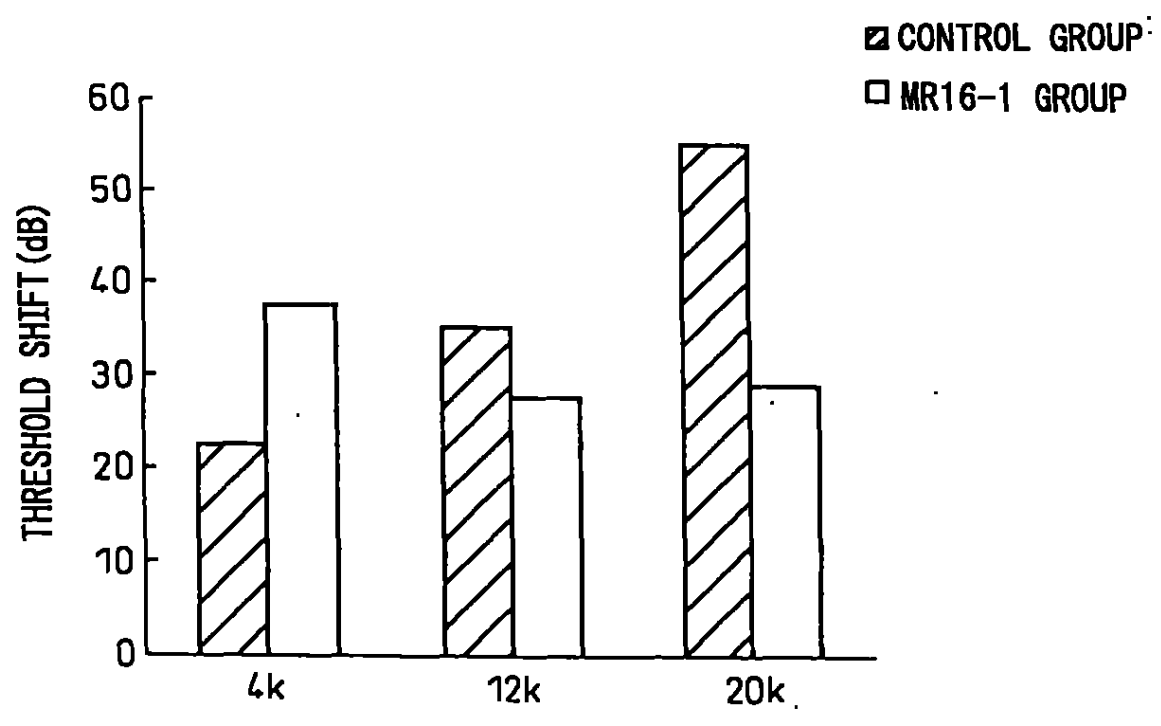
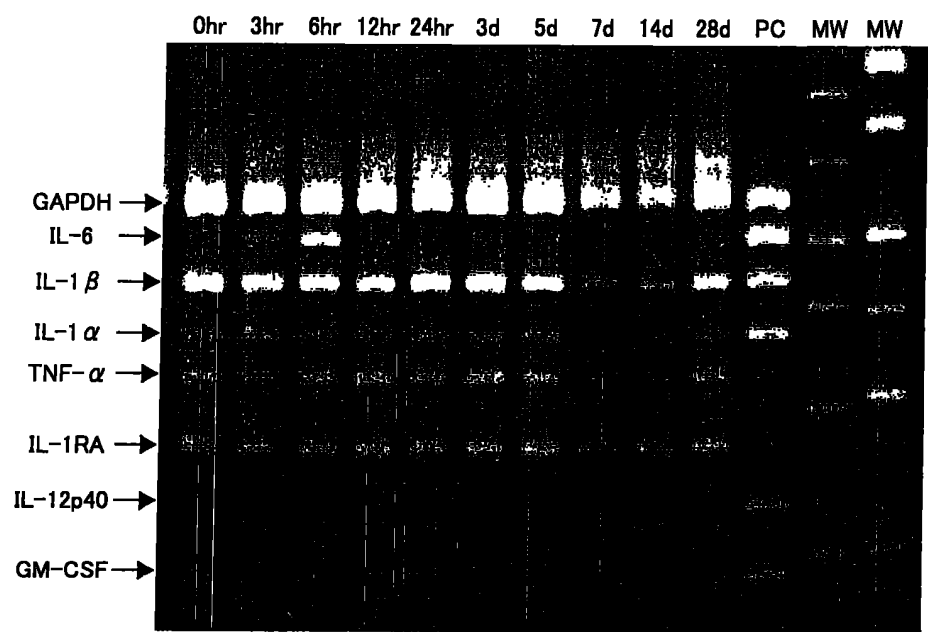


Fig.2



2/7

2/7

3/7

Fig.3

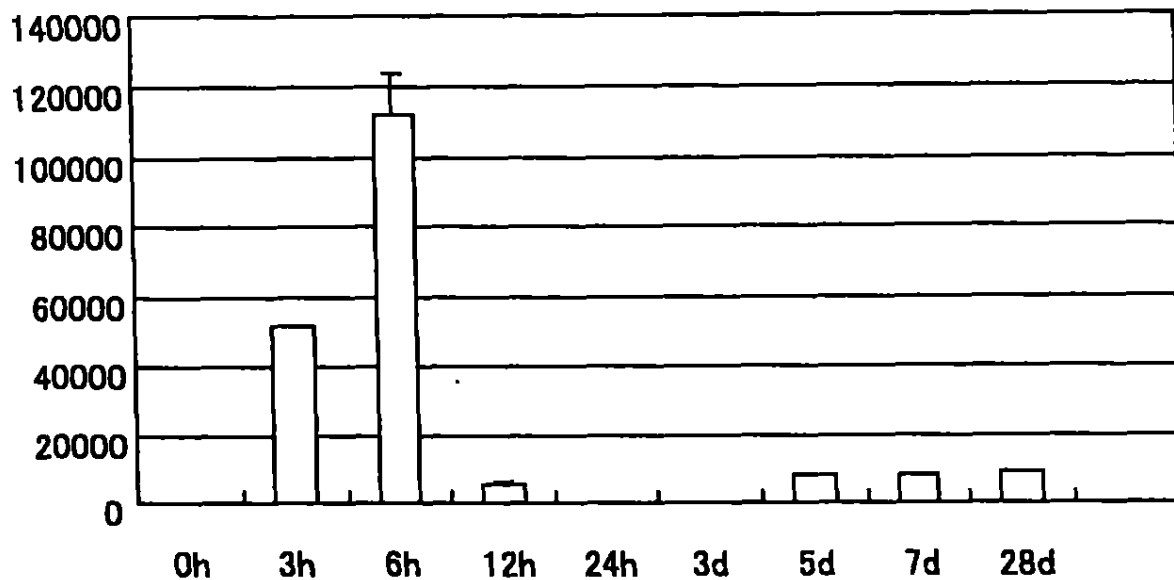
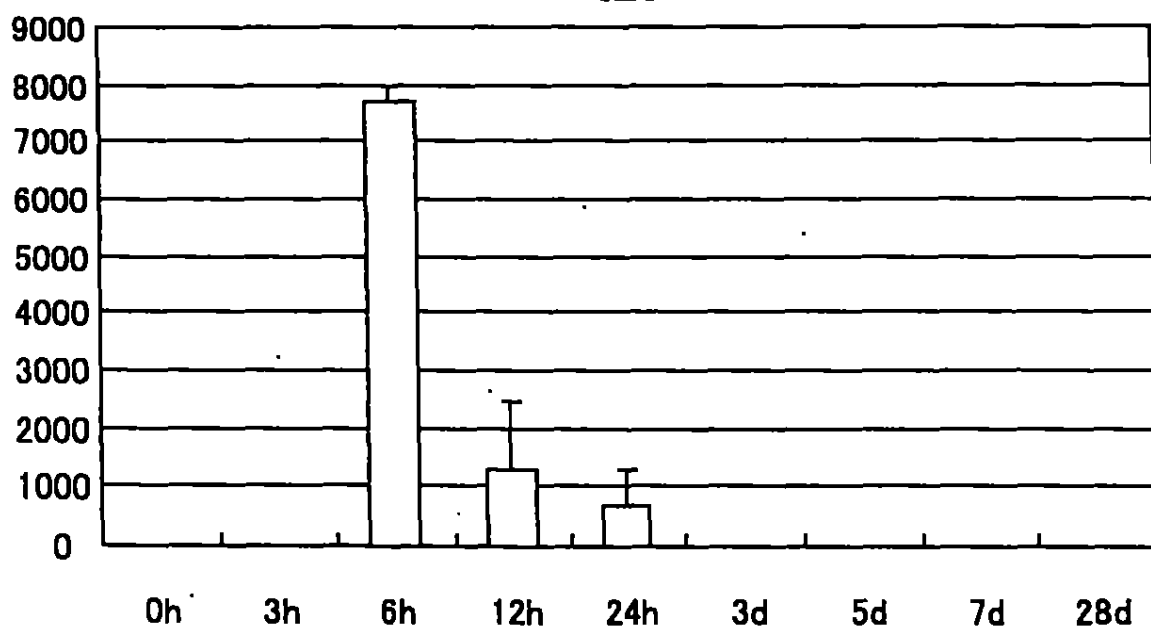
TNF α 

Fig.4

IL6



4/7

Fig. 5

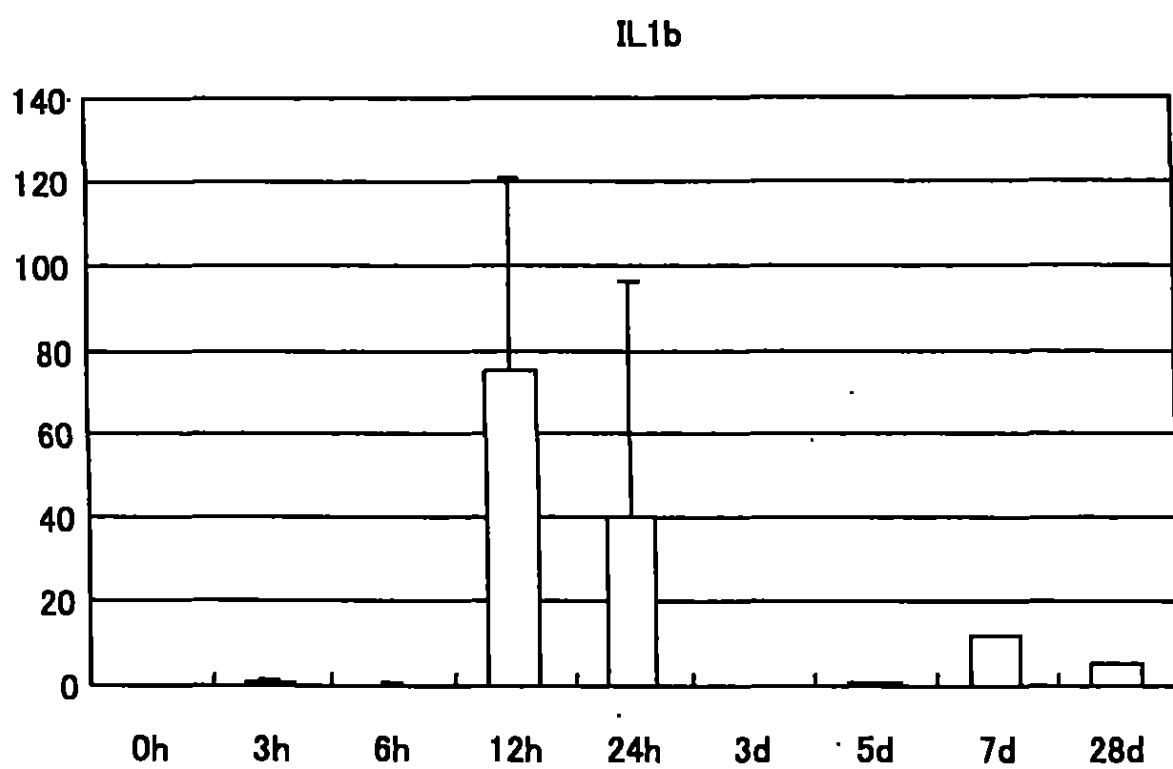
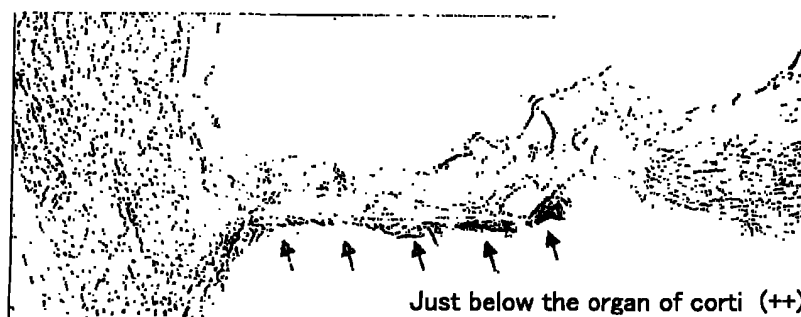
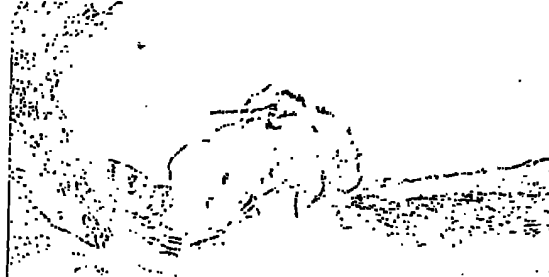


Fig.6



5/7

Negative control



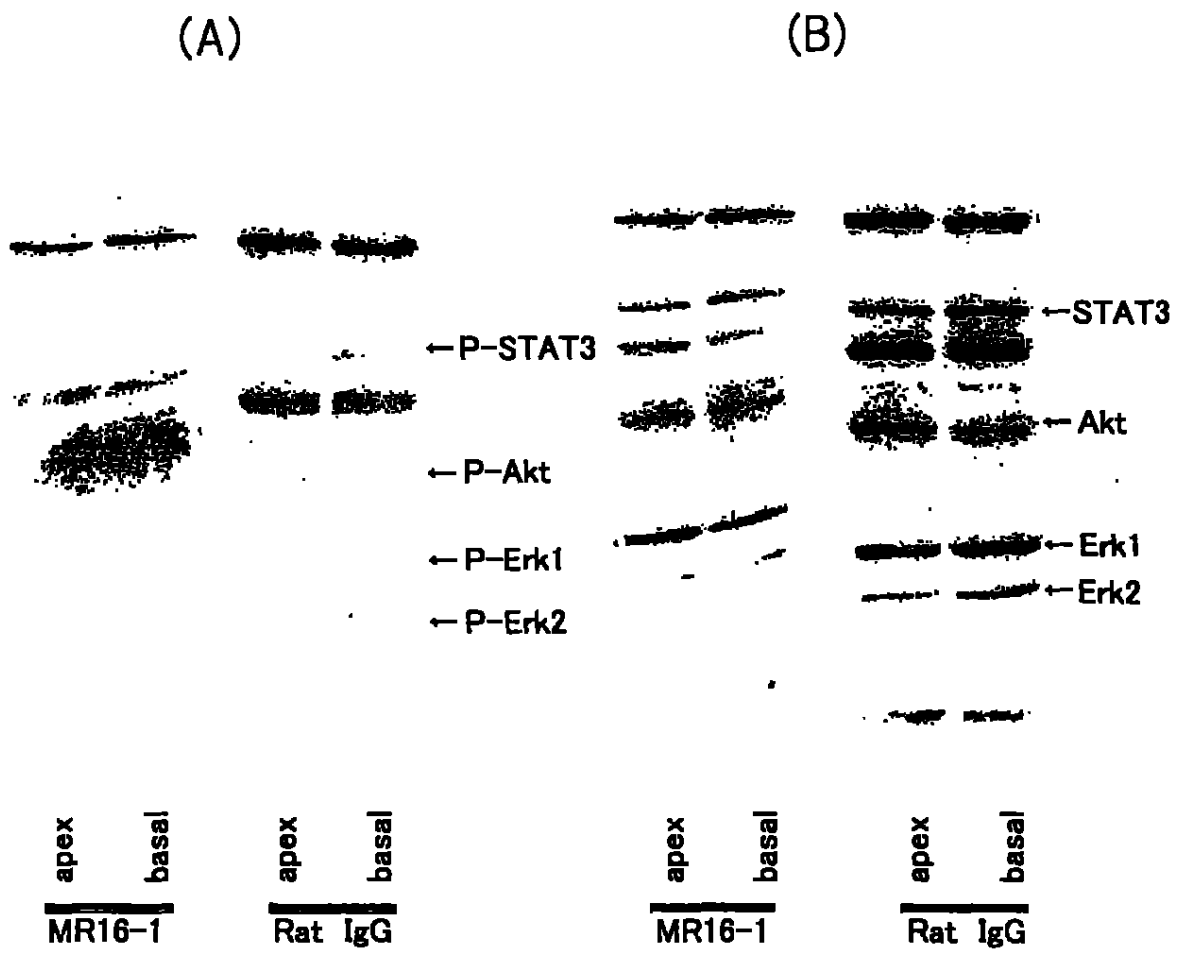
16

$\frac{6}{7}$ **Fig.7**

**Spiral ligament (+),
Stria vascularis (-)**

7/7

Fig.8



**AGENTES TERAPÉUTICOS PARA TRASTORNOS DEL OÍDO INTERNO
QUE CONTIENEN UN ANTAGONISTA DE IL-6 COMO UN INGREDIENTE
ACTIVO**

Campo Técnico

La presente invención se refiere a un agente terapéutico y/o preventivo para trastornos del oído interno. El agente preventivo y/o terapéutico de la presente invención comprende un antagonista de interleuquina-6 (IL-6).

Técnica anterior

Entre la pérdida de la audición, aquellas que son el resultado de causas laberínticas (coclear) o retrococlear (8vo nervio craneano) se denominan pérdida auditiva sensorineural. Las causas de la pérdida auditiva sensorineural son variadas, e incluyen, por ejemplo, la enfermedad de Meniere, trastornos del oído interno inducidos por fármacos (trastornos del oído interno debido a agentes anticancerígenos tales como aminoglicósidos y cisplatina), trastornos del oído interno virales, trastornos del oído interno purulento, fractura ósea temporal y tumor del nervio acústico. La sordera súbita, sordera senil y sordera por ruidos están también entre la pérdida auditiva sensorineural. La sordera por ruidos se desarrolla cuando el oído interno es lesionado por ruidos fuertes de sierras de cadena, motores de combustión interna, equipos pesados, pistolas, aviones y similares, y se asocia con disparos de pistola, móviles de nieve, vuelos de aire, conciertos de rock y similares.

Diversos factores son considerados que causan una pérdida de la audición sensorineural, en donde se sabe que las respuestas a reacciones inmunes agudas causan una pérdida de la audición permanente (Sato H. y otros, Laryngoscope. 2002 Sep; 112 (9): 1627- 34). En las respuestas inmunes en la cóclea causadas por la inyección de hemocianina Lapa Californiana (KLH,

abreviatura de la expresión en inglés "keyhole limpet hemocyanin") en el oído interno o el subaracnoide, se ha reportado, TNF- α y IL-1 β se han expresado, TNF- α causa una enfermedad agravada en la cóclea, y los inhibidores de TNF- α pueden suprimir parcialmente la pérdida de la audición, ibid.

Sin embargo, hasta la fecha no existen informes sobre la contribución de IL-6 a la pérdida de audición sensorineural.

Documento no patente 1:

Satoh H. y otros, Laryngoscope. 2002 Sep; 112 (9): 1627- 34

Descripción de la Invención

La presente invención tiene el objetivo de proporcionar una novedosa composición farmacéutica para el tratamiento y/o prevención de trastornos del oído interno.

Después de una intensa y extensa investigación, los presentes Inventores han demostrado que IL-6 está asociada con la patogénesis de la pérdida de audición sensorineural y que los antagonistas de IL-6 tienen un efecto terapéutico sobre la pérdida de audición sensorineural.

Por lo tanto, la presente invención proporciona un agente terapéutico y/o preventivo para la pérdida de audición sensorineural, comprendiendo dicho agente un antagonista de IL-6 como un ingrediente activo.

Los trastornos del oído interno antes mencionados son, por ejemplo, pérdida de audición sensorineural la cual es causada por, por ejemplo, la enfermedad de Meniere, trastornos del oído interno inducidos por fármacos, trastornos del oído interno virales, trastornos del oído interno purulento, fractura ósea temporal o tumor del nervio acústico, o son la sordera súbita, sordera senil o sordera por ruidos.

Alternativamente, los trastornos del oído interno antes mencionados son trastornos vestibulares, y los trastornos vestibulares son causados por la

8A

enfermedad de Meniere, neuronitis vestibular o trastornos del oído interno inducidos por fármacos.

Dicho antagonista de IL-6 es, por ejemplo, un anticuerpo contra el receptor de IL-6. Este anticuerpo del receptor de IL-6 puede ser, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6, preferentemente un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano o un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón. Dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano es por ejemplo el anticuerpo PM-1, y dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón es por ejemplo el anticuerpo MR16-1.

Dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es preferentemente un anticuerpo recombinante. Este anticuerpo recombinante es, por ejemplo, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano. Este anticuerpo humanizado es por ejemplo un anticuerpo PM-1 humanizado.

La presente invención también puede ser descrita de la siguiente manera:

- (1) El uso de un antagonista de IL-6 para la manufactura de un agente terapéutico y/o preventivo para trastornos del oído interno.
- (2) El uso de acuerdo con (1) donde dichos trastornos del oído interno son pérdida de audición sensorineural.
- (3) El uso de acuerdo con (2) donde dicha pérdida de la audición sensorineural es la pérdida de la audición sensorineural causada por la enfermedad de Meniere, trastornos del oído interno inducidos por fármacos, trastornos del oído interno virales, trastornos del oído interno purulento, fractura ósea temporal o tumor del nervio acústico.
- (4) El uso de acuerdo con (2) donde dicha pérdida de la audición sensorineural es sordera súbita, sordera senil o sordera por ruidos.

- (5) El uso de acuerdo con (1) donde dichos trastornos del oído interno son trastornos vestibulares.
- (6) El uso de acuerdo con (5) donde dichos trastornos vestibulares son trastornos vestibulares causados por la enfermedad de Meniere, neuronitis vestibular o trastornos del oído interno inducidos por fármacos.
- (7) El uso de acuerdo con cualquiera de (1) a (6) donde dicho antagonista de IL-6 es un anticuerpo contra el receptor de IL-6.
- (8) El uso de acuerdo con (7) donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6.
- (9) El uso de acuerdo con (8) donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano.
- (10) El uso de acuerdo con (8) donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón.
- (11) El uso de acuerdo con cualquiera de (7) a (10) donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo recombinante.
- (12) El uso de acuerdo con (9) donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano es el anticuerpo PM-1.
- (13) El uso de acuerdo con (10) donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón es el anticuerpo MR16-1.
- (14) El uso de acuerdo con cualquiera de (7) a (13) donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo quimérico,

un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano contra el receptor de IL-6.

- (15) El uso de acuerdo con (14) donde dicho anticuerpo humanizado contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo PM-1 humanizado.

La presente invención también puede ser descrita de la siguiente manera:

- (1) Un método terapéutico y/o preventivo para trastornos del oído interno el cual comprende administrar un antagonista de IL-6.
- (2) El método de acuerdo con (1) donde dichos trastornos del oído interno son la pérdida de la audición sensorineural.
- (3) El método de acuerdo con (2) donde dicha pérdida auditiva sensorineural es pérdida auditiva sensorineural causada por la enfermedad de Meniere, trastornos del oído interno inducidos por fármacos, trastornos del oído interno virales, trastornos del oído interno purulento, fractura ósea temporal o tumor del nervio acústico.
- (4) El método de acuerdo con (2) donde dicha pérdida de la audición sensorineural es sordera súbita, sordera senil o sordera por ruidos.
- (5) El método de acuerdo con (1) donde dichos trastornos del oído interno son trastornos vestibulares.
- (6) El método de acuerdo con (5) donde dichos trastornos vestibulares son trastornos vestibulares causados por la enfermedad de Meniere, neuritis vestibular o trastornos del oído interno inducidos por fármacos.
- (7) El método de acuerdo con cualquiera de (1) a (6) donde dicho antagonista de IL-6 es un anticuerpo contra el receptor de IL-6.
- (8) El método de acuerdo con (7) donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6.

- (9) El método de acuerdo con (8) donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano.
- (10) El método de acuerdo con (8) donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón.
- (11) El método de acuerdo con cualquiera de (7) a (10) donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo recombinante.
- (12) El método de acuerdo con (9) donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano es el anticuerpo PM-1.
- (13) El método de acuerdo con (10) donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón es el anticuerpo MR16-1.
- (14) El método de acuerdo con cualquiera de (7) a (13) donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano contra el receptor de IL-6.
- (15) El método de acuerdo con (14) donde dicho anticuerpo humanizado contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo PM-1 humanizado.

Breve Explicación de los Dibujos

La Fig. 1 muestra el resultado del Ejemplo 1, y es un gráfico que muestra el grado de reducción del nivel umbral de audición (dB) para el grupo que recibió un anticuerpo humanizado anti-IL-6R (MR16-1) de la presente invención y el grupo control que recibió la inmunoglobulina de ratón G en el modelo de ratón de la pérdida de audición creada utilizando tres tipos de frecuencias.

La Fig. 2 es un electroforetograma que muestra el resultado de RT-PCR en el Ejemplo 2 indicando cambios con el transcurso del tiempo en diversas citoquinas en la cóclea de ratas SD después de ser sometidas a carga acústica.

La Fig. 3 es un gráfico que muestra el resultado de RT-PCR cuantitativa en el Ejemplo 2 indicando cambios con el transcurso del tiempo en $\text{TNF-}\alpha$ en la cóclea de ratas SD después de ser sometidas a carga acústica.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra el resultado de RT-PCR cuantitativa en el Ejemplo 2 indicando cambios con el transcurso del tiempo en IL-6 en la cóclea de ratas SD después de ser sometidas a carga acústica.

La Fig. 5 es un gráfico que muestra el resultado de RT-PCR cuantitativa en el Ejemplo 2 indicando cambios con el transcurso del tiempo en IL-1 β en la cóclea de ratas SD después de ser sometidas a carga acústica.

La Fig. 6 es una fotografía sustituida por dibujos que muestra el resultado en el cual IL-6 se detectó con anticuerpo de IL-6 anti-ratón utilizando un kit Vectastain ABC en el tejido de ratas SD seis horas después de ser sometidas a carga acústica en el Ejemplo 2.

La Fig. 7 es una fotografía sustituida por dibujos que muestra el resultado en el cual IL-6 se detectó con anticuerpo de IL-6 anti-ratón utilizando un kit Vectastain ABC en el tejido de ratas SD seis horas después de ser sometidas a carga acústica en el Ejemplo 2.

La Fig. 8 es un electroforetograma que muestra el resultado en donde la expresión de STAT3, Erk y Akt totales, así como también de STAT3, Erk y Akt fosforilados se determinó en el órgano de Corti del oído interno de ratones C57BL/6J que recibieron MR16-1 (el anticuerpo humanizado anti-IL-6R preparado en el Ejemplo de Referencia 4) de la presente invención o IgG de rata (control) después de someterse a un sonido muy fuerte de 124 dB durante dos horas.

Mejor Modo para Llevar a Cabo la Invención

El agente terapéutico de la presente invención tiene un efecto de suprimir la progresión de la reducción de la capacidad auditiva en el daño de tejidos de la cóclea, es decir pérdida auditiva sensorineural en el oído interno. Específicamente,

el agente terapéutico de la presente invención tiene un efecto de suprimir la reducción de la capacidad auditiva en la región de alta frecuencia en la pérdida auditiva sensorineural. Como en las enfermedades en las que células pilosas dañadas están involucradas, como en la pérdida de la audición sensorineural, pueden mencionarse los trastornos vestibulares. En la pérdida de la audición sensorineural, la cóclea ha sido dañada, y la cóclea y el vestíbulo son responsables de diferentes sensaciones, aunque sus estructuras son similares en el sentido de que las células pilosas y células de soporte se han cubierto por la linfa, y sus propiedades físicas y de constitución de tejidos similares son responsables de funciones fisiológicas. Por consiguiente, se ha diseñado un mecanismo similar que detecta diferentes sensaciones en base a la diferencia si las células pilosas detectaron vibraciones sonoras o si detectaron movimiento linfático por aceleración. El daño a la cóclea y el vestíbulo conducen a la función reducida, y sensibilidad a fármacos es extremadamente similar. Por lo tanto, el agente terapéutico de la presente invención es eficaz para el tratamiento de los trastornos del oído interno tales como la pérdida de la audición sensorineural y trastornos vestibulares.

IL-6 es una citoquina la cual es también denominada factor 2 estimulador de células B (BSF2) o interferón $\beta 2$. IL-6 fue descubierta como un factor de diferenciación involucrado en la activación de células linfáticas B (Hirano, T. y otros, Nature (1986) 324, 73-76). A continuación, se descubrió que era una citoquina multifuncional que influye en diversas funciones de la célula (Akira, S. y otros, Adv. in Immunology (1993) 54, 1-78). IL-6 ha sido reportada que induce la maduración de células T linfáticas (Lotz, M. y otros, J. Exp. Med. (1988) 167, 1253- 1258).

IL-6 transmite su actividad biológica a través de dos tipos de proteínas en la célula. Una de ellas es el receptor de IL-6, una proteína de unión al ligando con

un peso molecular de aproximadamente 80 kD, al cual se une IL-6 (Taga, T. y otros, J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981; Yamasaki, K. y otros, Science (1987) 241, 825-828). El receptor de IL-6 ocurre no solo en la forma unida a la membrana que penetra a través de, y se expresa en la membrana celular sino que también como un receptor de IL-6 soluble que consiste principalmente en la región extracelular.

La otra es una proteína unida a la membrana gp130 que tiene un peso molecular de aproximadamente 130 KD que está involucrada en la transducción de señal de no unión al ligando. IL-6 y el receptor de IL-6 forman el complejo IL-6/receptor de IL-6 el cual, después de la unión a gp130, transmite su actividad biológica a la célula (Taga, T. y otros, Cell (1989) 58, 573-581).

Un antagonista de IL-6 es una sustancia que inhibe la transducción de la actividad biológica de IL-6. Hasta la fecha se han conocido anticuerpo dirigido contra IL-6 (anticuerpo anti-IL-6), anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-6 (anticuerpo del receptor anti-IL-6), anticuerpo dirigido contra gp130 (anticuerpo anti-gp130), IL-6 alterada, péptidos parciales de IL-6 o receptor de IL-6 y similares.

El anticuerpo del receptor anti-IL-6 ha sido descrito en diversos informes (Novick D. y otros, Hybridoma (1991) 10, 137- 146, Huang, Y. W. y otros, Hybridoma (1993) 12, 621-630, Publicación de Patente Internacional WO 95-09873, Solicitud de Patente Francesa FR 2694767, Patente de los Estados Unidos US 521628). Se ha sabido que el anticuerpo PM-1 humanizado fue obtenido transplantando la región determinante de complementariedad (CDR) de uno de ellos, un anticuerpo de ratón PM-1 (Hirata, Y. y otros, J. Immunology (1989) 143, 2900-2906), a un anticuerpo humano (la Publicación de Patente Internacional WO 92-19759).

El antagonista de IL-6 antes mencionado es preferentemente un anticuerpo contra el receptor de IL-6, preferentemente un anticuerpo monoclonal contra el

receptor de IL-6 humano o un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón. Como el anticuerpo monoclonal antes mencionado contra el receptor de IL-6 humano, se puede ilustrar el anticuerpo PM-1, y como el anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón, se puede ilustrar el anticuerpo MR16-1. El anticuerpo antes mencionado es preferentemente un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano, por ejemplo un anticuerpo PM-1 humanizado. Un anticuerpo humanizado es un anticuerpo alterado también denominado un anticuerpo humano reformado.

Los antagonistas de IL-6 para utilizar en la presente invención pueden ser de cualquier origen, de cualquier clase, y de cualquier forma, siempre que sean útiles para el tratamiento y/o prevención de trastornos del oído interno.

Los antagonistas de IL-6 bloquean la transducción de señal mediante IL-6 e inhiben la actividad biológica de IL-6. Los antagonistas de IL-6 son preferentemente sustancias que tienen una actividad de inhibir la unión a cualquiera de IL-6, receptor de IL-6 y gp130. Como los antagonistas de IL-6, pueden mencionarse, por ejemplo, el anticuerpo anti-IL-6, el anticuerpo del receptor anti-IL-6, el anticuerpo anti-gp130, IL-6 alterada, el receptor de IL-6 soluble alterada, un péptido parcial de IL-6 o del receptor de IL-6, y una sustancia de bajo peso molecular que tiene la misma actividad que éstos.

Los anticuerpos anti-IL-6 para utilizar en la presente invención pueden obtenerse como anticuerpos policlonales o monoclonales utilizando un método conocido. Como los anticuerpos anti-IL-6 para utilizar en la presente invención, se prefieren los anticuerpos monoclonales de, en particular, un origen mamífero. Los anticuerpos monoclonales de origen mamífero incluyen aquellos producidos mediante un hibridoma y anticuerpo recombinante producido mediante un huésped el cual ha sido transformado con un vector de expresión que contiene genes de anticuerpos genéticamente contruidos. Estos anticuerpos, por medio

de la unión a IL-6, bloquean la unión de IL-6 al receptor de IL-6 y, así, bloquean la transducción de señales de actividad biológica de IL-6 en la célula.

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

Un hibridoma productor de anticuerpo anti-IL-6 puede ser básicamente construido utilizando un procedimiento conocido según lo descrito más adelante. Por ende, IL-6 puede utilizarse como un antígeno sensibilizador y es inmunizado en el método convencional de inmunización. Las células inmunes así obtenidas son fusionadas con células madres conocidas en el proceso de fusión celular convencional, y luego las células productoras de anticuerpos monoclonales son seleccionadas mediante el método de selección convencional para preparar el hibridoma deseado.

Específicamente, puede obtenerse el anticuerpo anti-IL-6 de la siguiente manera. Por ejemplo, una IL-6 humana para utilizar como el antígeno sensibilizador para obtener el anticuerpo puede obtenerse utilizando la secuencia de gen IL-6/ aminoácidos descrita en Eur. J. Biochem (1987) 168, 543-550, J. Immunol. (1988) 140, 1534-1541, o Argic. Biol. Chem. (1990) 54, 2685-2688.

Después de que una célula huésped adecuada es transformada insertando la secuencia genética de IL-6 en un sistema de vector de expresión conocido, la proteína IL-6 de interés es purificada de la célula huésped o de su sobrenadante de cultivo, y la proteína IL-6 purificada puede utilizarse como el antígeno sensibilizador. Alternativamente, una proteína de fusión de la proteína IL-6 y otra proteína pueden utilizarse como el antígeno sensibilizador.

Los anticuerpos del receptor anti-IL-6 para utilizar en la presente invención pueden obtenerse como anticuerpos policlonales o monoclonales utilizando un

método conocido. Como los anticuerpos del receptor anti-IL-6 para utilizar en la presente invención, los anticuerpos monoclonales de, en particular, origen mamífero son preferidos. Los anticuerpos monoclonales de origen mamífero incluyen aquellos producidos mediante un hibridoma y aquellos producidos mediante un huésped que ha sido transformado con un vector de expresión que contiene genes de anticuerpos genéticamente contruidos. Los anticuerpos, por medio de la unión al receptor de IL-6, inhiben la unión de IL-6 al receptor de IL-6, y así bloquean la transducción de la actividad biológica de IL-6 en la célula.

Ejemplos de ese tipo de anticuerpos incluyen el anticuerpo MR16-1 (Tamura, T. y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993) 90, 11924- 11928), anticuerpo PM-1 (Hirata, Y. y otros, J. Immunol. (1989) 143, 2900-2906), o anticuerpo AUK12-20, anticuerpo AUK64-7 o anticuerpo AUK146-15 (Publicación de Patente Internacional WO 92-19759) y similares. Entre ellos, el anticuerpo PM-1 es el más preferido.

Incidentemente, la línea celular de hibridoma la cual produce anticuerpo PM-1 ha sido internacionalmente depositada bajo las condiciones del Tratado de Budapest como PM-1 el 12 de Julio, 1989 ante el Patent Microorganism Depository of National Institute of Industrial Science and Technology en Chuo 6, 1-1, Higashi 1-chome, ciudad de Tsukuba, Ibaraki pref., Japón, como FERM BP-2998. La línea celular del hibridoma la cual produce el anticuerpo MR16-1 ha sido depositada internacionalmente bajo las condiciones del Tratado de Budapest como MR16-1 el 13 de Marzo, 1997 ante el Patent Microorganism Depository of National Institute of Industrial Science and Technology en Chuo 6, 1-1, Higashi 1-chome, ciudad de Tsukuba, Ibaraki pref., Japón, como FERM BP-5875.

Los hibridomas productores de anticuerpo monoclonal del receptor anti-IL6 pueden ser preparados básicamente utilizando un procedimiento conocido según lo descrito más adelante. Por lo tanto, el receptor de IL-6 se utiliza como un

antígeno sensibilizador y es inmunizado de acuerdo con el método de inmunización convencional. Las células inmunes así obtenidas son fusionadas con células madres conocidas en el proceso de fusión celular convencional, y luego las células productoras de anticuerpos monoclonales pueden ser seleccionadas mediante el método de selección convencional para preparar el hibridoma deseado.

Específicamente, el anticuerpo anti- receptor de IL-6 puede ser preparado de la siguiente manera. Por ejemplo, el receptor de IL-6 humano utilizado como el antígeno sensibilizador para obtener anticuerpo puede obtenerse utilizando la secuencia de genes del receptor de IL-6/ secuencia de aminoácidos descrita en la Solicitud de Patente Europea EP 325474, y el receptor de IL-6 de ratón puede obtenerse utilizando el gen receptor de IL-6 descrito en la Publicación de Patente No Examinada Japonesa (Kokai) 3-155795.

Existen dos tipos de proteínas receptoras de IL-6: el receptor de IL-6 expresado en la membrana celular, y el receptor de IL-6 desprendido de la membrana celular (receptor de IL-6 soluble) (Yasukawa K. y otros, J. Biochem. (1990) 108, 673-676). El anticuerpo del receptor de IL-6 soluble está compuesto sustancialmente por la región extracelular del receptor de IL-6 unido a la membrana celular, y por ende es diferente del receptor de IL-6 unido a la membrana en el sentido de que el primero carece de la región transmembrana o ambos de la región transmembrana y la región intracelular. Como la proteína del receptor de IL-6, puede utilizarse cualquier receptor de IL-6, siempre y cuando pueda utilizarse como un antígeno sensibilizador para la producción del anticuerpo anti-receptor de IL-6 para utilizar en la presente invención.

Después de que la secuencia genética del receptor de IL-6 es insertada en un sistema de vector de expresión conocido para transformar una célula huésped apropiada, la proteína del receptor de IL-6 deseada puede ser purificada a partir

de la célula huésped o de su sobrenadante de cultivo utilizando un método conocido, y la proteína del receptor de IL-6 purificada puede ser utilizada como el antígeno sensibilizador. Alternativamente, las células que expresan al receptor de IL-6 o una proteína de fusión de la proteína del receptor de IL-6 y otra proteína pueden utilizarse como el antígeno sensibilizador.

Escherichia coli (E. coli) que tiene un plásmido pIBBSF2R que contiene ADNc que codifica al receptor de IL-6 humano ha sido internacionalmente depositado bajo las condiciones del Tratado de Budapest como HB101-pIBBSF2R el 9 de Enero, 1989 ante el Patent Microorganism Depository of National Institute of Industrial Science and Technology en Chuo 6, 1-1, Higashi 1-chome, ciudad de Tsukuba, Ibaraki pref., Japón, como FERM BP-2232.

Los anticuerpos anti-gp130 para utilizar en la presente invención pueden obtenerse como anticuerpos policlonales o monoclonales utilizando un método conocido. Como los anticuerpos anti-gp130 para utilizar en la presente invención, se prefieren los anticuerpos monoclonales de, en particular, origen mamífero. Los anticuerpos monoclonales de origen mamífero incluyen aquellos producidos mediante un hibridoma y aquellos producidos mediante un huésped el cual ha sido transformado con un vector de expresión que contiene genes de anticuerpo genéticamente contruidos. Los anticuerpos, por medio de la unión a gp130, inhiben la unión del complejo IL-6/ receptor de IL-6 a gp130, y así bloquean la transducción de la actividad biológica de IL-6 en la célula.

Ejemplos de ese tipo de anticuerpos incluyen el anticuerpo AM64 (Publicación de Patente No Examinada Japonesa (Kokai) 3-219894), anticuerpo 4B11 y anticuerpo 2H4 (US 5571513), anticuerpo B-S12 y anticuerpo B-P8 (Publicación de Patente No Examinada Japonesa (Kokai) 8-291199) y similares.

Un hibridoma productor de anticuerpos monoclonales anti-gp130 puede ser básicamente creado utilizando un procedimiento conocido según lo descrito más

adelante. Por lo tanto, gp130 puede utilizarse como un antígeno sensibilizador y es inmunizado en el método de inmunización convencional. Las células inmunes así obtenidas son fusionadas con células madres conocidas en el proceso de fusión celular convencional, y luego los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales son seleccionados mediante el método de selección convencional para preparar el hibridoma deseado.

Específicamente, el anticuerpo monoclonal puede obtenerse de la siguiente manera. Por ejemplo, gp130 utilizado como el antígeno sensibilizador para la generación de anticuerpos puede obtenerse utilizando la secuencia de genes gp130/ secuencia de aminoácidos en la Solicitud de Patente Europea EP 411946.

Después de que una célula huésped adecuada es transformada insertando la secuencia de genes gp130 en un sistema de vector de expresión conocido, la proteína gp130 de interés es purificada de la célula huésped o del sobrenadante de cultivo de la misma en un método convencional. La proteína receptora gp130 purificada puede utilizarse como el antígeno sensibilizador. Alternativamente, una proteína de fusión de la proteína gp130 y otra proteína pueden utilizarse como el antígeno sensibilizador.

Si bien los mamíferos a ser inmunizados con el antígeno sensibilizador no están específicamente limitados, los mismos son preferentemente seleccionados teniendo en cuenta su compatibilidad con la célula madre para utilizar en la fusión celular. Incluyen en general roedores tales como ratones, ratas, hamsters y similares.

La inmunización de animales con un antígeno sensibilizador se lleva a cabo utilizando un método conocido. Un método general, por ejemplo, involucra la inyección intraperitoneal o subcutánea de un antígeno sensibilizador al mamífero. Específicamente, un antígeno sensibilizador el cual ha sido diluido y suspendido en una cantidad apropiada de solución salina tamponada con fosfato (PBS) o

solución salina fisiológica etc. se mezcla, según lo deseado, con una cantidad apropiada de un adyuvante común, por ejemplo adyuvante completo de Freund. Después de ser emulsionado, se administra preferentemente a un mamífero varias veces cada 4 a 21 días. Alternativamente, puede utilizarse un portador adecuado al momento de la inmunización del antígeno sensibilizador.

Después de la inmunización y la confirmación del aumento en los niveles de anticuerpo deseados en el suero, las células inmunes se extraen del mamífero y son sometidas a fusión celular. Las células inmunes preferidas a ser sometidas a fusión celular incluyen, en particular, células de bazo.

Las células de mieloma de mamífero como las otras células madres que se fusionan con las células inmunes antes mencionadas incluyen preferentemente diversas líneas celulares conocidas tales como P3X63Ag8.653 (Kearney, J. F. y otros, J. Immunol. (1979) 123, 1548-1550), P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7), NS-1 (Kohler, G. y Milstein, C., Eur. J. Immunol. (1976) 6, 511-519), MPC-11 (Margulies, D. H. y otros, Cell (1976) 8, 405-415), SP2/0 (Shulman, M. y otros, Nature (1978) 276, 269-270), FO (de St. Groth, S. F. y otros, J. Immunol. Methods (1980) 35; 1-21), S194 (Trowbridge, I.S., J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323), R210 (Galfre, G. y otros, Nature (1979) 277; 131-133) y similares.

La fusión celular entre las células inmunes antes mencionadas y las células de mieloma puede llevarse a cabo esencialmente de acuerdo con un método conocido tal como el descrito en Milstein y otros (Kohler, G. y Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) y similares.

Más específicamente, la fusión celular antes mencionada se lleva a cabo en el caldo de cultivo de nutrientes convencional en presencia de, por ejemplo, un acelerador de la fusión celular. Como el acelerador de la fusión celular, por ejemplo, pueden utilizarse polietilenglicol (PEG), virus Sendai (HVJ) y similares, y,

adicionalmente, un adyuvante tal como dimetilsulfóxido etc. pueden agregarse según lo deseado para aumentar la eficacia de fusión.

La relación preferida de las células inmunes y las células de mieloma a utilizarse es, por ejemplo, 1 a 10 veces más células inmunes que las células de mieloma. Ejemplos de medios de cultivo a utilizarse para la fusión celular antes mencionada incluyen medio RPMI1640 y medio de cultivo MEM adecuado para el crecimiento de las líneas celulares de mieloma antes mencionadas, y el medio de cultivo convencional utilizado para este tipo de cultivo de células y, además, puede agregarse un suplemento de suero tal como suero de ternero fetal (FCS, abreviatura de la expresión en inglés "fetal calf serum").

En la fusión celular, las cantidades predeterminadas de las células inmunes antes mencionadas y las células de mieloma se mezclan bien en el líquido de cultivo antes mencionado, al cual se agrega una solución de PEG previamente calentada hasta aproximadamente 37°C, por ejemplo una solución de PEG con un peso molecular medio de aproximadamente 1000 a 6000, a una concentración de 30 a 60% (p/v) y se mezcla para formar las células de fusión deseadas (hibridoma). A continuación, repletando la adición secuencial de un líquido de cultivo adecuado y centrifugación para eliminar el sobrenadante, pueden retirarse los agentes de fusión celular etc. los cuales son indeseables para el crecimiento del hibridoma.

Dicho hibridoma puede seleccionarse cultivando en el medio de selección convencional, por ejemplo, el medio de cultivo HAT (un líquido de cultivo que contiene hipoxantina, aminopterina y timidina). El cultivo en dicho líquido de cultivo HAT es continuado generalmente durante un período de tiempo suficiente para efectuar la matanza de las células (células no de fusión) diferentes al hibridoma deseado, generalmente varios días a varias semanas. Luego, se lleva a

cabo el método de dilución limitante convencional para efectuar la selección y clonación de los hibridomas que producen el anticuerpo deseado.

Además de obtener el hibridoma antes mencionado inmunizando un animal distinto al humano con un antígeno, también es posible sensibilizar linfocitos humanos in vitro con una proteína de antígeno deseada o células de expresión del antígeno deseadas, y los linfocitos B sensibilizados resultantes son fusionados con células de mieloma humanas, por ejemplo U266, para obtener el anticuerpo humano deseado que tiene la actividad de unión al antígeno deseado o a las células de expresión del antígeno deseadas (véase la Publicación de Patente Post-examinada Japonesa (Kokoku) No. 1-59878). Adicionalmente, un animal transgénico que tiene un repertorio de todos los genes de anticuerpos humanos es inmunizado con el antígeno o las células que expresan el antígeno para obtener el anticuerpo humano deseado en el método antes descrito (véase la Publicación de Patente Internacional WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 y WO 96/33735).

El hibridoma productor de anticuerpos monoclonales así construido puede ser subcultivado en el líquido de cultivo convencional, o puede ser almacenado durante un período de tiempo prolongado en nitrógeno líquido.

A fin de obtener anticuerpos monoclonales a partir de dicho hibridoma, puede utilizarse un método en el cual dicho hibridoma es cultivado en el método convencional y los anticuerpos son obtenidos como el sobrenadante, o un método en el cual el hibridoma es administrado a y cultivado en un mamífero compatible con dicho hibridoma y los anticuerpos son obtenidos como los ascites. El método primero mencionado es adecuado para obtener anticuerpos de alta pureza, mientras que el último mencionado es adecuado para una producción a gran escala de anticuerpos.

Por ejemplo, puede construirse un hibridoma productor de un anticuerpo del receptor anti-IL-6 utilizando el método descrito en la Publicación de Patente No Examinada Japonesa (Kokai) 3-139293. Puede llevarse a cabo mediante un método en el cual el hibridoma productor de anticuerpos PM-1 que fue internacionalmente depositado bajo las condiciones del Tratado de Budapest como FERM BP-2998 el 12 de Julio, 1989 ante el Patent Microorganism Depository of National Institute of Industrial Science and Technology en Chuo 6, 1-1, Higashi 1-chome, ciudad de Tsukuba, Ibaraki pref., Japón, es inyectado intraperitonealmente a ratones BALB/c para obtener los ascites de los cuales el anticuerpo PM-1 es purificado, o un método en el cual dicho hibridoma es cultivado en un medio de cultivo adecuado tal como el medio RPMI1640 que contenía 10% suero fetal bovino y 5% BM-Condimed H1 (manufacturado por Boehringer Mannheim), el medio SFM de hibridoma (manufacturado por GIBCO-BRL), el medio PFHM-II (manufacturado por GIBCO-BRL) y similares, y el anticuerpo PM-1 pueden ser purificados a partir del sobrenadante.

Un anticuerpo recombinante el cual fue producido mediante la tecnología de genes recombinantes en donde un gen de anticuerpo fue clonado del hibridoma e integrado en un vector adecuado el cual fue luego introducido en un huésped puede utilizarse en la presente invención como anticuerpo monoclonal (véase, por ejemplo, Borrebaeck C.A.K. y Larrick J.W. THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, publicado en el Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD. 1990).

Específicamente, el ARNm que codifica la región variable (V) del anticuerpo deseado es aislado de células productoras de anticuerpos tales como un hibridoma. La aislación de ARNm se lleva a cabo preparando ARN total utilizando, por ejemplo, un método conocido tal como el método de ultracentrifugación de guanidina (Chirgwin, J. M. y otros, Biochemistry (1979) 18, 5294- 5299), el método

de AGPC (Chomczynski, P. y otros, Anal. Biochem. (1987) 162, 156- 159), y luego ARNm se prepara a partir del ARN total utilizando el kit de Purificación de ARNm (manufacturado por Pharmacia) y similares. Alternativamente, el ARNm puede ser directamente preparado utilizando el Kit de Purificación de ARNm QuickPrep (manufacturado por Pharmacia).

El ADNc de la región V de anticuerpo puede sintetizarse a partir del ARNm así obtenido utilizando una transcriptasa inversa. El ADNc puede sintetizarse utilizando el Kit de Síntesis de ADNc de Primera- hebra de Transcriptasa Inversa AMV y similares. Alternativamente, para la síntesis y amplificación de ADNc, puede utilizarse el Kit 5'-Ampli FINDER RACE (manufacturado por Clontech) y el método 5'-RACE (Frohman, M.A. y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998- 9002; Belyavsky, A. y otros, Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) que emplea reacción en cadena de polimerasa (PCR). El fragmento de ADN deseado es purificado del producto de la PCR obtenido y puede ligarse al ADN vector. Asimismo, un vector recombinante es construido del mismo y luego es introducido en E. coli etc., a partir del cual se seleccionan colonias para preparar el vector recombinante deseado. La secuencia base del ADN deseado puede confirmarse mediante un método conocido tal como el método dideoxi.

Una vez que el ADN que codifica la región V del anticuerpo deseado se ha obtenido, puede ligarse a ADN que codifica la región constante (región C) del anticuerpo deseado, que luego se integra en un vector de expresión. Alternativamente, el ADN que codifica la región V del anticuerpo puede integrarse en un vector de expresión que contiene ADN que codifica la región C del anticuerpo.

A fin de producir el anticuerpo para utilizar en la presente invención, el gen del anticuerpo es integrado como se describe más adelante en un vector de expresión de modo de ser expresado bajo el control de la región reguladora de la

expresión, por ejemplo un potenciador y/o promotor. Posteriormente, el vector de expresión puede ser transformado en una célula huésped y el anticuerpo puede ser luego expresado en la misma.

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

El anticuerpo quimérico puede ser obtenido ligando el ADN así obtenido que codifica la región V del anticuerpo a ADN que codifica la región C del anticuerpo humano, el cual es luego integrado en un vector de expresión e introducido en un huésped para la producción del anticuerpo en el mismo (véase la Solicitud de Patente Europea EP 125023, y la Publicación de Patente Internacional WO 92-19759). Utilizando este método conocido, el anticuerpo quimérico útil para la presente invención puede ser obtenido.

Por ejemplo, un plásmido que contiene ADN que codifica la región V de cadena L (liviana) o la región V de cadena H (pesada) de anticuerpo PM-1 quimérico fue diseñado como pPM-k3 o pPM-h1, respectivamente, y E. coli que tiene el plásmido ha sido internacionalmente depositado bajo las condiciones del Tratado de Budapest como NCIMB 40366 y NCIMB 40362, respectivamente, el 12 de Febrero, 1991 ante the National Collections of Industrial and Marine Bacteria Limited.

El anticuerpo humanizado el cual también es denominado anticuerpo humano reformado ha sido preparado transplantando la región determinante de la complementariedad (CDR) de anticuerpo de un mamífero distinto al ser humano, por ejemplo anticuerpo murino, en la región determinante de la complementariedad de anticuerpo humano. La tecnología de ADN recombinante

general para la preparación de tales anticuerpos es también conocida (ver la Solicitud de Patente Europea EP 125023 y la Publicación de Patente Internacional WO 92-19759).

Específicamente, una secuencia de ADN la cual fue diseñada para ligar la CDR de anticuerpo de ratón con la región estructural (FR, "framework region") del anticuerpo humano se sintetiza a partir de diversos oligonucleótidos divididos que tienen secciones que se superponen entre sí en sus extremos mediante el método de PCR. El ADN obtenido de ese modo se liga al ADN que codifica la región C del anticuerpo humano y luego se integra en un vector de expresión, el cual es introducido en un huésped para la producción de anticuerpos (véase la Solicitud de Patente Europea EP 239400 y la Publicación de Patente Internacional WO 92-19759).

Para la FR del anticuerpo humano ligado a través de CDR, aquellos en los cuales la región determinante de la complementariedad que forma un sitio de unión al antígeno favorable se seleccionan. Cuando resulte conveniente, los aminoácidos en la región estructural de la región variable del anticuerpo pueden estar sustituidos de modo que la región determinante de la complementariedad de anticuerpo humano reformado puede formar un sitio de unión al antígeno apropiado (Sato, K. y otros, Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

Por ejemplo, para el anticuerpo quimérico o el anticuerpo humanizado, se utiliza la región C del anticuerpo humano. Como la región C del anticuerpo humano, pueden mencionarse $C\gamma$, y $C\gamma 1$, $C\gamma 2$, $C\gamma 3$ y $C\gamma 4$, por ejemplo, pueden utilizarse. La región C del anticuerpo humano puede ser modificada para mejorar la estabilidad del anticuerpo o su producción.

El anticuerpo quimérico consiste en la región variable del anticuerpo derivado de un mamífero distinto al ser humano y la región C derivada del anticuerpo humano, mientras que el anticuerpo humanizado consiste en la región

determinante de la complementariedad del anticuerpo derivado de un mamífero distinto al ser humano y la región estructural y la región C derivada del anticuerpo humano. Por consiguiente, su antigenicidad en el cuerpo humano ha sido reducida de modo que sean útiles como anticuerpo para utilizar en la presente invención.

Como una realización preferida del anticuerpo humanizado para utilizar en la presente invención, puede mencionarse el anticuerpo PM-1 humanizado (véase la Publicación de Patente Internacional WO 92-19759).

Adicionalmente, como un método para obtener un anticuerpo humano, se conoce una tecnología que emplea panning con una biblioteca de anticuerpos humanos, además de los descritos anteriormente. Por ejemplo, la región variable del anticuerpo humano se expresa sobre la superficie de un fago mediante el método de exhibición de fagos como un anticuerpo de cadena único (SCFV, "single chain antibody") para seleccionar un fago que se une al antígeno. Analizando el gen del fago seleccionado, puede determinarse la secuencia de ADN que codifica la región variable del anticuerpo humano que se une al antígeno. Una vez que la secuencia de ADN de SCFV que se une al antígeno es aclarada, es posible construir un vector de expresión apropiado que contiene dicha secuencia y luego obtener el anticuerpo humano. Estos métodos ya son conocidos y pueden encontrarse en WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388.

Los genes de anticuerpos contruidos según lo descrito anteriormente pueden expresarse y obtenerse en un método conocido. En el caso de células de mamífero, la expresión puede lograrse utilizando un vector que contiene un promotor útil comúnmente utilizado, el gen del anticuerpo a ser expresado, el ADN en el cual la señal de poli A ha sido operativamente ligada en 3' corriente abajo del mismo, o un vector que contiene dicho ADN. Ejemplos del promotor/

potenciador incluyen al promotor/ potenciador temprano inmediato de citomegalovirus humano.

Adicionalmente, como el promotor / potenciador que puede utilizarse para la expresión del anticuerpo para utilizar en la presente invención, pueden utilizarse promotores / potenciadores virales tales como retrovirus, poliomavirus, adenovirus, y virus 40 de simio (SV40) y promotores / potenciadores derivados de células de mamífero tales como el factor de elongación humano 1 α (HEF1 α).

Por ejemplo, la expresión puede lograrse fácilmente mediante el método de Mulligan y otros (Mulligan, R. C. y otros, Nature (1979) 277, 108- 114) cuando el promotor / potenciador de SV40 es utilizado, o mediante el método de Mizushima y otros (Mizushima, S. y Nagata, S., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) cuando se utiliza el promotor / potenciador de HEF1 α .

En el caso de E. coli, la expresión puede llevarse a cabo ligando operativamente un promotor útil comúnmente utilizado, una secuencia de señal para la secreción de anticuerpos, y el gen del anticuerpo a ser expresado, seguido por su expresión. Como el promotor, por ejemplo, pueden mencionarse el promotor lacZ y el promotor araB. El método de Ward y otros (Ward, E. S. y otros, Nature (1989) 341, 544- 546; Ward E. S. y otros, FASEB J. (1992) 6, 2422- 2427) puede utilizarse cuando se utiliza el promotor lacz, y el método de Better y otros (Better, M. y otros, Science (1988) 240, 1041- 1043) puede utilizarse cuando se utiliza el promotor araB.

Como la secuencia de señal para la secreción de anticuerpos, cuando se produce en el periplasma de E. coli, puede utilizarse la secuencia de señal pelB (Lei, S. P. y otros, J. Bacteriol. (1987) 169, 4379- 4383). Después de separar el anticuerpo producido en el periplasma, la estructura del anticuerpo es apropiadamente replegada antes del uso (véase, por ejemplo, WO 96/30394).

Como el origen de replicación, pueden utilizarse aquellos derivados de SV40, poliomavirus, adenovirus, papilomavirus bovino (BPV) y similares. Por añadidura, para la amplificación del número de copias de genes en el sistema de células huéspedes, los vectores de expresión pueden incluir como marcadores seleccionables al gen de aminoglicósido fosfotransferasa (APH), el gen de timidina quinasa (TK), el gen de xantina guanina fosforibosil transferasa de *E. coli* (Ecogpt), el gen de dihidrofolato reductasa (dhfr) y genes similares.

Para la producción del anticuerpo para utilizar en la presente invención, puede utilizarse cualquier sistema de producción. El sistema de producción para la preparación de anticuerpos comprende el sistema de producción in vitro o in vivo. Como el sistema de producción in vitro, puede mencionarse un sistema de producción el cual emplea células eucarióticas y el sistema de producción que emplea células procarióticas.

Cuando se utilizan células eucarióticas, existen los sistemas de producción que emplean células animales, células de plantas, o células fúngicas. Las células animales conocidas incluyen (1) células de mamífero tales como las células CHO, células COS, las células de mieloma, células de riñón de hámster bebé (BHK, "baby hamster kidney"), células HeLa y células Vero, (2) células anfibias tales como oocitos de *Xenopus*, o (3) células de insectos tales como sf9, sf21 y Tn5. Las células de plantas conocidas incluyen, por ejemplo, aquellas derivadas de *Nicotiana tabacum*, las cuales puede ser sometidas a cultivo de callo. Las células fúngicas conocidas incluyen levaduras tales como del género *Saccharomyces*, más específicamente *Saccharomyces cereviceae*, u hongos filamentosos tales como del género *Aspergillus*, más específicamente *Aspergillus niger*.

Cuando se utilizan células procarióticas, existen los sistemas de producción los cuales emplean células bacterianas. Las células bacterianas conocidas incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Bacillus subtilis*.

Introduciendo por medio de transformación el gen del anticuerpo deseado en estas células y cultivando las células transformadas in vitro, puede obtenerse el anticuerpo. El cultivo se lleva a cabo en los métodos conocidos. Por ejemplo, como el líquido de cultivo, pueden utilizarse DMEM, MEM, RPMI1640 y IMDM, y pueden combinarse con suplementos séricos tales como suero de ternero fetal (FCS, "fetal calf serum"). Adicionalmente, pueden producirse anticuerpos in vivo implantando células en las cuales el gen del anticuerpo se ha introducido en la cavidad abdominal de un animal y similares.

Como los sistemas de producción in vivo, pueden mencionarse aquellos que emplean animales y aquellos que emplean plantas. Cuando se utilizan animales, existen los sistemas de producción que emplean mamíferos e insectos.

Como mamíferos, pueden utilizarse cabras, cerdos, ovejas, ratones y ganado vacuno (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Applications, 1993). También como insectos, pueden utilizarse gusanos de seda. Cuando se utilizan plantas, puede utilizarse, por ejemplo, el tabaco.

Los genes del anticuerpo son introducidos en estos animales o plantas, y los anticuerpos son producidos en tales animales o plantas, y recuperados. Por ejemplo, un gen de anticuerpo es insertado en el medio de la proteína que codifica al gen la cual es inherentemente producida en la leche tal como la caseína β de cabra para preparar genes de fusión. Los fragmentos de ADN que contienen el gen de fusión en el cual el gen del anticuerpo se ha insertado son inyectados en un embrión de cabra, y el embrión es introducido en una cabra hembra. El anticuerpo deseado se obtiene de la leche producida por la cabra transgénica nacida de la cabra que recibió el embrión o su descendencia. A fin de aumentar la cantidad de leche que contiene el anticuerpo deseado producida por la cabra transgénica, pueden suministrarse hormonas a la cabra transgénica según sea apropiado. (Ebert, K. M. y otros, Bio/Technology (1994) 12, 699- 702).

Cuando se utilizan gusanos de seda, el baculovirus en el cual se ha insertado el gen del anticuerpo deseado se infecta al gusano de seda, y el anticuerpo deseado puede obtenerse del fluido del cuerpo del gusano de seda (Maeda, S. y otros, Nature (1985) 315, 592- 594). Asimismo, cuando se utiliza el tabaco, el gen del anticuerpo deseado es insertado en un vector de expresión para plantas, por ejemplo pMON 530, y luego el vector es introducido en una bacteria tal como *Agrobacterium tumefaciens*. La bacteria es luego infectada al tabaco tal como *Nicotiana tabacum* para obtener el anticuerpo deseado de las hojas del tabaco (Julian, K. C. Ma y otros, Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131- 138).

Cuando el anticuerpo es producido en sistemas de producción *in vitro* o *in vivo*, según lo descrito anteriormente, el ADN que codifica la cadena pesada (cadena H (por "heavy chain")) o la cadena liviana (cadena L) del anticuerpo puede integrarse separadamente en un vector de expresión y los huéspedes son transformados de manera simultánea, o el ADN que codifica la cadena H y la cadena L puede integrarse en un vector de expresión único, y el huésped es transformado con el mismo (véase la Publicación de Patente Internacional WO 94-11523).

Los anticuerpos para utilizar en la presente invención pueden ser fragmentos de anticuerpos o sus versiones modificadas siempre y cuando sean utilizados preferentemente. Por ejemplo, como fragmentos de anticuerpo, pueden mencionarse Fab, F(ab')₂, Fv o Fv de cadena única (SCFV) en donde Fv's de cadena H y de cadena L se ligaron por medio de un ligante adecuado.

Específicamente, los anticuerpos son tratados con una enzima, por ejemplo, papaína o pepsina, para producir fragmentos de anticuerpos, o se construyen genes que codifican estos fragmentos de anticuerpos, y luego introducidos en un vector de expresión, el cual es expresado en una célula huésped adecuada (véase, por ejemplo, Co, M. S. y otros, J. Immunol. (1994) 152, 2968- 2976; Better,

M. y Horwitz, A. H., *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496; Plueckthun, A. y Skerra, A., *Methods in Enzymology* (1989) 178, 476-496; Lamoyi, E., *Methods in Enzymology* (1989) 121, 652-663; Rousseaux, J. y otros, *Methods in Enzymology* (1989) 121, 663-66; Bird, R.E. y otros, *TIBTECH* (1991) 9, 132-137).

SCFV puede obtenerse ligando la región V de la cadena H y la región V de cadena L de anticuerpo. En scFV, la región V de cadena H y la región V de cadena L se ligan preferentemente por medio de un ligante, preferentemente un ligante peptídico (Huston, J.S. y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85, 5879- 5883). La región V de cadena H y la región V de cadena L en scFv pueden derivar de cualquiera de los anticuerpos antes mencionados. Como el ligante peptídico para ligar las regiones V, puede utilizarse cualquier péptido de cadena única que comprende, por ejemplo, residuos de 12-19 aminoácidos.

El ADN que codifica scFv puede obtenerse utilizando ADN que codifica la cadena H o la región V de cadena H del anticuerpo antes mencionado y ADN que codifica la cadena L o la región V de cadena L del anticuerpo antes mencionado como el patrón amplificando la porción del ADN que codifica la secuencia de aminoácidos deseada entre las secuencias antes mencionadas mediante la técnica de PCR con el par de cebadores especificando ambos de sus extremos, y amplificando además la combinación de ADN que codifica la porción de ligante peptídico y el par de cebadores el cual define que ambos extremos de dicho ADN sean ligados a la cadena H y la cadena L, respectivamente.

Una vez que los ADNs que codifican scFv han sido construidos, puede obtenerse un vector de expresión que los contiene y un huésped transformado con dicho vector de expresión mediante métodos convencionales, y puede obtenerse scFv utilizando el huésped resultante mediante los métodos convencionales.

Estos fragmentos de anticuerpo pueden producirse obteniendo el gen del mismo de manera similar a la anteriormente mencionada y permitiéndole expresarse en un huésped. "Anticuerpo" como se utiliza en la presente invención también abarca a estos fragmentos de anticuerpo.

Como anticuerpos modificados, pueden utilizarse anticuerpos asociados con diversas moléculas tales como polietilenglicol (PEG). "Anticuerpo" como se utiliza en la presente invención también abarca a estos anticuerpos modificados. Estos anticuerpos modificados pueden obtenerse modificando químicamente los anticuerpos así obtenidos. Estos métodos ya han sido establecidos en la técnica.

Los anticuerpos producidos y expresados según lo antes descrito pueden separarse desde el interior o desde el exterior de la célula huésped y luego pueden ser purificados hasta homogeneidad. La separación y purificación del anticuerpo para utilizar en la presente invención pueden lograrse por cromatografía de afinidad. Como la columna utilizada para tal cromatografía de afinidad, pueden mencionarse la columna de Proteína A y la columna de Proteína G. Ejemplos de los portadores utilizados en la columna de Proteína A son Hyper D, POROS, Sepharose F. F. y similares. Alternativamente, los métodos para la separación y purificación utilizados convencionalmente para proteínas pueden utilizarse sin limitación alguna.

La separación y purificación del anticuerpo para utilizar en la presente invención pueden lograrse combinando, según sea apropiado, cromatografía distinta a la cromatografía de afinidad antes mencionada, filtración, ultrafiltración, desalado, diálisis y similares. La cromatografía incluye, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, filtración en gel y similares. Estas cromatografías pueden ser aplicadas en cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, "high performance liquid chromatography"). Alternativamente, puede utilizarse HPLC de fase inversa.

La concentración de anticuerpo obtenida en lo que antecede puede determinarse mediante la medición de la absorbancia o mediante ELISA y similares. Por lo tanto, cuando se emplea medición de la absorbancia, una muestra es apropiadamente diluida con PBS (-) y luego se mide la absorbancia a 280 nm, seguido por el cálculo utilizando el coeficiente de absorción de 1,35 OD a 1 mg/ml. Cuando se utiliza el método ELISA, se lleva a cabo la medición de la siguiente manera. Por lo tanto, 100 μ l de IgG anti-humano de cabra (manufacturado por TAG) diluidos hasta 1 μ g/ml en buffer de bicarbonato 0,1 M, pH 9,6, se agrega a una placa de 96 receptáculos (manufacturada por Nunc), y se incuba durante la noche a 4°C para Inmovilizar el anticuerpo. Después del bloqueo, se agregan 100 μ l cada uno de anticuerpo diluido apropiadamente de la presente invención o una muestra que contiene el anticuerpo, o 100 μ l de IgG humano (manufacturado por CAPPEL) como el patrón, y se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora.

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

La IL-6 alterada para utilizar en la presente invención tiene una actividad de unión al receptor de IL-6 y no transmite la actividad biológica de IL-6. Por lo tanto, la IL-6 alterada, si bien cumple con IL-6 para la unión al receptor de IL-6, no transmite la actividad biológica de IL-6 y, de ese modo, bloquea la transducción de señales mediante IL-6.

La IL-6 alterada puede ser construida a través de la introducción de mutación reemplazando residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de IL-6. IL-6, la fuente de la IL-6 alterada, puede ser de cualquier origen, aunque cuando la antigenicidad ha de ser considerada, es preferentemente IL-6 humana.

Específicamente, la estructura secundaria de IL-6 se predice utilizando un programa de modelado molecular conocido de la secuencia de aminoácidos, por ejemplo WHATIF (Vriend y otros, J. Mol. Graphics (1990), 8, 52- 58), y se evalúan los efectos generales sobre el residuo de aminoácido a ser reemplazado. Después de que un residuo de aminoácido apropiado ha sido determinado, se introduce la mutación para efectuar la sustitución de aminoácidos mediante el método de reacción en cadena de polimerasa (PCR) comúnmente utilizado utilizando un vector que contiene la secuencia base que codifica el gen de IL-6 humana como un patrón mediante lo cual se obtiene un gen que codifica una IL-6 alterada. Luego, esto se integra, según lo deseado, en un vector de expresión apropiado, del cual puede obtenerse la IL-6 alterada de acuerdo con los métodos de expresión, producción y purificación de dicho anticuerpo recombinante.

Los ejemplos específicos de la IL-6 alterada son descritos en Brakenhoff y otros, J. Biol. Chem. (1994) 269, 88-93, y Savino y otros, 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 para utilizar en la presente invención tiene una actividad de unión al receptor de IL-6 o a IL-6, respectivamente, y no transmite la actividad biológica de IL-6. Por lo tanto, el péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 inhibe específicamente la unión de IL-6 al receptor de IL-6 mediante la unión al receptor de IL-6 o a IL-6, respectivamente, y de ese modo capturándolo. Como resultado, no transmiten la actividad biológica de IL-6, y así bloquean la transducción de señales de IL-6.

El péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 es un péptido que comprende algo o la totalidad de la secuencia de aminoácidos de la región involucrada en la unión a IL-6 y al receptor de IL-6 en la secuencia de aminoácidos de IL-6 o al receptor de IL-6. Ese tipo de péptido generalmente comprende 10 – 80, preferentemente 20 – 50, más preferentemente 20 – 40 residuos de aminoácidos.

El péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 puede ser construido especificando la región involucrada en la unión a IL-6 y al receptor de IL-6 en la secuencia de aminoácidos de IL-6 o del receptor de IL-6, y produciendo algo o la totalidad de la secuencia de aminoácidos mediante un método convencional tal como una tecnología de ingeniería genética o un método de síntesis de péptidos.

A fin de preparar el péptido parcial de IL-6 o el péptido parcial del receptor de IL-6 mediante una tecnología de ingeniería genética, la secuencia de ADN que codifica el péptido deseado se integra en un vector de expresión, del cual puede obtenerse el péptido mediante los métodos de expresión, producción y purificación de dicho anticuerpo recombinante.

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

Específicamente, puede utilizarse el método descrito en Zoku-Iyakuin no Kaihatsu (Sequel to Development of Pharmaceuticals), Vol. 14, Peptido Gousei (Peptide Synthesis), editado por Haruaki Yajima, Hirokawa Shoten, 1991. El método de síntesis en fase sólida utilizado incluye, por ejemplo, una reacción en la cual un aminoácido correspondiente a la terminal C del péptido a ser sintetizado es acoplado a un soporte el cual es insoluble en solventes orgánicos, y luego un

aminoácido en el cual el grupo α -amino o un grupo funcional de cadena lateral se ha protegido con un grupo protector apropiado se condensa un aminoácido a la vez de la terminal C a la dirección de la terminal N, y una reacción en la cual dicho grupo protector del grupo α -amino del aminoácido o el péptido acoplado a la resina se elimina son alternativamente repetidas para alargar la cadena peptídica. Los métodos de síntesis de péptidos en fase sólida son divididos en el método Boc y el método Fmoc dependiendo del tipo de grupo protector que se va a utilizar.

Después de completarse la síntesis del péptido deseado, se llevan a cabo una reacción de desprotección y una reacción para disociar la cadena peptídica del soporte. Para la disociación de la cadena peptídica, se utilizan en general fluoruro de hidrógeno o ácido trifluorometansulfónico en el método Boc, y TFA en el método Fmoc. En el método Boc, por ejemplo, la resina peptídica antes protegida se trata en fluoruro de hidrógeno en presencia de anisol. Posteriormente, el grupo protector es eliminado y el péptido es recuperado disociando del soporte. Mediante liofilización, puede obtenerse el péptido crudo. Por otro lado, en el método Fmoc, la reacción de desprotección y la reacción de disociación del péptido del soporte pueden llevarse a cabo en TFA por ejemplo, en un procedimiento similar al anterior.

El péptido crudo así obtenido puede ser aplicado a HPLC para su separación y purificación. Su elución puede llevarse a cabo en un sistema de solvente de agua- acetonitrilo que es comúnmente utilizado para la purificación de proteínas bajo una condición óptima. La fracción que corresponde al pico del perfil de la cromatografía obtenida se recoge y liofiliza. La fracción peptídica así purificada es identificada sometiéndola al análisis de peso molecular mediante análisis espectroscópico de masas, el análisis de composición de aminoácidos, o el análisis de secuencia de aminoácidos y similares.

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

La actividad del antagonista de IL-6 para utilizar en la presente invención del bloqueo de la transducción de señales de IL-6 puede evaluarse utilizando un método convencionalmente conocido. Específicamente, la línea de células de mieloma humana dependiente de IL-6 (S6B45, KPMM2), la línea de células de linfoma T de Lennert humana KT3, o la célula dependiente de IL-6 MH60.BSF2 se cultiva, donde se agrega IL-6, y puede evaluarse la actividad utilizando la incorporación de ³H-timidina en la célula dependiente de IL-6 en la coexistencia del antagonista de IL-6.

Alternativamente, U266, una célula que expresa al receptor de IL-6, puede cultivarse, a la cual se agrega IL-6 rotulado con ¹²⁵I y se agrega un antagonista de IL-6 al mismo tiempo, y luego se determina la IL-6 rotulada con ¹²⁵I unida a la célula que expresa al receptor de IL-6. En el sistema de ensayos antes mencionado, se arregla un grupo control negativo que no contiene antagonista de IL-6 alguno, además del grupo en el cual un antagonista del receptor de IL-6 está presente, y los resultados obtenidos para ellos se comparan para evaluar la actividad inhibitoria de IL-6 del antagonista de IL-6.

Según lo descrito en el Ejemplo que aparece más adelante, el anticuerpo anti-receptor de IL-6 exhibió un efecto terapéutico sobre trastornos del oído interno, sugiriendo que los antagonistas de IL-6 tales como el anticuerpo anti-receptor de IL-6 son eficaces como un agente terapéutico para trastornos del oído interno.

El sujeto a ser tratado en la presente invención es un mamífero. El sujeto mamífero a ser tratado es preferentemente un ser humano.

Los agentes preventivos o terapéuticos de la presente invención pueden administrarse, ya sea por vía oral o parenteral, en forma sistémica o local. Por ejemplo, puede seleccionarse la inyección intravenosa tal como infusión gota a gota, inyección intramuscular, inyección intrapleural, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea, supositorios, lavado intestinal, comprimidos recubiertos entéricos orales y similares, y el método de administración puede seleccionarse, según lo apropiado, dependiendo de la edad y de la condición del paciente. La dosis eficaz se escoge del rango de 0,01 mg a 100 mg por kg de peso corporal por administración. Alternativamente, puede seleccionarse una dosis en el rango de 1 a 1000 mg, preferentemente de 5 a 50 mg por paciente.

Las dosis preferidas y los métodos preferidos de administración son tales que, en el caso del anticuerpo anti-receptor de IL-6, las cantidades en donde el anticuerpo libre está presente en la sangre son dosis eficaces. En ejemplos específicos, 0,5 mg a 40 mg por kg de peso corporal, preferentemente 1 mg a 20 mg por mes (4 semanas) se administran en una a varias dosis, por ejemplo en el plan de administración de dos veces por semana, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez cada cuatro semanas y similares mediante inyección intravenosa tal como infusión gota a gota e inyección subcutánea. El plan de administración puede ajustarse observando las condiciones de la enfermedad y los niveles en sangre de los ensayos de laboratorio mediante, por ejemplo, extensión del intervalo de administración de dos veces por semana o una vez por semana a una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas y similares.

Los agentes preventivos y/o terapéuticos para los trastornos del oído interno de la presente invención pueden contener portadores o aditivos

aceptables desde el punto de vista farmacéutico dependiendo de la vía de administración. Ejemplos de ese tipo de portadores o aditivos incluyen al agua, un solvente orgánico aceptable desde el punto de vista farmacéutico, colágeno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, un polímero de carboxivinilo, carboximetilcelulosa sódica, sodio poliacrílico, alginato de sodio, dextrano hidrosoluble, carboximetil almidón sódico, pectina, metilcelulosa, etilcelulosa, goma de xantano, goma arábiga, caseína, gelatina, agar, diglicerina, propilenglicol, polietilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, seroalbúmina humana (HSA, "human serum albumin"), manitol, sorbitol, lactosa, un surfactante aceptable desde el punto de vista farmacéutico y similares. Los aditivos utilizados se seleccionan entre, aunque no se limitan a, los que se mencionaron anteriormente o sus combinaciones dependiendo de la forma de dosificación.

Ejemplos

La presente invención será explicada a continuación en forma más detallada con referencia a los ejemplos de elaboración y los ejemplos de referencia. Sin embargo, debería señalarse, que la presente invención no se encuentra limitada a los mismos de manera alguna.

Ejemplo 1

Procedimiento Experimental

(1) Medición de la capacidad auditiva de ratones antes de la carga acústica

Para ratones C57BL/6J machos de 4 semanas de edad se midió la capacidad auditiva mediante la respuesta auditiva evocada por el cerebro (ABR, "auditory brainstem response") al día anterior a la carga acústica. Antes de la medición, se inyectaron intraperitonealmente xiladina y cetamina para efectuar

anestesia suficientemente profunda, y durante la medición se administró más anestesia con cetamina según lo necesario.

(Respuesta Auditiva evocada por el Cerebro) Para saber el aumento de la pérdida de audición inducida por ruido en esta condición de ruido, ensayamos el desplazamiento umbral con respuesta auditiva evocada por el cerebro (ABR). Las mediciones de ABR se llevaron a cabo utilizando almacenamiento en forma de onda y control de estímulo de software Scope del sistema PowerLab (modelo: PowerLab2/20, ADInstruments CastleHill, Australia), grabación de EEG con sistema Digital Bioamp de amplificador extracelular (modelo: BAL-1, Tucker-Davis Technologies FL/USA). Se produjeron estímulos sonoros mediante un altavoz del tipo acoplador (modelo: ES1spc, BioResearchCenter Nagoya/ Japón) insertado en el canal auditivo externo de los ratones. Se generaron estímulos de estallido de tonos, tiempo de 0,1ms elevación/ descenso (puerta de coseno) y segmento plano 1ms, y se especificaron las amplitudes mediante generador de sonidos y Procesador de Tiempo Real de Atenuación y Atenuador Programable (modelo: RP2.1 y PA5, Tucker-Davis Technologies FL/USA). La calibración del nivel sonoro se realizó utilizando un Medidor del Nivel Sonoro (modelo: LA-5111, Ono Sokki Yokohama/ Japón). Para el registro, se colocaron electrodos de agujas de acero inoxidable en el vértice y ventro-lateral en los oídos izquierdo y derecho. Generalmente, se registraron las formas de ondas de ABR durante 12,8 ms a un índice de muestreo de 40.000 Hz utilizando fijaciones de filtro de paso de banda de 50-5000 Hz, se promediaros formas de ondas de 256 estímulos a una frecuencia de 9 Hz. Las formas de ondas de ABR se registraron en intervalos de 5-dB SPL hacia abajo desde una amplitud máxima hasta que no se pudo visualizar ninguna forma de onda. Las frecuencias de sonidos dados para la medición del nivel umbral de capacidad auditiva fueron tres tipos de 4 kHz, 12 kHz y 20 kHz, y se midió el nivel umbral de capacidad auditiva de cada uno.

(2) Creación del modelo de pérdida de audición

En un instrumento de carga acústica (un instrumento en el cual el ruido enmascarante de la Audiometría RION AA67N se utilizó como el sonificador, y como el amplificador se utilizó un SONY SRP-P150 y un FOSTEX D-1405 para la amplificación, y luego se cargó con un altavoz que tiene un diámetro de aproximadamente 12 cm en un espacio cerrado), los ratones fueron alojados en una jaula de malla metálica con una altura de 3 cm que se dejó parada directamente, a una distancia de 1 cm, bajo el altavoz. La jaula se dividió en compartimentos radialmente mediante redes metálicas con propiedades similares, y se alojaron simultáneamente cuatro animales en cámaras separadas. Luego, bajo la condición que se había establecido previamente para proporcionar una presión sonora de 124 ± 1 db en el instrumento de carga acústica (una pluralidad de mediciones durante la carga de dos horas mediante un CASELA CEL-231), los animales fueron sometidos a una carga de un sonido muy fuerte durante dos horas. La carga acústica utilizada fue de 4 kHz de ruido de banda Octava SPL. Asimismo, se colocó un termómetro en el instrumento de la carga acústica para determinar la temperatura antes y después de la carga acústica.

(3) Administración del fármaco

Después del ítem (2) anterior, los animales fueron divididos en dos grupos (A y B), y se administraron inmediatamente 2 mg/cuerpo de IgG y 2 mg/cuerpo de MR16-1 (el anticuerpo humanizado anti-IL-6R preparado en el Ejemplo de Referencia 4) a las ratas de cada grupo. La administración se fijó como un ensayo ciego, y se les informó a los técnicos de la administración de cada grupo hasta el final de la medición de la capacidad auditiva.

(4) Medición del nivel umbral de capacidad auditiva

De manera similar al ítem (1) anterior, se midió la capacidad auditiva una semana después de la carga acústica y de la administración del fármaco.

Después de confirmar la anestesia profunda, los ratones después de la medición fueron decapitados para extraer el hueso temporal, el cual se fijó y luego se almacenó para examen histológico.

(5) Análisis de resultados

Se tomó la diferencia entre la capacidad auditiva obtenida en el ítem (4) anterior y la capacidad auditiva antes del tratamiento obtenido en el ítem (1) anterior para cada individuo, y se calculó el grado de reducción en el nivel umbral de la capacidad auditiva (dB). El grado de reducción medio en el nivel umbral de la capacidad auditiva (dB) se calculó para cada uno de los grupos de administración de MR16-1 y el grupo control para cada frecuencia.

Resultados

Para un animal que murió en el momento de la anestesia en el ítem (4) anterior, no se pudo medir la capacidad auditiva, y por ende fue excluido. La cantidad de animales para los cuales se obtuvo el grado de nivel umbral de capacidad auditiva fue $n = 4$ para el grupo de administración de MR16-1 y $n = 2$ para el grupo de administración de IgG. La temperatura en el instrumento de carga acústica fue de 25°C antes de la carga y 27°C después de la carga. Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 1 y en la Fig. 1.

Tabla 1

Frecuencia utilizada	grupo control de administración de IgG	grupo de administración de MR16-1	Diferencia en cambios en el nivel umbral
4 kHz	22,5	37,5	-15
12 kHz	35	27,5	+ 7,5
20 kHz	55	28,8	+26,3

Discusión

El trauma acústico es una fuerza externa física que se denomina presión sonora, y por ende, el modelo utilizado en este experimento se considera que es un modelo de daño tisular físico de la cóclea. En este experimento, se han aplicado sonidos muy fuertes que se centralizan en una frecuencia de 4 kHz. En la cóclea, los sensores que perciben sonidos están espacialmente dispersados dependiendo de la frecuencia (tonotrópico), y así el hecho de que la reducción de la capacidad auditiva en el grupo control es significativa a 4 kHz y se vuelve más pequeña a medida que se aleja a la región de alta frecuencia puede comprenderse por el hecho de que puesto que el sonido muy fuerte se cargó en la región de 4 kHz el tejido cercano a la región es más severamente dañado.

Por otro lado, en el grupo de administración de anticuerpo del receptor de IL-6, a 12 kHz y 20 kHz, la reducción en la capacidad auditiva ha sido más suprimida en comparación con el grupo control a medida que se aleja del sitio en el cual se cargó el sonido muy fuerte y el tejido fue directamente dañado. Lo que antecede sugiere que el anticuerpo del receptor de IL-6 tiene un efecto de suprimir la progresión especial de la reducción de la capacidad auditiva en el daño tisular en la cóclea, es decir pérdida auditiva sensorineural en los trastornos del oído interno, o tiene un efecto de suprimir la reducción de la capacidad auditiva en la región de alta frecuencia en la pérdida de audición sensorineural.

Ejemplo 2. La expresión de citoquinas inflamatorias en la cóclea después de trauma acústico.

Se creó un modelo de pérdida de audición utilizando ratas SD machos de 3-4 semanas de edad mediante un método similar al Ejemplo 1. A 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas, 3 días, 5 días, 7 días y 28 días después de la carga acústica, se extrajo de cada rata el hueso temporal. Mientras se tenía cuidado de evitar que la linfa en la cóclea se filtre, solo se extrajo la cóclea, y se determinó la expresión de diversas citoquinas inflamatorias mediante el método de RT-PCR. El

resultado se muestra en la Fig. 2. Como puede observarse de la Fig. 2, en la cóclea del modelo de trauma acústico, se notó la expresión elevada de TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , antagonista del receptor de IL-1 (IL-1RA) y IL-6. Por otro lado, no se observó expresión alguna de IL-12p40 o GM-CSF.

Luego, se determinaron los cambios en TNF- α , IL-6 y IL-1 β con el transcurso del tiempo mediante un método de RT-PCR cuantitativo. El método de RT-PCR cuantitativo empleó 18S ARNr como control interno (gen de referencia) y analizó los datos mediante el método $\Delta\Delta C_t$. Los resultados se muestran en la Fig. 3 a la Fig. 5. Como puede observarse a partir de la Fig. 3 a la Fig. 5, la expresión de TNF- α , IL-1 β y IL-6 se notó indicando el pico de la cantidad expresada en etapas tempranas dentro de 24 horas después del trauma acústico.

Asimismo, utilizando el tejido a las seis horas después de la carga acústica, las secciones liofilizadas fueron manchadas inmunohistológicamente. Los animales utilizados fueron ratas SD, se creó un modelo de pérdida de audición como en el Ejemplo 1, y los animales fueron decapitados seis horas después de la carga de ruido. Después de extraer el hueso temporal inmediatamente, se fijó en 4% paraformaldehído durante seis horas, y se desmineralizó con una solución de EDTA de 0,5 mol/l para obtener una muestra, la cual fue rápidamente congelada en nitrógeno líquido y se cortó a un espesor de 7 μ m utilizando el criostato (CM3000, Leica) para obtener una sección liofilizada. La sección se manchó inmunohistológicamente. La mancha utilizó el kit Vectastain ABC, y se utilizó la solución DAB para el desarrollo de color. Como el control de mancha, se adoptó una mancha realizada sin el agregado del anticuerpo primario. Los resultados se muestran en la Fig. 6 a la Fig. 7. Como puede observarse de la Fig. 6 a la Fig. 7, en la cóclea a las seis horas después de la carga acústica, se notó la expresión de IL-6 en la membrana de basamento directamente debajo de la pared lateral coclear y el órgano de Corti.

Ejemplo 3. Confirmación de la eficacia de la administración sistémica de un antagonista de IL-6

De manera similar al Ejemplo 1, ratones C57BL/6J machos fueron sometidos a una carga de un sonido muy fuerte de 124 dB durante dos horas, seguido inmediatamente por la administración intraperitoneal de MR16-1 a 2 mg/cuerpo y IgG de rata a 2 mg/cuerpo. Ocho horas después de la administración del anticuerpo, se extrajo el hueso temporal y se extrajeron los oídos internos bilaterales para cortar el órgano de Corti, los cuales se dividieron en la primera rotación (ápex) y la segunda rotación (basal), y cada una de ellas se recogió tanto del lado izquierdo como del lado derecho, y se combinaron. Utilizando el método de Western blot, se determinó la expresión de STAT3, Erk y Akt total, y STAT3, Erk y Akt fosforilados. El resultado se muestra en la Fig. 8. Como puede observarse de la Fig. 8, las señales de STAT3 fosforilado, Erk fosforilado y Akt fosforilado que se notaron fuertemente en el grupo control fueron suprimidas en el grupo de administración de MR16-1. Este resultado confirmó que MR16-1 administrado sistémicamente exhibe eficacia en la cóclea.

Este resultado y el resultado del Ejemplo 2 sugieren que el efecto por MR16-1 de suprimir las señales de IL-6 expresadas en la cóclea inmediatamente después del trauma acústico contribuye al mecanismo de acción de suprimir la reducción de la capacidad auditiva mediante la administración intraperitoneal de MR16-1 mostrado en el Ejemplo 1.

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

Se preparó el receptor de IL-6 soluble mediante el método de PCR utilizando un plásmido pBSF2R.236 que contenía ADNc que codifica al receptor de IL-6 obtenido de acuerdo con el método de Yamasaki y otros, (Yamasaki, K. y otros, Science (1988) 241, 825- 828). El plásmido pBSF2R.236 fue digerido con una enzima de restricción Sph I para obtener el ADNc del receptor de IL-6, el cual

fue luego insertado en mp18 (manufacturado por Amersham), Utilizando un oligocebador sintético diseñado para introducir un codon de detención en el ADNc del receptor de IL-6, se introdujo una mutación en el ADNc del receptor de IL-6 mediante el método de PCR utilizando el Sistema de Mutagénesis in vitro (manufacturado por Amersham). El procedimiento dio como resultado la introducción de un codon de detención al aminoácido en posición 345, y dio ADNc que codifica al receptor de IL-6 soluble.

A fin de expresar el ADNc de receptor de IL-6 soluble en células CHO, se ligó a un plásmido pSV (manufacturado por Pharmacia) para obtener un plásmido pSVL344. El ADNc de receptor de IL-6 soluble que se disoció con Hind III-Sal I se insertó al plásmido pECEdhfr que contenía el ADNc de dhfr para obtener un plásmido pECEdhfr344 que puede ser expresado en las células CHO.

Diez ug de plásmido pECEdhfr344 se transfectaron a una línea de células dhfr-CHO DXB-11 (Urlaub G. y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4216-4220) mediante el método de precipitación con fosfato de calcio (Chen C. y otros, Mol. Cell. Biol. (1987) 7, 2745- 2751). Las células CHO transfectadas fueron cultivadas durante 3 semanas en un medio de selección α MEM libre de nucleósido que contenía 1 mM de glutamina, 10% de FCS dializado, 100 U/ml de penicilina, y 100 ug/ml de estreptomycin.

Las células CHO seleccionadas fueron seleccionadas mediante el método de dilución limitativa para obtener un único clon de célula CHO. El clon de célula CHO fue amplificado en metotrexato (MTX) 20 nM – 200 nM para obtener una línea de células CHO 5E27 que produce receptor de IL-6 soluble humano. La línea de células CHO 5E27 se cultivó en un medio de Dulbecco modificado con Iscov (IMDM, manufacturado por Gibco) que contenía 5% de FBS. El sobrenadante del cultivo se recogió y se determinó la concentración del receptor de IL-6 soluble en el sobrenadante de cultivo mediante ELISA. El resultado

confirmó que el receptor de IL-6 soluble está presente en el sobrenadante de cultivo.

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

Diez μ g de la IL-6 recombinante (Hirano y otros, Immunol. Lett., (1988) 17, 41) se inmunizaron a ratones BALB/c junto con adyuvante completo de Freund, y esto se repitió cada semana hasta que el anticuerpo anti-IL-6 pudo ser detectado en el suero. Las células inmunes fueron extraídas de nódulos linfáticos locales y luego fueron fusionadas con una línea de células de mieloma P3U1 utilizando polietilenglicol 1500. Se seleccionaron los hibridomas de acuerdo con el método de Oi y otros (Selective Methods in Cellular Immunology, W.H. Freeman and Co., San Francisco, 351, 1980) que emplea el medio HAT, y se estableció el hibridoma que produce anticuerpo anti-IL-6 humana.

El hibridoma que produce anticuerpo anti-IL-6 humana se sometió al ensayo de unión a IL-6 de la siguiente manera. Por lo tanto, una placa de microtítulo de 96 pocillos preparada de polivinilo flexible (manufacturada por Dynatech Laboratories, Inc., Alexandria, VA) se revistió con 100 μ l de Ig anti-ratón de cabra (10 μ l/ml, manufacturada por Cooper Biomedical, Inc., Malvern, PA) durante la noche a 4°C en buffer de carbonato- carbonato hidrogenado 0,1 M, pH 9,6. Subsiguientemente, la placa se trató con 100 μ l de PBS que contenía 1% de seroalbúmina bovina (BSA) a temperatura ambiente durante 2 horas.

Después del lavado en PBS, se agregaron 100 μ l del sobrenadante de cultivo de hibridoma a cada pocillo, y luego se incubó durante la noche a 4°C. La placa se lavó, se agregó IL-6 recombinante rotulada con ^{125} I a cada pocillo a una concentración de 2000 cpm/0,5 ng/pocillo, y luego se determinó la radioactividad de cada pocillo después del lavado mediante un contador gamma (Beckman Gamma 9000, Beckman Instruments, Fullerton, CA). De 216 clones de hibridoma, 32 fueron positivos en el ensayo de unión a IL-6. De estos clones, se obtuvo

finalmente MH166.BSF2 estable. El anticuerpo anti-IL-6 MH166 producido por dicho hibridoma tiene un subtipo de IgG1 κ .

A continuación, se utilizó el clon de hibridoma de ratón dependiente de IL-6 MH60.BSF2 para examinar una actividad neutralizante con respecto al crecimiento del hibridoma por el anticuerpo MH166. Las células MH60.BSF2 fueron dispensadas hasta 1×10^4 /200 μ l/pocillo, y se agregaron muestras que contenían anticuerpo MH166 a las mismas, se cultivaron durante 48 horas, se agregaron 0,5 μ Ci/pocillo de ^{3} H-timidina (New England Nuclear, Boston, MA), y se continuó el cultivo durante otras 6 horas. Las células se colocaron sobre un papel de filtro de vidrio y se trataron por el recolector automático (Labo Mash Science Co., Tokio, Japón). Como el control, se utilizó anticuerpo anti-IL-6 de conejo.

Como resultado, el anticuerpo MH166 inhibió, en forma dependiente de la dosis, la incorporación de ^{3} H-timidina de células MH60.BSF2 inducida por IL-6. Esto reveló que el anticuerpo MH166 neutraliza la actividad de IL-6.

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

El anticuerpo anti-receptor de IL-6 MT18 preparado mediante el método de Hirata y otros (Hirata, Y. y otros, J. Immunol., (1989) 143, 2900- 2906) se unió a Sepharose 4B CNBr-activado (manufacturado por Pharmacia Fine Chemicals, Piscataway, NJ) de acuerdo con el régimen anexo, y se purificó el receptor de IL-6 (Yamasaki, K. et al., Science (1988) 241, 825-828). Se solubilizó una línea celular de mieloma humano U266 con clorhidrato de fluoruro de p-para-aminofenilmetansulfonilo 1 mM (manufacturado por Wako Chemicals) (buffer de digitonina) que contenía 1% de digitonina (manufacturada por Wako Chemicals), trietanolamina 10 mM (pH 7,8) y NaCl 0,15 M, y se mezcló con anticuerpo MT18 unido a perlas de Sepharose 4B. Luego, las perlas se lavaron seis veces con el

buffer de digitonina para preparar el receptor de IL-6 parcialmente purificado a ser utilizado para inmunización.

Los ratones BALB/c fueron inmunizados cuatro veces cada diez días con el receptor de IL-6 parcialmente purificado antes mencionado obtenido de 3×10^9 células U266, y luego se preparó un hibridoma utilizando un método estándar. El sobrenadante del cultivo del hibridoma del pocillo de crecimiento positivo se ensayó para determinar su actividad de unión al receptor de IL-6 de acuerdo con el método descrito más adelante. Se rotularon 5×10^7 células U266 con ^{35}S -metionina (2,5 mCi) y se solubilizaron con el buffer de digitonina antes mencionado. Las células U266 solubilizadas se mezclaron con un volumen de 0,04 ml de anticuerpo MT18 unido a perlas Sepharose 4B, y luego se lavaron seis veces con el buffer de digitonina. Se eluyó el receptor de IL-6 rotulado con ^{35}S -metionina con 0,25 ml del buffer de digitonina (pH 3,4) y se neutralizó en 0,025 ml de Tris 1M (pH 7,4).

Se mezclaron 0,05 ml del sobrenadante del cultivo del hibridoma con 0,01 ml de Sepharose de Proteína G (manufacturada por Pharmacia). Después del lavado, Sepharose se incubó con 0,005 ml de solución del receptor de IL-6 rotulado con ^{35}S preparada según lo antes descrito. Se analizó el inmunoprecipitado mediante SDS-PAGE para investigar el sobrenadante del cultivo del hibridoma que reacciona con el receptor de IL-6. Como resultado, se estableció un clon PM-1 de hibridoma positivo a la reacción (FERM BP-2998). El anticuerpo producido a partir del hibridoma PM-1 tiene un subtipo de IgG1 κ .

La actividad Inhibitoria por el anticuerpo producido mediante el hibridoma PM-1 sobre la unión de IL-6 al receptor de IL-6 humano se estudió utilizando la línea celular de mieloma humana U266. Se preparó una IL-6 recombinante humana a partir de E. coli (Hirano 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. y otros, J. Exp. Med. (1987) 166, 967-981).

Se cultivaron 4×10^5 células U266 con el sobrenadante de cultivo de 70% (v/v) de hibridoma PM-1 junto con 14.000 cpm de IL-6 rotulada con ^{125}I durante una hora. Se colocó en capas 70 μl de la muestra sobre 300 μl de FCS en un tubo de polietileno de microcentrifugación. Después de la centrifugación, se determinó la radioactividad de la célula.

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

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

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

Las células CHO que producen el receptor de IL-6 soluble de ratón se cultivaron en el líquido de cultivo IMDM que contenía 10% FCS. Del sobrenadante de cultivo, se purificó el receptor de IL-6 soluble de ratón utilizando columna de afinidad en la cual el anticuerpo del receptor de IL-6 anti-ratón RS12 (véase Saito, et al., más arriba) se había fijado al gel Affigel 10 (manufacturado por Biorad).

El receptor de IL-6 soluble de ratón (50 μg) así obtenido se mezcló con adyuvante completo de Freund, y luego se inyectó al abdomen de ratas Wistar. Desde dos semanas después de la administración, los animales fueron reforzados con adyuvante incompleto de Freund. Al día 45, se recolectaron las células de bazo de las ratas, y se fusionaron aproximadamente 2×10^8 células del mismo con 1×10^7 células de mieloma de ratón P3U1 utilizando un 50% PEG1500 (manufacturado por Boehringer Mannheim) de acuerdo con el método convencional, y luego se seleccionaron mediante el medio de cultivo HAT.

Después de agregarse el sobrenadante del cultivo del hibridoma a la placa revestida con anticuerpo de IgG anti-rata de conejo (manufacturado por Cappel), el receptor de IL-6 anti-ratón de conejo reaccionó. Posteriormente, utilizando el anticuerpo del receptor de IL-6 anti-ratón de conejo y IgG anti-conejo de oveja rotulado con fosfatasa alcalina, se seleccionaron los hibridomas que producen anticuerpo dirigido contra el receptor de IL-6 soluble de ratón mediante ELISA. Los clones de hibridoma para los cuales se confirmó la producción del anticuerpo se subseleccionaron dos veces para obtener un único clon de hibridoma. El clon fue designado MR16-1.

Se examinó la actividad neutralizante del anticuerpo producido mediante el hibridoma en transducción de señal de IL-6 de ratón mediante la incorporación de ^3H -timidina utilizando células MH60.BSF2 (Matsuda, T. et al., J. Immunol. (1988) 18, 951-956). A una placa de 96 pocillos, se prepararon células MH60.BSF2 a 1×10^4 células /200 ul/pocillo. A la placa se agregaron 10 pg/ml de IL-6 de ratón y anticuerpo MR16-1 o anticuerpo RS12 a 12,3 – 1000 ng/ml, luego se cultivaron a 37°C y 5% CO_2 durante 44 horas, y luego se agregó 1 uCi/pocillo de ^3H -timidina. Después de 4 horas, se midió la incorporación de ^3H -timidina. Como resultado, el anticuerpo MR16-1 suprimió la incorporación de ^3H -timidina por las células MH60.BSF2.

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

REIVINDICACIONES

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

1. Un agente terapéutico y/o preventivo para trastornos del oído interno que comprende un antagonista de IL-6 como un ingrediente activo.
2. El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dichos trastornos del oído interno son pérdida de audición sensorineural.
3. El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 2 en donde dicha pérdida de la audición sensorineural es pérdida de la audición sensorineural causada por la enfermedad de Meniere, trastornos del oído interno inducidos por fármacos, trastornos del oído interno virales, trastornos del oído interno purulentos, fractura de hueso temporal o tumor del nervio acústico.
4. El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 2 en donde dicha pérdida de la audición sensorineural es sordera súbita, sordera senil o sordera por ruidos.
5. El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dichos trastornos del oído interno son trastornos vestibulares.
6. El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 5 en donde dichos trastornos vestibulares son trastornos vestibulares causados por la enfermedad de Meniere, neuronitis vestibular o trastornos del oído interno inducidos por fármacos.

7. El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde dicho antagonista de IL-6 es un anticuerpo contra el receptor de IL-6.

8. El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 7 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6.

9. El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 8 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano.

10. El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 8 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón.

11. El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo recombinante.

12. El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 9 en donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano es el anticuerpo PM-1.

13. El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 10 en donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón es el anticuerpo MR16-1.

14. El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 13 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano contra el receptor de IL-6.

15. El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 14 en donde dicho anticuerpo humanizado contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo PM-1 humanizado.
16. El uso de un antagonista de IL-6 para la manufactura de un agente terapéutico y/o preventivo para trastornos del oído interno.
17. El uso de acuerdo con la reivindicación 16 en donde dichos trastornos del oído interno son pérdida de audición sensorineural.
18. El uso de acuerdo con la reivindicación 17 en donde dicha pérdida de audición sensorineural es pérdida de audición sensorineural causada por la enfermedad de Meniere, trastornos del oído interno inducidos por fármacos, trastornos del oído interno virales, trastornos del oído interno purulentos, fractura de hueso temporal o tumor del nervio acústico.
19. El uso de acuerdo con la reivindicación 17 en donde dicha pérdida de la audición sensorineural es sordera súbita, sordera senil o sordera por ruidos.
20. El uso de acuerdo con la reivindicación 16 en donde dichos trastornos del oído interno son trastornos vestibulares.
21. El uso de acuerdo con la reivindicación 20 en donde dichos trastornos vestibulares son trastornos vestibulares causados por la enfermedad de Meniere, neuritis vestibular o trastornos del oído interno inducidos por fármacos.
22. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 16 a 21 en donde dicho antagonista de IL-6 es un anticuerpo contra el receptor de IL-6.
23. El uso de acuerdo con la reivindicación 22 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6.

24. El uso de acuerdo con la reivindicación 23 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano.

25. El uso de acuerdo con la reivindicación 23 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón.

26. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo recombinante.

27. El uso de acuerdo con la reivindicación 24 en donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano es el anticuerpo PM-1.

28. El uso de acuerdo con la reivindicación 25 en donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón es el anticuerpo MR16-1.

29. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 22 a 28 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano contra el receptor de IL-6.

30. El uso de acuerdo con la reivindicación 29 en donde dicho anticuerpo humanizado contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo PM-1 humanizado.

31. Un método terapéutico y/o preventivo para trastornos del oído interno de un sujeto el cual comprende administrar un antagonista de IL-6 al sujeto.

32. El método terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 31 en donde dichos trastornos del oído interno son pérdida de audición sensorineural.

33. El método terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 32 en donde dicha pérdida de la audición sensorineural es pérdida de la audición sensorineural causada por la enfermedad de Meniere, trastornos del oído interno inducidos por fármacos, trastornos del oído interno virales, trastornos del oído interno purulentos, fractura de hueso temporal o tumor del nervio acústico.

34. El método terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 32 en donde dicha pérdida de la audición sensorineural es sordera súbita, sordera senil o sordera por ruidos.

35. El método terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 31 en donde dichos trastornos del oído interno son trastornos vestibulares.

36. El método terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 35 en donde dichos trastornos vestibulares son trastornos vestibulares causados por la enfermedad de Meniere, neuritis vestibular o trastornos del oído interno inducidos por fármacos.

37. El método terapéutico y/o preventivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 31 a 36 en donde dicho antagonista de IL-6 es un anticuerpo contra el receptor de IL-6.

38. El método terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 37 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6.

39. El método terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 38 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano.

40. El método terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 38 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón.

41. El método terapéutico y/o preventivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 37 a 40 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo recombinante.

42. El método terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 39 en donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano es el anticuerpo PM-1.

43. El método terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 40 en donde dicho anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón es el anticuerpo MR16-1.

44. El método terapéutico y/o preventivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 37 a 43 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo humano contra el receptor de IL-6.

45. El método terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 44 en donde dicho anticuerpo humanizado contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo PM-1 humanizado.

p: CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA*KEIO UNIVERSITY.

RESUMEN

Un método terapéutico y/o preventivo para trastornos del oído interno que comprende un antagonista de IL-6, preferentemente un anticuerpo anti-IL-6R, como un ingrediente activo.

1/7

Fig.1

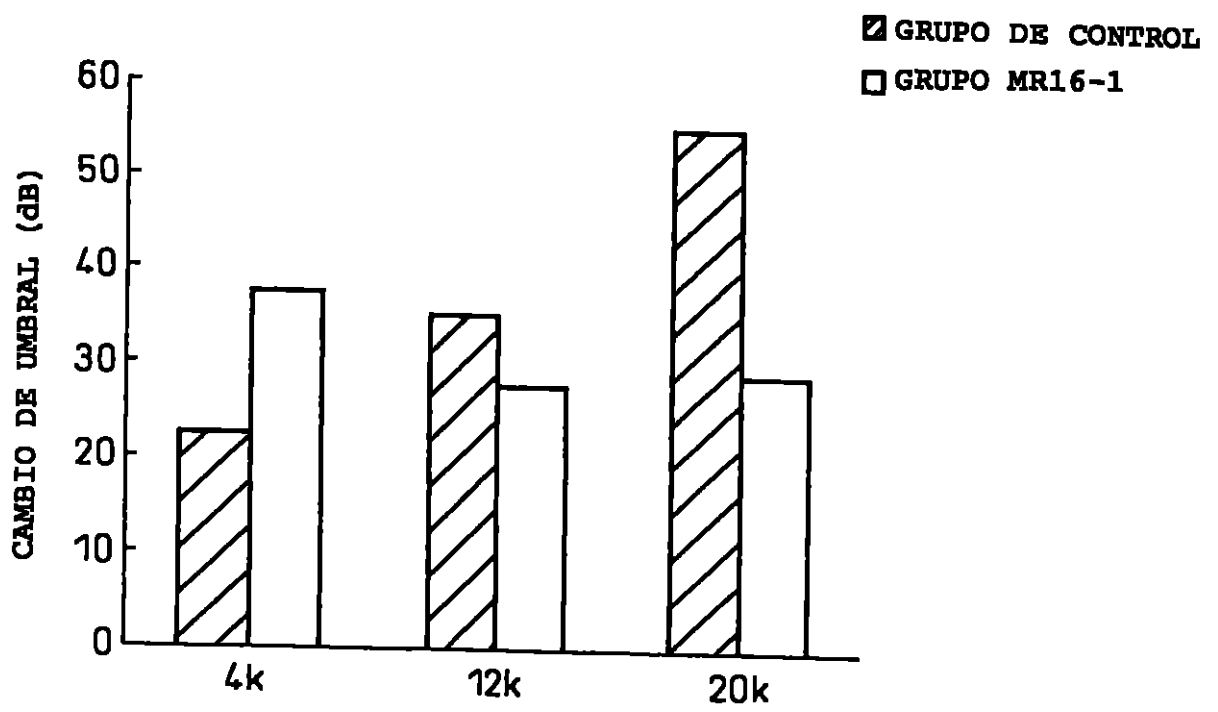
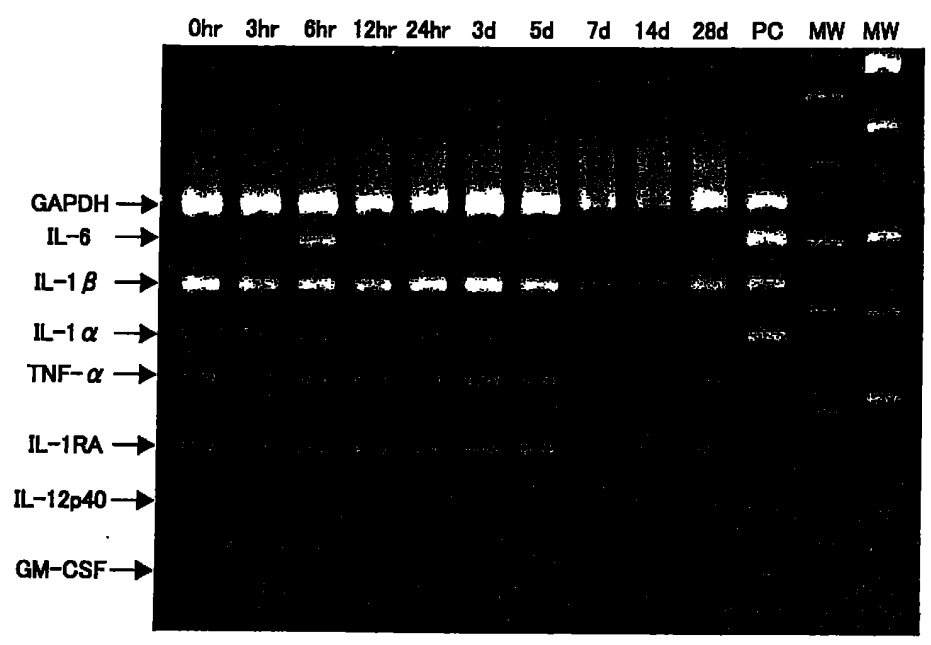


Fig.2



2/7

23

3/7

Fig.3

TNF α

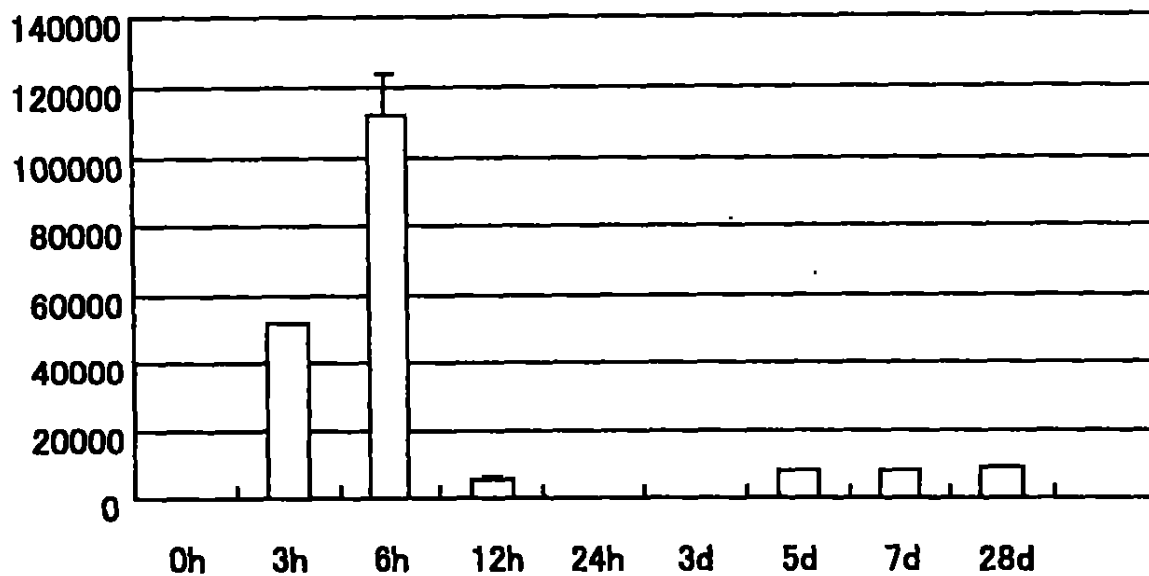
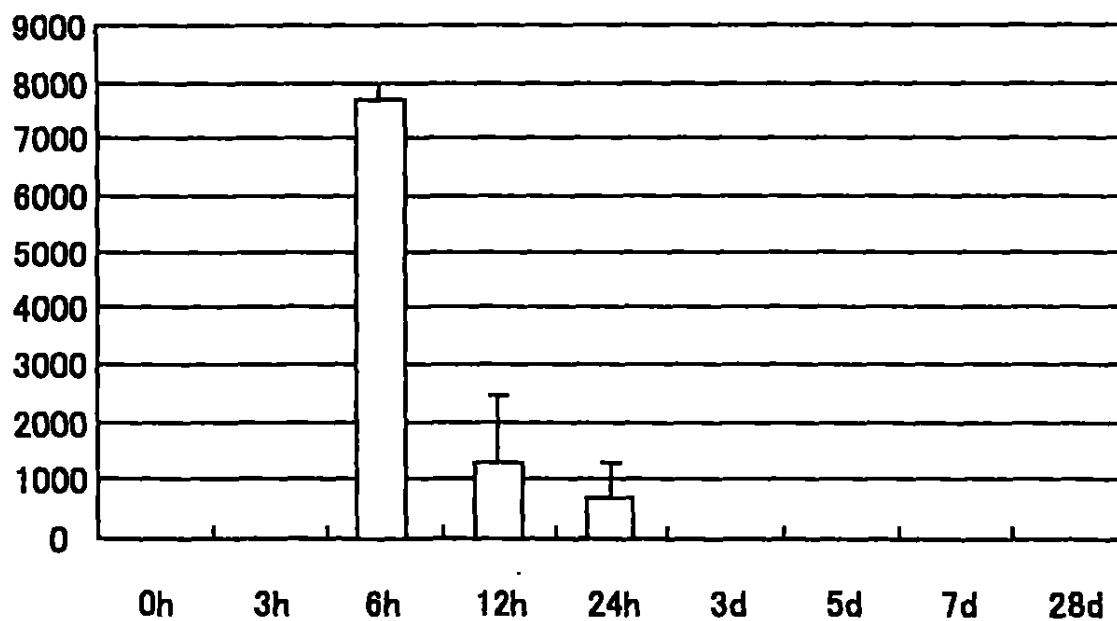


Fig.4

IL6



240
140

4/7

Fig. 5

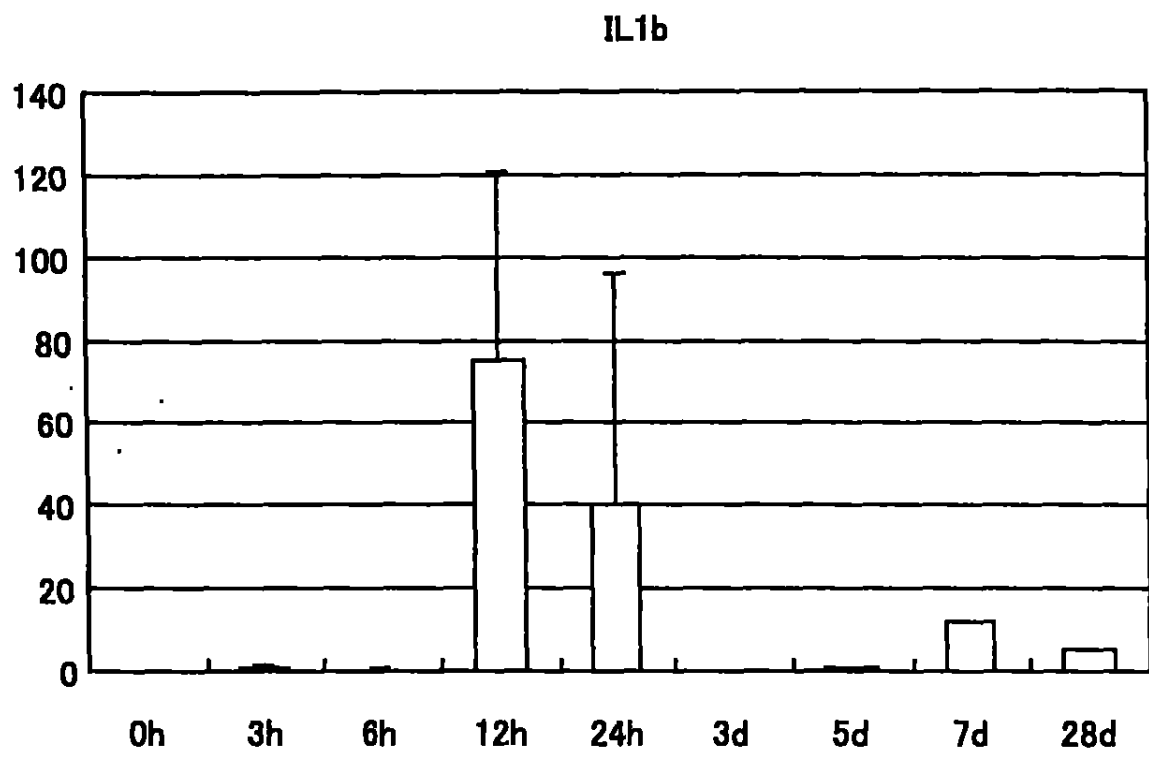


Fig.6



JUSTO POR DEBAJO DEL ORGANO DE CORTI (++)

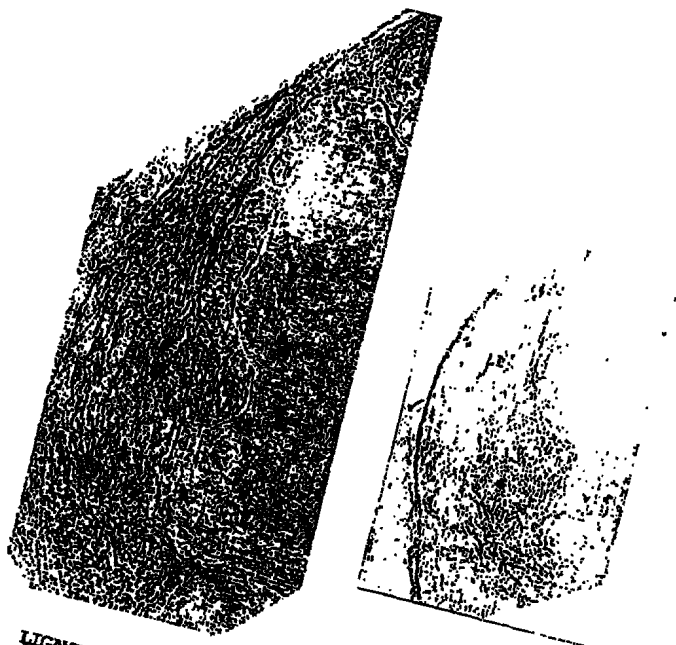
CONTROL NEGATIVO



5/7

THI

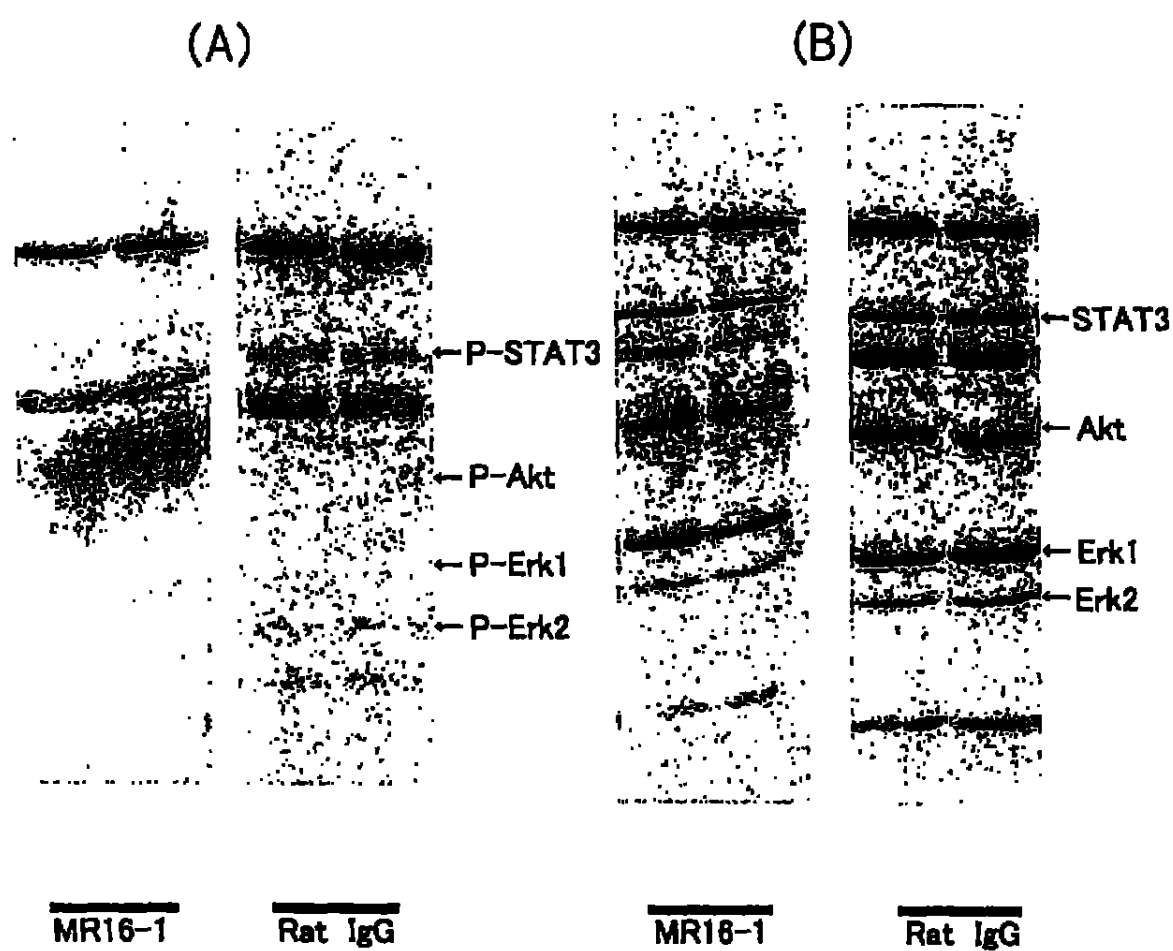
Fig. 7



LIGAMENTO ESPIRAL (+),
ESTRIA VASCULARIS (-)

7/7

Fig.8



144

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006202

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl¹ A61K45/00, 39/395, A61P19/08, 25/02, 27/16, 29/00, 31/12, 35/00, 43/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl¹ A61K45/00, 39/395, A61P19/08, 25/02, 27/16, 29/00, 31/12, 35/00, 43/00

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005

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

CA (STN), MEDLINE (STN), BIOSIS (STN), EMBASE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2001/000456 A1 (Edward L. Tobinick), 21 June, 2001 (21.06.01), Full text & JP 2002-537356 A & WO 00/50079 A1	1-30
A	Hitoshi SATO, Tumor Necrosis Factor- α , an Initiator, and Etanercept, an Inhibitor of Cochlear Inflammation., Laryngoscope., 2002, Vol.112, No.9, page 1627 to 1634	1-30
A	Tatsuya TAMURA, Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6, Proc.Natl.Acad.Sci., USA, 1993, Vol.90, pages 11924 to 11928	7-8, 10, 13, 22-23, 25, 28

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

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

"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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
12 May, 2005 (12.05.05)

Date of mailing of the international search report
31 May, 2005 (31.05.05)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006202

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Yuichi HIRATA, Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies, J.Immunol., 1989, Vol.143, No.9, pages 2900 to 2906	7-9, 12, 22-24, 27
A	WO 92/19759 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 12 November, 1992 (12.11.92), Full text & JP 5-227970 A & EP 628639 A1	7-9, 11-12, 14-15, 22-24, 26-27, 29-30
A	Tadashi MATSUDA, Establishment of an interleukin 6(IL6)/B cell stimulatory factor 2-dependent cell line and preparation of anti-IL6 monoclonal antibodies, Eur.J. Immunol., 1988, Vol.18, No.6, pages 951 to 956	7-9, 22-24

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2005/006202

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

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

1. ☒ Claims Nos.: 31-45
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 31 to 45 are relevant to methods for treatment of the human body by surgery or therapy and diagnostic methods.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/006202

Claims 1-6 and 16-21 relate to a therapeutic and/or preventive agent for auris interna disorder containing as an active ingredient a substance defined on the basis of the desired property "IL-6 antagonist". Although the claims 1-6 and 16-21 cover all the substances with the above property, only some of the claimed substances are disclosed within the meaning of PCT Article 5. Consequently, it appears that the support by disclosure in the description within the meaning of PCT Article 6 is lacking.

Further, as with respect to the "IL-6 antagonist" the scope of substances with this property cannot be identified even if technical common knowledge at the time of filing of this application is taken into account, the claims 1-6 and 16-21 also fail to satisfy the requirement of clarity under PCT Article 6.

Therefore, search has been conducted on the relationship between IL-6 antagonist and auris interna disorder and on therapeutic and/or preventive agents for auris interna disorder containing, as an active ingredient, antibodies against IL-6 receptor that have been particularly described in the description and identified in claims 7-15 and 22-30. With respect to claims 7-15 and 22-30, complete search has been carried out.

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

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約〕

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則7.1に従い発行される

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

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

摩本 忠三

寄託者

殿

あて名

⑤ 584

大阪府富田林市中野町3丁目5番31号

I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

H2101-PIBIBSF2R

(受託番号)

微工研条寄第 2232 号

(FERM BP- 2232)

II. 科学的性質及び分類学上の位置

I 欄の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

☐ 科学的性質

☒ 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は 9日 (原寄託日) に受領した I 欄の微生物を受託する。

IV. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

名称:

Agency of

Research Institute
Science and Technology

所長 鈴木智

Tomoo

. DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県

1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi

305, JAPAN

便番号 3 0 5)

1989) 1月 9日

DEPOSITOR
Name Tadamitsu Kishimoto

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

149
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

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

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the (Deposition Number)
DEPOSITOR: HB101-pIBIBSF2R

FERM BP-2232

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

a scientific description

x a proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

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

IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Fermentation Research Institute

Agency of Industrial Science and Technology

Director General Tomoo Suzuki

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

January 9, 1989

特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約

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

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される。

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

原寄託についての受託証

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

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

Depositor
Name: CHUGAI SEIYAKU
KABUSHIKI KAISHA
Representative: Osamu Nagayama

151
BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF
MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF
PATENT PROCEDURE

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

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

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

1. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

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

(Deposition Number)

FERM BP-5875

2. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under 1 above was accompanied by:

- x a scientific description
- x a proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

3. RECEIPT AND ACCEPTANCE

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

4. RECEIPT OF TRANSFER

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

5. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

National Institute of Bioscience and Human-Technology

Agency of Industrial Science and Technology

Director General Michio Oishi

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

March 13, 1997

〔特許手続上の微生物の寄託の国際的承認
に関するブダペスト条約〕

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

下記国際寄託当局によって規則 7. 1 に従い
発行される

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL
DEPOSIT

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

原寄託についての受託証

氏名 (名称)

岸本 忠三

寄託者

あて名 ⑤ 584

殿

大阪府富田林市巾着町 3 丁目 5 番 3 1 号

I. 微生物の表示

(寄託者が付した識別のための表示)

PMI

(受託番号)

微生物研究系 2998 号
(FERM BP- 2998)

II. 科学的性状及び分類学上の位置

1 箇の微生物には、次の事項を記載した文書が添付されていた。

☐ 科学的性状

☒ 分類学上の位置

III. 受領及び受託

本国際寄託当局は、平成 元年 7 月 12 日 (原寄託日) に受領した 1 箇の微生物を受託する。

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

IV. 国際寄託当局

通商産業省工業技術院微生物工業技術研究所

名称:

Agency for Biotechnology Research Institute
Science and Technology

所長 鈴木智

Tomoo Suzuki, DIRECTOR GENERAL.

あて名: 日本国茨城県つくば市 1 丁目 1 番 3 号 (郵便番号 305)
1-3, Higashi 1 chome Tsukuba-shi, Ibaraki-ken
305, JAPAN

平成 2 年 (1990) 7 月 10 日

DEPOSITOR
Name Tadamitsu Kishimoto

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

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

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

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

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

FERM BP-2998

II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:
a scientific description
x a proposed taxonomic designation
(Mark with a cross where applicable)

III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

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

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

IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Fermentation Research Institute
Agency of Industrial Science and Technology
Director General Tomoo Suzuki

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

July 10, 1990



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



154

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.,	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):
Address: 23 St Machar Drive, Aberdeen. AB2 1RY	Date: 12 March 1991

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

155

INTERNATIONAL FORM

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

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

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

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: 06-094692 (22) Fecha de solicitud: 20/09/06 (30) Prioridad (31) 2004-087270 (32) 24/03/04 JP 2004-288800 15/08/04 JP		(51) Int Cl: A61K 045/000 (71) Solicitante(s) CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA Y KEIO UNIVERSITY (72) Inventor(es) MASATO FUJIOKA Y OTROS (74) Apoderado: EMILIO FERRERO	
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 24/10/2006 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 24-03-2005 No. de solicitud PCT/JP2005/006202		(87) Publicación internacional Fecha: 29/08/2005 N° publicación: WO 2005/089802 A1	
(54) Título: AGENTES TERAPÉUTICOS PARA TRASTORNOS DEL OÍDO INTERNO QUE CONTIENEN UN ANTAGONISTA DE IL-6 COMO UN INGREDIENTE ACTIVO			

Reivindicación(es):

- Un agente terapéutico y/o preventivo para trastornos del oído interno que comprende un antagonista de IL-6 como un ingrediente activo.
- El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dichos trastornos del oído interno son pérdida de audición sensorineural.
- El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 2 en donde dicha pérdida de la audición sensorineural es pérdida de la audición sensorineural causada por la enfermedad de Meniere, trastornos del oído interno inducidos por fármacos, trastornos del oído interno virales, trastornos del oído interno purulentos, fractura de hueso temporal o tumor del nervio acústico.
- El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 2 en donde dicha pérdida de la audición sensorineural es sordera súbita, sordera senil o sordera por ruidos o sordera súbita, sordera senil o sordera por ruidos.
- El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 1 en donde dichos trastornos del oído interno son trastornos vestibulares.
- El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 5 en donde dichos trastornos vestibulares son trastornos vestibulares causados por la enfermedad de Meniere, neuritis vestibular o trastornos del oído interno inducidos por fármacos.
- El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde dicho antagonista de IL-6 es un anticuerpo contra el receptor de IL-6.
- El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 7 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6.
- El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 8 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 humano.
- El agente terapéutico y/o preventivo de acuerdo con la reivindicación 8 en donde dicho anticuerpo contra el receptor de IL-6 es un anticuerpo monoclonal contra el receptor de IL-6 de ratón.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 900176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 71,988
FECHA : SEPTIEMBRE 18 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-094692- -00000-0000
Fec: 2006-09-20 16:36:34 Dep. 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTEIMI
Eve: 378 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 157

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	030-00110-6	48872310	18/09/2006	49,351,180.00

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

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

TIPO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Co 14778-841-002-4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
 Rad: 06-094692- -00000-0000
 Fee: 2006-08-20 16:38:34 Dep. 2020 NUECREACIONE
 Tra. 11 PATENTEYII
 Eve: 378 FASENACIONALI
 Asl 411 PRESENTACION Folios: 157



Industria y Comercio
 SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que 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 ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que 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 un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


 Firma Responsable

Fecha 20 de Sep

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
 Conmutador: 3 82 08 40
 Fax: 350 52 20
 E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
 Bogotá, D.C., Colombia

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 159

2020
Bogotá D.C.,

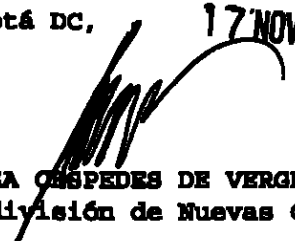
Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA
KEIO UNIVERSITY

REFERENCIA	Radicación No.	06 94692
	Solicitud internacional	PCT/JP2005/006202
	Fecha inicio fase nacional	24/10/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	1756
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

17 NOV. 2006


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

aalvarado