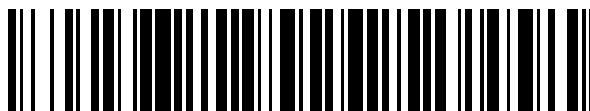


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 382 164**

51 Int. Cl.:
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **06829726 .6**
96 Fecha de presentación: **19.12.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1966244**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2008**

54 Título: **Anticuerpos anti-IL-6 que impiden la unión de la IL-6 en complejo con el IL-6R(α) a la GP130**

30 Prioridad:
30.12.2005 US 755383 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
05.06.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
05.06.2012

73 Titular/es:
**MERCK PATENT GMBH
FRANKFURTER STRASSE 250
64293 DARMSTADT, DE**

72 Inventor/es:
**WAY, Jeffrey C.;
GILLIES, Stephen D.;
LO, Kin-Ming y
LIU, Yuan**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 382 164 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos anti-IL-6 que impiden la unión de la IL-6 en complejo con el IL-6R α a la GP130.

Área de la invención.

Antecedentes de la invención.

5 La interleucina-6 (IL-6) está involucrada en varias enfermedades, incluyendo muchos tipos de cáncer y enfermedades autoinmunes. La interleucina-6 es secretada por muchos tipos de cáncer avanzados, tales como por ejemplo el cáncer de próstata hormono-independiente, y se cree que es un factor de crecimiento para esos tipos de cáncer. Además, se cree que la secreción de la IL-6 por parte de las células cancerígenas causa caquexia, el
10 síndrome de desgaste característico del cáncer avanzado. Por lo tanto, la inhibición de la acción de la IL-6 podría resultar de utilidad en el tratamiento de estos tipos de cáncer.

La IL-6 también juega un papel clave en el desarrollo de los linfocitos B. La enfermedades autoinmunes con un componente significativo de anticuerpos, tales como la artritis reumatoide, podría ser tratada mediante la inhibición de la IL-6. Los trastornos que implican la proliferación de linfocitos B, tales como el mieloma múltiple y el linfoma de linfocitos B, podrían también tratarse mediante la inhibición de la actividad de la IL-6.

15 Además, la IL-6 juega un importante papel en la remodelación ósea al promover la resorción ósea. Los inhibidores de la actividad de la IL-6 tendrían el efecto de reducir la resorción ósea y podrían ser utilizados para el tratamiento de la osteoporosis.

20 Cuando la IL-6 se produce como parte de una enfermedad o trastorno, se encuentra a menudo en complejo con una subunidad del IL-6R α soluble y es con frecuencia secretada a partir de células en la forma de un complejo de ese tipo. Como resultado, no resulta, con frecuencia, útil tratar a un paciente con un anticuerpo u otro inhibidor que bloquee la interacción entre la IL-6 y el IL-6R α , porque un anticuerpo o inhibidor de este tipo puede no producir efecto alguno en un complejo preformado.

25 La presente invención hace referencia a una proteína de fusión que consta de una fracción Fc de un anticuerpo, IL-6R α e IL-6. En particular la invención hace referencia a un anticuerpo anti-IL-6 para el tratamiento del cáncer y de enfermedades autoinmunes promovidas por la IL6, en donde este anticuerpo se obtuvo mediante la inmunización de un mamífero con dicha proteína de fusión.

30 La patente WO 2004/039826 revela anticuerpos anti-IL-6 con propiedades específicas producidas mediante la generación, identificación y selección de anticuerpos por inmunización de ratones con IL-6 recombinante (rIL-6). Estos anticuerpos revelan propiedades que dependen de las condiciones iniciadas por el sistema biológico utilizado y el científico y el médico que estén involucrados.

35 Peters et al. (J. Immunol. 1998, V. 161, 3575-3581) describe una proteína de fusión compuesta de IL6 y de sIL6R ligados por una secuencia de péptidos (denominada "hiper-IL6"). Esta hiper-IL6 es mucho más activa en las células de expresión de gp130, en comparación con la IL6 y el sIL6R no ligados, y muestra una vida media mayor en suero que la IL6 no ligada. El péptido fue realizado como un compuesto alternativo a la IL6. El ensayo no menciona en absoluto ninguna referencia a la utilización de la proteína de fusión para la inmunización a fin de generar anticuerpos dirigidos en contra de la IL6, además del sIL6R.

Por lo tanto, existe la necesidad en el arte de un tratamiento mejorado de las enfermedades mediadas por la IL6 por medio de proporcionar proteínas de fusión y anticuerpos respectivos obtenidos mediante dichas proteínas de fusión a través de la inmunización.

40 Resumen de la invención.

45 La presente invención proporciona composiciones y métodos mejorados para el tratamiento de enfermedades mediadas por la IL6, en particular, cáncer y enfermedades autoinmunes que impliquen la sobre activación de la IL-6. De manera específica, la presente invención proporciona un anticuerpo novedoso de IL-6 que bloquea de manera efectiva la interacción entre la IL-6 y la gp130, en particular, un anticuerpo de la IL-6 que evita que el complejo preformado de IL-6 y de IL-6R α se una a la gp130. Además, la presente invención proporciona métodos para generar el anticuerpo novedoso de la IL-6 mediante la inmunización de un mamífero con una proteína de fusión que consta de una fracción Fc de un anticuerpo, de IL6R α y de IL6.

50 Por tanto, en un aspecto, la presente invención proporciona un antagonista de la IL-6 aislado que evita que la IL-6 en complejo con el IL-6R α se una a la gp130. En un modo de realización, el antagonista de la IL-6 aislado contiene una región variable del anticuerpo y una región Fc obtenida de un anticuerpo humano. En modos de realización

alternativos, la región Fc adecuada para la invención puede obtenerse de un anticuerpo obtenido de un ratón, una rata, una vaca, un perro, un pollo, un caballo, un pez, un mono, u otras especies no humanas. En un modo de realización preferente, la zona variable del anticuerpo se une a una región de la IL-6, de tal manera que la unión bloquea estéricamente la interacción entre la IL-6 y la gp130.

5 En algunos modos de realización, el anticuerpo incluye una cadena liviana que contiene una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:30, SEQ ID NO:31, o SEQ ID NO:32.

En otros modos de realización, el anticuerpo incluye una cadena pesada que contiene una de las siguientes secuencias de aminoácidos: SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:35, o SEQ ID NO:36.

10 La presente invención además proporciona ácidos nucleicos que codifican el antagonista de la IL-6 tal como se ha descrito con anterioridad en varios modos de realización. En particular, la presente invención proporciona ácidos nucleicos que codifican la cadena liviana y/o la cadena pesada de los anticuerpos anti-IL-6 descritos con anterioridad.

15 De manera habitual, el antagonista de la IL-6 incluye una fracción Fc. De manera preferente, la fracción Fc se obtiene de un anticuerpo humano. En un modo de realización aún más preferente, todas las regiones constantes en el anticuerpo de la IL-6 de la invención se obtienen de un anticuerpo humano. En modos de realización alternativos, la región Fc adecuada para la invención puede obtenerse de un anticuerpo obtenido de un ratón, una rata, una vaca, un perro, un caballo, un pez, un mono, o cualquier otra especie no humana.

20 En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para el tratamiento de una enfermedad en un sujeto mediante la administración al sujeto del anticuerpo de la IL-6 aislado de la invención, tal como se ha descrito con anterioridad.

25 El método de la presente invención es particularmente útil para el tratamiento de enfermedades, trastornos, y efectos secundarios que impliquen la IL-6, tales como, por ejemplo, enfermedades autoinmunes incluyendo, pero sin limitarse a, artritis reumatoide, síndrome de Sjögren, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Graves, enfermedad de Hashimoto, y enfermedad de Castleman, inflamación crónica y aguda, y osteoporosis y otros trastornos que implican la pérdida de masa ósea, y diferentes tipos de cáncer incluyendo, pero sin limitarse a, el cáncer de próstata hormono-independiente, trastornos proliferativos de linfocitos B tales como el linfoma no hodgkiniano de linfocitos B, y cáncer avanzado de riñón, mama, colon, pulmón, cerebro, y otros tejidos.

30 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un método para generar un anticuerpo de la IL-6 descrito en varios modos de realización anteriores. En particular, la presente invención proporciona un método para generar un anticuerpo de la IL-6 mediante (a) la generación, en primer lugar, de anticuerpos contra un complejo de IL-6 y de IL-6R α inmunizando un animal con una composición que incluye IL-6 y IL-6R α , y (b) identificando un anticuerpo que inhibe la interacción entre la gp130 y la IL-6. La IL-6 y la IL-6R α pueden estar en una configuración de proteína de fusión para facilitar la formación del complejo de IL-6 / IL-6R α . En un modo de realización preferente, la composición además incluye una fracción adicional que facilita la presentación del antígeno, tal como por ejemplo una fracción Fc.

35 En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo específico para un complejo de IL-6 y de IL-6R α y que es capaz de evitar que la IL-6 se una a la gp130.

40 Otras características, objetos, y ventajas de la presente invención resultan evidentes en la descripción detallada que sigue a continuación. Debe entenderse, sin embargo, que la descripción detallada, aunque indica modos de realización de la presente invención, se ofrece a modo de ilustración únicamente, no de manera limitativa. Varios cambios y modificaciones dentro del alcance de la presente invención, se volverán evidentes para aquellas personas que sean expertas en el arte a partir de la descripción detallada.

En resumen la invención hace referencia a:

- Una proteína de fusión que comprende (i) una fracción Fc de un anticuerpo, (ii) IL-6R α y (iii) IL-6.
- 45 • Una proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde IL-6R α se fusiona con la C-terminal de la fracción Fc, y la IL-6 se fusiona a la C-terminal del IL-6R α .
- Una proteína de fusión de la reivindicación 1 o 2, en donde la fracción Fc es murina y el IL-6R α y la IL-6 son humanos.
- 50 • Uso de una proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 3 para la realización de un anticuerpo anti-IL-6 para el tratamiento del cáncer y enfermedades autoinmunes desencadenadas por la IL6, en donde el anticuerpo

fue obtenido por la inmunización de un mamífero con dicha proteína de fusión, y tiene las siguientes propiedades: (i) la región variable de dicho anticuerpo se une a un epítipo en la IL-6, (ii) bloquea estéricamente la interacción entre la IL-6 y la gp130 en la superficie de la célula enferma, y (iii) evita que la IL-6 en complejo con el IL-6R α se una a la gp130, pero no bloquea estéricamente la interacción entre la IL-6 y el IL-6R α .

- 5 • Uso de la reivindicación 4, en donde el anticuerpo cribado es un anticuerpo que comprende (a) una cadena pesada y (b) una cadena liviana que constan de las secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en

(i) (a) SEQ ID NO:35 y (b) SEQ ID NO:31,

(ii) (a) SEQ ID NO:34 y (b) SEQ ID NO:30,

(iii) (a) SEQ ID NO:36 y (b) SEQ ID NO:32, y

- 10 (iv) (a) SEQ ID NO:33 y (b) SEQ ID NO:29.

• Un anticuerpo correspondiente anti-IL-6 que comprende una cadena pesada que consta de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:35, y una cadena liviana que consta de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:31.

- 15 • Un anticuerpo correspondiente anti-IL-6 que comprende una cadena pesada que consta de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:34, y una cadena liviana que consta de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:30.

• Un anticuerpo correspondiente anti-IL-6 que comprende una cadena pesada que consta de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:36, y una cadena liviana que consta de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:32.

- 20 • Un anticuerpo anti-IL-6 correspondiente que comprende una cadena pesada que consta de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:33, y una cadena liviana que consta de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:29.

Breve descripción de los dibujos.

- 25 La [Figura 1A](#) representa la activación no deseada de la gp130 en células enfermas u otras células diana que se obtienen como resultado de la sobreproducción de IL-6.

La [Figura 1B](#) representa un antagonista de la IL-6 que bloquea estéricamente la interacción entre la IL-6 y la gp130, y cuya unión a la IL-6 no se ve afectada por la unión previa del sIL-6R α .

- 30 La [Figura 2](#) muestra un alineamiento de las secuencias de la región V de un anticuerpo a modo de ejemplo de la presente invención. Las posiciones de variación entre las secuencias se encuentran indicadas con flechas. Las CDR se encuentran encuadradas.

La [Figura 3](#) es una representación esquemática de modos de realización de proteínas a modo de ejemplo utilizadas en la presente invención.

La [Figura 4](#) muestra un resultado experimental que refleja la unión de anticuerpos de la invención, a modo de ejemplo, a Fc-IL6R α -IL6.

- 35 La [Figura 5](#) muestra un resultado experimental que refleja la unión de anticuerpos de la invención a modo de ejemplo a la IL-6.

La [Figura 6](#) muestra un resultado experimental que refleja la unión de anticuerpos de la invención a modo de ejemplo al complejo no covalente de IL-6 e IL-6R α .

- 40 La [Figura 7](#) muestra un resultado experimental que refleja la unión de anticuerpos de la invención a modo de ejemplo al IL-6R α libre.

La [Figura 8](#) muestra un resultado experimental que ilustra que los anticuerpos a modo de ejemplo de la invención inhiben la interacción entre la Fc-IL-6R α -IL6 y la gp130.

La Figura 9 muestra un resultado experimental que ilustra la habilidad de bloquear la liberación de haptoglobina de células HepG2 estimuladas con un complejo Fc-IL-6R α -IL6 mediante anticuerpos a modo de ejemplo de la invención.

5 La Figura 10A representa resultados experimentales que reflejan que la proteína de fusión Fc-IL-6R α -IL6 estimula la proliferación de células de carcinoma epitelial humano A431.

Las Figuras 10B-1 y 10B-2 representan resultados experimentales que reflejan que los anticuerpos a modo de ejemplo de la invención inhiben la proliferación de células de carcinoma epitelial humano A431 estimuladas por la proteína de fusión Fc-IL6R α -IL6.

La Figura 11 ilustra propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos a modo de ejemplo de la invención.

10 La Figura 12 muestra un resultado experimental que refleja la inhibición *in vivo* de la secreción de haptoglobina por parte de los anticuerpos a modo de ejemplo de la invención, utilizando procedimientos descritos en el ejemplo 6.

La Figura 13 muestra un resultado experimental que refleja la inhibición de la metástasis de pulmón por parte de los anticuerpos a modo de ejemplo de la invención.

Descripción detallada de la invención.

15 La presente invención proporciona una proteína de fusión que consta de una fracción Fc de un anticuerpo, IL6R α e IL6. En particular, la invención proporciona un nuevo anticuerpo de la IL-6 obtenido mediante dicha proteína de fusión que bloquea de manera efectiva la interacción entre la IL-6 y la gp130, suprimiendo de ese modo la señalización de la IL-6 en presencia de los complejos preformados de IL-6/IL-6R α . Tal como se ha discutido con anterioridad, debido a que la IL-6 se encuentra, de manera habitual, en complejo con el IL6R α cuando se produce
20 como parte de una enfermedad o trastorno, la presente invención logra, por tanto, mejores efectos terapéuticos en comparación con los anticuerpos existentes que bloquean la interacción entre la IL-6 y el IL6R α (van Zaanen et al., (1996) J. Clin. Invest., 98(6):1441-8).

25 En un modo de realización en particular, la presente invención proporciona un anticuerpo de la IL-6 que contiene una región variable de anticuerpo que se une a una región de la IL-6, de tal forma que la unión bloquea estéricamente la interacción entre la IL-6 y la gp130. Por la expresión "bloquea estéricamente" debe entenderse los medios para bloquear una interacción entre una primera y una segunda proteína mediante la unión de una tercera proteína a la primera proteína. La unión entre la primera y la tercera proteína evita que la segunda proteína se una a la primera proteína, debido a interacciones de van der Waals o electrostáticas desfavorables entre la segunda y la tercera proteína.

30 La presente invención además proporciona composiciones y métodos para el tratamiento de enfermedades, trastornos y efectos secundarios que implican IL-6 basada en el antagonista de la IL-6 de la invención.

35 Varios aspectos de la invención se encuentran descritos en mayor detalle en las subsecciones a continuación. La utilización de subsecciones no pretende limitar la invención. Cada subsección puede aplicarse a cualquier aspecto de la invención. En la presente solicitud, el uso de "o" significa "y/o", a menos que se indique de otro modo. Tal como se utiliza en la presente revelación, el término "constar de" y variaciones de dicho término, tales como "que consta de" y "consta de", no pretenden excluir otros aditivos, componentes, enteros o pasos.

La IL-6 y su interacción con el IL6R α y la gp130.

40 Se entiende que la señalización de la IL-6 ocurre mediante su interacción con la subunidad del receptor alfa de la IL-6 (IL-6R α) y la gp130, una proteína receptora transmembrana que transduce las señales de la IL-6 a STAT3, que activa entonces la transcripción de varios genes. Se ha determinado la estructura de una porción extracelular del complejo de señalización (Boulanger et al., (2003), Science, 300:2101.). Esta estructura indica que el complejo de señalización contiene dos copias de IL-6, dos copias de la subunidad del IL-6R α , y dos copias de la gp130. El análisis de la estructura también indica que la IL-6 se une al receptor de la gp130 a través de tres epítopos conservados conocidos como los sitios I, II, y III. La IL-6 debe formar primero un complejo con el IL-6R α a través del
45 sitio I. El sitio II es un epítipo compuesto formado por el complejo binario de IL-6 e IL-6R α , que interactúa con la región de unión de la citocina CHR y D2D3 de la gp130. Posteriormente, el sitio III interactúa con el dominio de activación similar a la inmonoglobulina de la gp130 (D1 o IGD) para formar el complejo hexámero de señalización competente (Boulanger et al., (2003) Science, 300:2101.). El epítipo de IL-6 de unión al sitio I está localizado en las hélices A y D e interactúa con el IL-6R α . Las cuatro únicas interfaces que quedan en el hexámero pueden separarse
50 en dos sitios compuestos, los sitios I y III. Los estudios de la estructura tridimensional del complejo hexámero revelaron que una cantidad de residuos de la IL-6 participan en y son importantes para la interacción entre la IL-6 y la gp130. Tales residuos incluyen, pero no se limitan a, Leu19, Arg24, Lys27, Arg30, Tyr31, Asp34 y Trp157.

Por tanto, el efecto de formación del complejo hexámero es dimerizar la gp130 y yuxtaponer sus dominios intracelulares de manera que la señalización continúe a nivel intracelular. La subunidad del IL-6R α no tiene un dominio intracelular, y sirve únicamente para estabilizar el complejo. La IL-6 mamífera no es capaz de unirse a la gp130 en la ausencia del IL-6R α . La subunidad de IL-6R α canónico tiene tres dominios extracelulares y una región transmembrana que fija la subunidad de IL-6R α a la membrana de la célula de expresión. El "IL-6R α soluble" o "sIL-6R α ", se entiende como una proteína que presenta la porción extracelular de la subunidad de IL-6R α , pero que carece del segmento transmembrana. La proteína variante de sIL-6R α , que carece del segmento transmembrana, puede ser generada por traducción de un ARNm con empalme alternativo que codifica el IL-6R α , o por corte proteolítico de la forma de IL-6R α unida a la membrana.

El sIL-6R α se encuentra presente en el suero y puede además ser secretado por la misma célula que expresa la IL-6. La IL-6 forma un complejo con el sIL-6R α . Una vez que el complejo IL-6/ sIL-6R α se ha formado, éste es razonablemente estable y no puede ser enlazado por un anticuerpo que compite con la interacción IL-6/ sIL-6R α . El complejo IL-6/ sIL-6R α tiene una vida media en suero extendida de manera significativa en comparación a la IL-6 libre. Únicamente ciertas células en el cuerpo, tales como los linfocitos B, presentan tanto el IL-6R α como la gp130, mientras que muchas otras células presentan solamente la gp130. El complejo IL-6/ sIL-6R α puede unirse a células que presentan únicamente la gp130 y estimulan la señal de transducción. Consecuentemente, la activación no deseada de la gp130 sobre muchas células pueden ser el resultado de la sobreproducción de la IL-6 (Figura 1A). Por lo tanto, los anticuerpos u otras moléculas que bloquean estéricamente la interacción entre la IL-6 y la gp130 puede ser particularmente útil en la supresión de la señalización no deseada de la IL-6 (Figura 1B).

Antagonistas de la IL-6 que bloquean estéricamente la interacción con la gp130.

Por tanto, tal como se muestra en la Figura 1B, la presente invención contempla un antagonista de la IL-6 que bloquea estéricamente la interacción con la gp130 y cuya unión a la IL-6 no se ve afectada por la unión previa del sIL-6R α . "Los antagonistas de IL-6" de la presente invención incluyen anticuerpos o fragmentos de los mismos; equivalentes funcionales de anticuerpos; anticuerpos modificados, tales como, anticuerpos de cadena única, anticuerpos quiméricos; u otras proteínas o moléculas capaces de unirse a o de asociarse con la IL-6 o el complejo IL-6/ IL-6R α para impedir la unión a la gp130 estéricamente.

En un modo de realización preferente, el antagonista de la IL-6 de la invención contiene una región variable de un anticuerpo que se une a una región o un epítipo en el complejo IL-6/ IL-6R α , de tal manera que la unión bloquee estéricamente la interacción entre la IL-6 y la gp130. Más preferentemente, el antagonista de IL-6 de la invención es un anticuerpo. Por ejemplo, la unión de la región variable del anticuerpo a cualquier región o epítipo que participe directamente en la interacción entre el complejo IL-6/ IL-6R α y la gp130 es suficiente para interferir estéricamente con la unión a la gp130. Además, la unión a cualquier región o epítipo adyacente a aquellos que participan directamente en la interacción puede también ser suficiente para bloquear estéricamente la interacción entre IL-6/ IL-6R α y la gp130. Tales regiones o epítipos pueden existir en la IL-6, el IL-6R α , o como sitios compuestos formados únicamente por el complejo de IL-6 e IL-6R α . En particular, los epítipos adecuados cuya unión puede bloquear estéricamente la interacción entre la IL-6 y la gp130 incluyen, pero no se limitan a, cualquier epítipo incluyendo al menos uno de los siguientes aminoácidos: Leu19, Arg24, Lys27, Arg30, Tyr31, Asp34 y Trp157 de la IL-6 humana.

Generación de anticuerpos que bloquean estéricamente la interacción entre la IL-6 y la gp130.

Por tanto, una característica importante de la invención es el aislamiento de anticuerpos que se unen al complejo IL-6/ IL-6R α y bloquean estéricamente la interacción IL-6/gp130. Tales anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales. De acuerdo con la invención, tales anticuerpos pueden ser generados por el método indicado a continuación. En un primer paso, un ratón, rata, conejo, u otro mamífero es inmunizado con una composición proteica que consta de IL-6 y de IL-6R α . Es preferible que presente la IL-6 y el IL-6R α formando un complejo. Para facilitar la formación del complejo, la IL-6 y el IL-6R α deben ser enlazados de manera covalente, mediante, por ejemplo, entrecruzamiento químico o por conexión a través de un conector polipéptido. Sin la intención de estar sujetos a la teoría, la finalidad de tal inmunización es que las únicas superficies expuestas de la IL-6 sean cualquier superficie unida por la gp130 o sean superficies no neutralizantes. Los anticuerpos que se encuentran bloqueados estéricamente por IL-6R α no deberían surgir. En particular, inmunógenos preferentes incluyen IL-6 y IL-6R α soluble ligados de manera covalente, lo que puede realizarse por la unión de la IL-6 y el IL-6R α *in vitro* y luego el tratamiento con un agente de entrecruzamiento químico de acuerdo a los procedimientos estándar, o mediante la expresión de la IL-6 y el IL-6R α soluble como una proteína de fusión, de manera preferente ligado por un conector, por ejemplo tal como se ha descrito por Peters et al. (J. Immunol., (1998) 161:3575-81). De acuerdo a la invención, de manera habitual, una proteína de fusión inmunógena que incluye IL-6 e IL-6R α , incluye además una fracción adicional que facilita la presentación del antígeno, tal como una región Fc. La composición proteica puede ser administrada a un mamífero con o sin adyuvante de acuerdo con cualquiera de entre una variedad de métodos. La composición puede ser administrada únicamente una vez, pero se administra de manera preferente más de una vez de acuerdo a los esquemas de prescripción estándar.

Como un segundo paso, el antisuero policlonal se obtiene a partir del mamífero inmunizado. El suero policlonal puede ser utilizado directamente, o puede ser purificado por afinidad de acuerdo a los métodos estándar. De manera alternativa, el proceso de generar anticuerpos monoclonales es iniciado. Las células de producción de anticuerpos se extraen del animal inmunizado, por ejemplo mediante la extracción quirúrgica del bazo o la extracción de PBMCs (por sus siglas en inglés, o células mononucleares de sangre periférica) y su posterior clasificación. Las células potenciales de producción de anticuerpos son entonces inmortalizadas por fusión con una línea celular inmortalizada de acuerdo a los procedimientos estándar, clonadas en pocillos microtiter, y cribadas para la producción de anticuerpos que se unen al inmunógeno.

En otro modo de realización, como un segundo paso, se genera una biblioteca de expresión por aislamiento de células apropiadas a partir de animales inmunizados o no inmunizados, seguido por el aislamiento de ácidos nucleicos que codifican regiones V del anticuerpo, la inserción de los ácidos nucleicos que codifican regiones V en fagos, levaduras, bacterias, u otros sistemas de expresión génica replicables. Los elementos de la librería son entonces cribados por su capacidad de unirse a los complejos IL-6/ IL-6R α .

En algunos modos de realización, como un tercer paso, los anticuerpos producidos por células monoclonales o las regiones V del anticuerpo seleccionadas de la librería, se encuentran sujetos, de manera opcional, a cribados secundarios, tal como sigue a continuación. De manera específica, los clones del anticuerpo o las regiones V del anticuerpo se prueban para su habilidad de unirse a la IL-6 libre, de unirse al IL-6R α libre, de unirse al complejo IL-6/ IL-6R α , y para su habilidad para inhibir la interacción entre el complejo IL-6/ IL-6R α y la gp130. A partir de los resultados de estas pruebas, las regiones V del anticuerpo o anticuerpos pueden clasificarse en varios grupos: anticuerpos neutralizantes que se unen a la IL-6 y bloquean la interacción con la gp130, anticuerpos que se unen al IL-6R α , anticuerpos no neutralizantes que se unen a la IL-6, anticuerpos neutralizantes que se unen al complejo IL-6/ IL-6R α pero no a la IL-6 o al IL-6R α libre y bloquean la interacción con la gp130, y anticuerpos neutralizantes que se unen a la IL-6 y bloquean la interacción con el IL-6R α . Se esperan anticuerpos de cada clase excepto de la última. Ensayos de señalización y de unión de este tipo se conocen bien en el arte de la bioquímica de proteínas y de la transducción de señales, y modos de realización específicos se detallan en más detalle en los Ejemplos.

Identificación de anticuerpos que no extienden de manera significativa la vida media en suero de la IL-6.

Un efecto no deseado de los anticuerpos anti-IL-6 es que a menudo prolongan la vida media en suero de la IL-6. El peso molecular de la IL-6 es de aproximadamente 25.000 Daltons, lo que se encuentra por debajo del umbral de aclaramiento renal de 50.000 Daltons, mientras que el peso molecular de un complejo de anticuerpo de la IL-6 se encuentra por encima de los 150.000 Daltons. La formación de complejos anticuerpo/ antígeno de anti-IL-6 tienen, por lo general, el efecto de alargar la vida media en suero de la IL-6 porque el peso molecular del complejo es mayor que el umbral de aclaramiento renal. Por tanto, la presente invención proporciona además métodos para identificar anticuerpos que se unen a IL-6 o al complejo IL-6/ IL-6R α pero que no extiendan de manera significativa la vida media en suero de la IL-6.

El método implica, como un primer paso, el aislamiento de un panel de anticuerpos anti-IL-6. Como un segundo paso, los anticuerpos se prueban entonces para su efecto sobre la vida media en suero de la IL-6, por ejemplo como sigue a continuación. La IL-6 se administra a un animal tal como por ejemplo a un roedor. Es conveniente utilizar una forma marcada de la IL-6, tal como por ejemplo una IL-6 radiactiva. Un anticuerpo que se va a probar se administra también al mismo animal, de manera preferente mediante una vía de administración diferente. Como un control negativo, se administra PBS en lugar del anticuerpo o de la IL-6. Se obtienen muestras de suero en varios momentos después de la administración de las proteínas, y se comprueban los niveles de IL-6 y del anticuerpo de acuerdo con técnicas estándar. Por ejemplo, la IL-6 radiomarcada, yodada puede ser cuantificada utilizando un contador de radiación, y el anticuerpo puede ser detectado mediante un método ELISA basado en la captura de la IL-6.

Se contempla que algunos anticuerpos presentan un perfil farmacocinético extendido en comparación a otros, y algunos anticuerpos causan un aumento de la farmacocinética de la IL-6 mientras que otros anticuerpos causan tan solo una extensión moderada o esencialmente ninguna en absoluto. Dependiendo de la aplicación en particular, una clase de anticuerpos preferentes de la invención son aquellos que en sí mismos tienen un perfil farmacocinético favorable, pero no extienden de manera significativa el perfil farmacocinético de la IL-6.

Secuencias de regiones variables de anticuerpo.

Las secuencias de regiones V de anticuerpo identificadas de acuerdo con los métodos descritos con anterioridad están caracterizadas utilizando métodos de secuenciación estándar conocidos en el arte. Un método a modo de ejemplo se describe en detalle en el Ejemplo 4. Las secuencias a modo de ejemplo de las regiones V de la cadena liviana y la cadena pesada del anticuerpo que se unen a la IL-6 y bloquean su interacción con la gp130 se muestran en la Figura 2. La Figura 2 también ilustra una alineación de las secuencias de la región V del anticuerpo identificadas de acuerdo a la presente invención. La variación de la posición entre las secuencias se encuentra indicada con flechas. Las regiones CDR se encuentran encuadradas.

Las regiones V de la invención pueden ser configuradas con regiones constantes humanas para formar un anticuerpo quimérico. Un anticuerpo quimérico a modo de ejemplo puede incluir regiones VH y VL descritas en la Figura 2 y regiones constantes obtenidas de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, o IgM. De manera alternativa, los anticuerpos de la invención pueden ser expresados con regiones constantes de isótopos híbridos, tal como se ha descrito en la publicación PCT WO 02/07260S. Las regiones V de la invención pueden además configurarse como fracciones Fab, "minicuerpos" que carecen del dominio CH2, o como fracciones Fv de cadena única. Estas últimas configuraciones son de menor tamaño que anticuerpos completos, y tienen características de difusión aumentadas, lo que puede resultar de utilidad en situaciones que requieren de una penetración eficiente del tejido, tales como por ejemplo en el tratamiento de tumores que secretan IL-6.

10 Expresión

Los anticuerpos y proteínas que contienen regiones variables de anticuerpo de la invención se expresan de manera preferente en células mamíferas, tales como células NS/0, células de CHO, células de SP2/0, células BHK, u otras células mamíferas. La expresión de anticuerpos de células mamíferas es bien conocida en el arte de la ingeniería de proteínas. Los anticuerpos pueden además expresarse en células vegetales tales como maíz o tabaco, células de insectos como por ejemplo a través de un vector de baculovirus, células fúngicas tales como *S. cerevisiae* o *Pichia pastoris*, o en células bacterianas, las cuales son más útiles en la expresión de configuraciones de menor tamaño tales como moléculas Fv de cadena única.

Administración

Los antagonistas de IL-6 de la invención se utilizan en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos que implican la expresión de IL-6. Tales enfermedades y trastornos incluyen, pero no están limitadas a, cáncer como por ejemplo el cáncer de próstata hormono-independiente, trastornos proliferativos de linfocitos B tales como el linfoma no hodgkiniano de linfocitos B, y cáncer avanzado de riñón, mama, colon, pulmón, cerebro, y otros tejidos; trastornos autoinmunes dirigidos por anticuerpos tales como la artritis reumatoide, miastenia gravis, lupus eritomatoso sistémico, y otras enfermedades autoinmunes; u osteoporosis. Las moléculas de la invención pueden también utilizarse para tratar caquexia en pacientes con cáncer, lo que a menudo es el resultado de la sobreproducción de IL-6 y de IL-6R α por parte de los tumores.

Los antagonistas de la invención pueden causar un efecto secundario de inmunosupresión en una diana relacionada, en particular la inhibición de la formación de anticuerpos. Cuando un paciente se encuentra recibiendo un anticuerpo de la invención, resulta útil a menudo suplementar el tratamiento con un agente antiinfeccioso profiláctico. Los tratamientos profilácticos de este tipo son bien conocidos en el arte del tratamiento de pacientes inmunosuprimidos.

Un antagonista de la invención se administra, de manera habitual, mediante infusión, pero puede también ser administrado mediante inyección subcutánea, intradérmica, intramuscular, o intraperitoneal, por inhalación, o por administración oral. Para un adulto humano de 70 kilogramos, se prefiere una dosis en el rango de aproximadamente 50 a 2000 miligramos, más preferentemente con una dosis en el rango de 100-800 miligramos, y aún más preferentemente una dosis de aproximadamente 300-600 miligramos.

La dosis precisa puede ser ajustada en una base de paciente-por-paciente. Por ejemplo, cuando se trata un tumor sólido en un paciente, la efectividad de una dosis dada puede ser evaluada como sigue a continuación. En varios puntos después de la administración de un anticuerpo de la invención, se extraen biopsias del tumor y se prueban para la activación de la gp130, por ejemplo mediante inmunotinción con un anticuerpo apropiado anti-fosfotirosina. La finalidad es tener la inhibición continua, esencialmente completa de la activación de la gp130 en el tumor. Si la inhibición de la activación de la gp130 no es completa, la dosis puede ser aumentada o puede aumentarse la frecuencia de la dosificación.

Debe entenderse que los modos de realización descritos con anterioridad y los ejemplos a continuación se ofrecen a modo de ilustración, no de limitación. Varios cambios y modificaciones dentro del alcance de la presente invención, resultarán claros para aquellos expertos en el arte a partir de la presente descripción.

Ejemplos

Algunos de los siguientes ejemplos ilustran el entorno técnico de la invención tal como se reivindica.

Ejemplo 1. Expresión de un complejo IL-6/ IL-6R α para su uso como antígeno.

Para generar anticuerpos que se unan a una superficie de la IL-6 que interfiera con su unión a la gp130, y sea accesible en un complejo IL-6/ IL-6R α , se expresó una proteína de fusión que consta de un dominio Fc, los dominios extracelulares de IL-6R α , y la IL-6 a partir de un plásmido denominado pdCs-Fc-IL6R α -IL6. En el presente

documento se hace referencia a la proteína de fusión como Fc-IL6R α -IL6. El dominio Fc fue obtenido del IgG_{γ2a}, y el IL-6R α y la IL-6 se basaron en secuencias humanas. La secuencia de esta proteína y el ADN que codifica esta proteína se muestran a continuación.

Secuencia de proteína de Fc-IL6R α -IL6 (SEQ ID NO:37):

EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQ
ISWVNNVEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIER
TISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT
EPVLDS DGSYFMY SKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGSgddddd k
lPPEEPQLSCFRKSP LSNVVC EWGPRSTPSLTTKAVLLVRKFQNS PAEDFQEP CQYSQES
QKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGSKF SKTQTFQGC GILQPDPPANITVTAVARNP
RWLSVTWQDPHSWNS SFYRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQ
LRAQEEFGQGEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPA rggggsggggsvepvppqEDSKDVAAPH
RQPLTSSERIDKQIRYILDG ISALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGC FQ
SGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNR FESSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDA
ITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM

5

Secuencia subrayada: Fc IgG γ murino

Secuencia con caracteres en minúscula: conector que contiene el sitio de corte de la enteroquinasa

Secuencia en negrita: IL6R α humano

Secuencia subrayada con caracteres en minúscula: conector

10 Secuencia en cursiva: IL6 humano

Secuencia de ADN que codifica Fc-IL6R α -IL6 madura (SEQ ID NO:38):

GAGCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTC
TTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCC
CTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAG
ATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAG
GATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATG
AGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGA
ACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCA
GAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCT
GAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACT
GAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAG
AAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTTTCAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAAT
CACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACCCCGGGTTCAGGGGATGACGATGACGATAAG
CTTCCCCCGAGGAGCCCCAGCTCTCCTGCTTCCGGAAGAGCCCCCTCAGCAATGTTGTT
TGTGAGTGGGGTCTCGGAGCACCCATCCCTGACGACAAAGGCTGTGCTCTTGGTGAGG
AAGTTTCAGAACAGTCCGGCCGAAGACTTCAGGAGCCGTGCCAGTATTTCCAGGAGTCC
CAGAAGTCTCCTGCCAGTTAGCAGTCCCGGAGGGAGACAGCTCTTTCTACATAGTGTCC
ATGTGCGTCGCCAGTAGTGTCTGGGAGCAAGTTCAGCAAACTCAAACCTTTCAGGGTTGT
GGAATCTTGACGCCTGATCCGCCTGCCAACATCACAGTCACTGCCGTGGCCAGAAACCCC
CGCTGGCTCAGTGTACCTGGCAAGACCCCCACTCCTGGAACTCATCTTTCTACAGACTA
CGGTTTGAGCTCAGATATCGGGCTGAACGGTCAAAGACATTCAACAACATGGATGGTCAAG
GACCTCCAGCATCACTGTGTCATCCACGACGCCTGGAGCGGCCTGAGGCACGTGGTGCAG
CTTCGTGCCCAGGAGGAGTTCGGGCAAGGCGAGTGGAGCGAGTGGAGCCCGGAGGCCATG
GGCACGCCTTGGACAGAATCCAGGAGTCCTCCAGCTAGAGGGGGCGGGGGCAGTGGGGGC
GGGGGCAGTGTAGAACCGGTACCCCCAGGAGAAGATTCAAAGATGTAGCTGCCCCACAC
AGACAGCCACTCACCTCTTCAGAACGAATTGACAAACAAATTCGGTACATCCTCGACGGC
ATCTCAGCCCTGAGAAAGGAGACATGTAACAAGAGTAACATGTGTGAAAGCAGCAAAGAG
GCACTGGCAGAAAACAACCTGAACCTTCAAAGATGGCTGAAAAAGATGGATGCTTCCAA
TCTGGATTCAATGAGGAGACTTGCCTGGTAAAATCATCACTGGTCTTTTGGAGTTTGGAG
GTATACCTAGAGTACCTCCAGAACAGATTTGAGAGTAGTGAGGAACAAGCCAGAGCTGTG
CAGATGAGTACAAAAGTCCTGATCCAGTTCCTGCAGAAAAGGCAAAGAATCTAGATGCA
ATAACCACCCCTGACCCAACCACAAATGCCAGCCTGCTGACGAAGCTGCAGGCACAGAAC

**CAGTGGCTGCAGGACATGACAACTCATCTCATTCTGCGCAGCTTTAAGGAGTTCCTGCAG
TCCAGCCTGAGGGCTCTTCGGCAAATGTAG**

Para el análisis rápido de la expresión de proteínas para caracterizar el producto de proteína de fusión Fc-IL6R α -IL6, el plásmido pdCs-Fc-IL6R α -IL6 fue introducido en células HEK 293 de un riñón embrionario humano (ATCC# CRL-1573) mediante transfección transitoria utilizando lipofectamina (Invitrogen).

- 5 Para obtener clones transfectados de manera estable que expresen un riñón embrionario humano Fc-IL6R α -IL6, el ADN plasmídico apropiado fue introducido en células NS/0 de mieloma de ratón mediante electroporación. Las células NS/0 se cultivaron en medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) complementado con 10% de suero fetal bovino con calor inactivado, 2 mM de glutamina y penicilina/ estreptomycin. Aproximadamente 5x10⁶ células fueron lavadas una vez con PBS y re-suspendidas en 0,5 ml de PBS. Después se
10 incubaron 10 μ g de ADN plasmídico linealizado con las células en una cubeta Gene Pulser® (0,4 cm de espacio entre electrodos, BioRad) durante 10 minutos en hielo. La electroporación fue realizada utilizando un Gene Pulser® (BioRad, Hercules, CA) con configuraciones a 0,25 V y 500 μ F. Las células se recuperaron durante 10 minutos en hielo, tras lo cual fueron re-suspendidas en un medio de cultivo y se colocaron en dos placas de 96 pocillos. Los clones transfectados de manera estable fueron seleccionados mediante su cultivo en presencia de 100 nM de
15 metotrexato (MTX), que fue añadido al medio de cultivo dos días después de la transfección. Las células se alimentaron cada 3 días durante dos o tres veces más, y los clones resistentes al MTX aparecieron en unas 2 a 3 semanas. Se sometieron a ensayo sobrenadantes de clones mediante ELISA anti-Fc para identificar productores altos. Los clones de alta producción se aislaron y se propagaron en un medio de cultivo que contenía 100 nM de MTX. El medio de cultivo utilizado de forma habitual fue el medio H-SFM o CD (Life Technologies).
- 20 La proteína de fusión Fc-IL6R α -IL6 fue capturada posteriormente del medio para un análisis más detallado. Por razones de rutina de caracterización por electroforesis en gel, la proteína de fusión Fc-IL6R α -IL6 secretada en el medio fue capturada en granulada de Proteína A-Sefarosa® (Repligen, Cambridge, MA) y se eluyó por ebullición de la muestra en un tampón de muestra de proteína, con o sin un agente reductor tal, como por ejemplo β -mercaptoetanol. Las muestras fueron analizadas mediante SDS-PAGE y las bandas de proteínas fueron
25 visualizadas mediante tinción con (azul) Coomassie.

- Será reconocido por aquellos expertos en el arte que cualquier variedad de proteínas podría ser utilizada como alternativas a la proteína Fc-IL6R α -IL6 descrita con anterioridad. Por ejemplo, podrían utilizarse otras configuraciones del IL-6R α y de la IL-6, tales como IL-6R α -IL6-Fc, albúmina-IL-6R α -IL-6, citocina-IL-6R α -IL-6, donde la citocina se elige para estimular una respuesta inmune contra el complejo IL-6/ IL-6R α . Las proteínas que constan
30 de citocina, una fracción Fc, y un complejo IL-6/ IL-6R α pueden también ser utilizadas, por ejemplo, de acuerdo con los métodos de Gillies et al. (WO01/07081.). Finalmente, la IL-6 y el IL-6R α pueden producirse de manera individual, entrecruzarse químicamente, y utilizarse como un antígeno. Cuando una fracción Fc y/o una fracción de citocina secundaria se utilizan, resulta ventajoso por lo general que estas fracciones provengan del animal que está siendo inmunizado, tal como por ejemplo un ratón.
- 35 En preparación para la caracterización de los anticuerpos descritos a continuación, los ADN que codifican Fc-IL6 y Fc-IL6R α se construyeron de una manera similar a la descrita con anterioridad. Las proteínas correspondientes fueron purificadas de manera similar a la descrita con anterioridad. Además, la IL-6 humana, el IL-6R α humano, y la gp130-Fc humana fueron adquiridas de R&D Systems, Inc. para su uso en ciertos experimentos que siguen a continuación. Las representaciones esquemáticas de estas proteínas utilizadas en los experimentos se muestran en
40 la Figura 3. Las secuencias de proteína y del ADN de los constructos relevantes se proporcionan de la manera que se explica a continuación.

Fc-IL6R α maduro (SEQ ID NO:39)

EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQ
ISWFVNNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIER
TISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT
EPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGSGDDDDDK
LPPEEPQLSCFRKSPLSNVVCEWGPRSTPSLTTKAVLLVRKFQNSPAEDFQEPQYSQES
QKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGSKFSKTQTFQGGILQPDPPANITVTAVARNP
RWLSVTWQDPHSWNSSFYRLRFELRYRAERSKFTFTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQ
LRAQEEFGQGEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPA

ADN que codifica Fc-IL6R α maduro (SEQ ID NO:40)

GAGCCAGAGGGCCCAATCAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCCAGCACCTAACCTC
TTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTCCCTCCAAAGATCAAGGATGTA CT CATGATCTCC
CTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAG
ATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAG
GATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATG
AGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAAGACCTCCAGCGCCCATCGAGAGA
ACCATCTCAAACCCAAAGGGT CAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCA
GAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCT
GAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACT
GAACCAGTCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAG
AAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTT CAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAAT
CACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACCCCGGGTTCAGGGGATGACGATGACGATAAG
CTTCCCCCGAGGAGCCCCAGCTCTCCTGCTTCCGGAAGAGCCCCCTCAGCAATGTTGTT
TGTGAGTGGGGTCTCGGAGCACCCCATCCCTGACGACAAAGGCTGTGCTCTTGGTGAGG
AAGTTTCAGAACAGTCCGGCCGAAGACTTCAGGAGCCGTGCCAGTATCCCAGGAGTCC
CAGAAGTTCTCCTGCCAGTTAGCAGTCCCGGAGGGAGACAGCTCTTTCTACATAGTGTC
ATGTGCGTCGCCAGTAGTGTCGGGAGCAAGTTCAGCAAAACTCAAACCTTTCAGGGTTGT
GGAATCTTGCAGCCTGATCCGCCTGCCAACATCACAGTCACTGCCGTGGCCAGAAACCCC
CGCTGGCTCAGTGTCACCTGGCAAGACCCCACTCCTGGA ACTCATCTTTCTACAGACTA
CGGTTTGAGCTCAGATATCGGGCTGAACGGTCAAAGACATTCACAACATGGATGGTCAAG
GACCTCCAGCATCACTGTGTCATCCACGACGCCTGGAGCGGCCTGAGGCACGTGGTGCAG
CTTCGTGCCCAGGAGGAGTTCGGGCAAGGCGAGTGGAGCGAGTGGAGCCCGGAGGCCATG
GGCAGCCTTGGACAGAATCCAGGAGTCTCCAGCTTAG

Fc-IL6 madura (SEQ ID NO:41)

EPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQ
 ISWFVNNVEVHTAQ TQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPIER
 TISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNT
 EPVLDS DGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGKEDSKDVA
 APHRQPLTSSERIDKQIRYILDG ISALRKETCNKSNMCES SKEALAENNLNLPKMAEKDG

 CFQSGFNEETCLVKIITGLLEFEVYLEYLQNR FESSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKN
 LDAITTPDPTTNASLLTKLQAQNQWLQDM TTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM

ADN que codifica Fc-IL6 madura (SEQ ID NO:42)

GAGCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCCCTGTCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTC
 TTGGGTGGACCATCCGTCTTCATCTTCCCTCAAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCC
 CTGAGCCCCATAGTCACATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAG
 ATCAGCTGGTTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAG
 GATTACAACAGTACTCTCCGGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATG
 AGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAACAAGACCTCCCAGCGCCCATCGAGAGA
 ACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACCA
 GAAGAAGAGATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCT
 GAAGACATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACT
 GAACCAGTCCTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAG
 AAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTT CAGTGGTCCACGAGGGTCTGCACAAT
 CACCACACGACTAAGAGCTTCTCCCGGACCCCGGGTAAAGAAGATTCCAAAGATGTAGCT
 GCCCCACACAGACAGCCACTCACCTCTTCAGAACGAATTGACAAACAATTCGGTACATC
 CTCGACGGCATCTCAGCCCTGAGAAAGGAGACATGTAACAAGAGTAACATGTGTGAAAGC
 AGCAAAGAGGCACTGGCAGAAAACAACCTGAACCTTCCAAAGATGGCTGAAAAAGATGGA
 TGCTTCCAATCTGGATTCAATGAGGAGACTTGCCTGGTGAAAATCATCACTGGTCTTTTG
 GAGTTTGAGGTATACCTAGAGTACCTCCAGAACAGATTTGAGAGTAGTGAGGAACAAGCC
 AGAGCTGTGCAGATGAGTACAAAAGTCTGATCCAGTTCCTGCAGAAAAGGCAAAGAAT
 CTAGATGCAATAACCACCCCTGACCCAACCACAAATGCCAGCCTGCTGACGAAGCTGCAG
 GCACAGAACCAGTGGCTGCAGGACATGACAACTCATCTCATTCTGCGCAGCTTTAAGGAG
 TTCCTGCAGTCCAGCCTGAGGGCTCTTCGGCAAATGTAG

5 **Ejemplo 2. Inmunización con un complejo IL-6/ IL-6R α .**

Veinte ratones (Balb/C) fueron inmunizados con la proteína Fc-IL6R α -IL6 producida tal como se ha descrito en el Ejemplo 1, y anticuerpos monoclonales para esta proteína fueron producidos de acuerdo a una modificación del

método de Kohler y Milstein (1975) (Nature, 256:495-7). De manera específica, 1 microgramo de Fc-IL6R α -IL6 se inyectó de manera subcutánea con 100 microlitros de adyuvante de Freund completo. Las inyecciones fueron repetidas 14 días más tarde, utilizando 1 microgramo de proteína inyectada de manera intraperitoneal con 100 microlitros de adyuvante de Freund incompleto. 24 días después de la primera inyección, los ratones fueron estimulados con 1 microgramo de la proteína Fc-IL6R α -IL6 en 100 microlitros de PBS de manera intravenosa. Tres días más tarde los ratones fueron sacrificados y el bazo fue extirpado, y las células del bazo fueron cultivadas de acuerdo a procedimientos estándar. 435 millones de células del bazo de dos ratones con una fuerte respuesta anti-IL6R α /IL-6 policlonal se fusionaron con 175 millones de células NS/0, en un ratio de 2,4 células del bazo a 1 célula NS/0. Se produjeron híbridos celulares de células B/NS/0 inmortalizadas, de acuerdo a procedimientos estándar, y se cribaron entonces hibridomas para la producción de anticuerpos contra la proteína de fusión Fc-IL6R α -IL6 utilizando la tecnología ELISA.

Ejemplo 3. Cribado de anticuerpos que bloquean la interacción entre el complejo IL-6/ IL-6R α y la gp130.

Unión

Clones positivos del Ejemplo 2 se probaron adicionalmente como sigue a continuación. El isótopo del anticuerpo fue determinado y los clones basados en IgM no se caracterizaron adicionalmente. Los anticuerpos monoclonales basados en IgG se probaron para su habilidad de unirse a o bien la IL-6 o al IL-6R α utilizando Fc-IL6 y Fc-IL6R α inmovilizadas, de acuerdo a procedimientos estándar. Algunos clones se unieron a la IL-6, algunos se unieron a IL-6R α , y algunos no se unieron a ninguna de esas proteínas, sugiriendo que estos monoclonales podrían reconocer alguna porción del conector o podrían reconocer epítomos compuestos que consisten en fracciones tanto de la IL-6 como del IL-6R α .

Resultados a modo de ejemplo de las características de unión de anticuerpos habituales de la invención, se muestran en la Figura 4 (unión a Fc- IL6R α -IL6), la Figura 5 (unión a la IL-6), la Figura 6 (unión a la IL-6 y al IL-6R α en complejo no covalente), y la Figura 7 (IL-6R α libre). Los resultados indican que, para este grupo de anticuerpos, la unión a la IL-6 y a la IL-6 y al IL-6R α enlazados de forma covalente se produjo de manera similar, la unión a un complejo IL-6/ IL-6R α no covalente dio una señal menos fuerte (posiblemente debido a la disociación de la IL-6 del IL-6R α durante los pasos de lavado), y la unión al IL-6R α libre no pudo ser detectada.

Ensayos de competición

Para caracterizar de manera adicional los anticuerpos que reconocen la IL-6, se llevaron a cabo los siguientes ensayos de competición. En primer lugar, se sometió a prueba la habilidad de los anticuerpos monoclonales para inhibir la interacción entre Fc-IL6R α -IL6 y la gp130-Fc. Los ensayos de inhibición se llevaron a cabo basados en métodos descritos por Scheller et al. J. Immuno. Métodos, 291:93-100 (2004). Se identificaron cuatro anticuerpos que bloquearon esta interacción, denominados Mab#195, Mab#309, Mab#471, y Mab#476. En segundo lugar, se sometió a prueba la inhibición de la interacción entre Fc-IL6 y Fc-IL6R α mediante los anticuerpos. Se encontró que ninguno de los anticuerpos inhibían esta interacción, lo que se esperaba en base al hecho de que los anticuerpos se obtuvieron de una inmunización con Fc-IL6R α -IL6 y se sometieron a un cribado inicial para su unión a Fc-IL6R α -IL6.

Los resultados habituales que ilustran la inhibición de la interacción entre Fc-IL6R α -IL6 y la gp130-Fc se muestran en la Figura 8.

Ensayo basado en células

Los anticuerpos Mab#195, Mab#309, Mab#471, y Mab#476 se sometieron a prueba para su habilidad para bloquear la liberación de haptoglobina de células HepG2 estimuladas con un complejo Fc-IL6R α -IL6. La haptoglobina es una proteína secretada por células del hígado durante estados inflamatorios. Las células HepG2 son una línea celular del hígado. La liberación de haptoglobina de las células HepG2 proporciona un ensayo biológico conveniente para la actividad de los complejos IL6R α /IL6.

El ensayo se llevó a cabo como sigue a continuación. Las células HepG2 se colocaron en placas a razón de 0,1 x 10⁶ células por pocillo en una placa de 96 pocillos, y se cultivaron en DMEM complementado con 10% de un medio de Suero Fetal Bovino (FBS, por sus siglas en inglés) durante la noche. Entonces, se lavaron las células con PBS, y se incubaron en un medio sin nutrientes, DMEM sin FBS, durante 1 hora a 37 °C. Las células se incubaron entonces en un medio estimulante, DMEM (sin FBS) en presencia de 8 ng/ml del complejo Fc- IL6R α -IL6, y varias concentraciones de anticuerpos de ensayo complementados durante 22 horas. Los sobrenadantes fueron extraídos y los niveles de haptoglobina fueron determinados por un ensayo ELISA para la detección de haptoglobina. Un procedimiento ELISA estándar se siguió, utilizando un anticuerpo anti-haptoglobina humana de cabra (Sigma #H5015) para su captura, un anticuerpo anti-haptoglobina humana de ratón (US Biological #H1820-05) como un anticuerpo primario y anti-IgG-HRP de ratón (Promega #W402B) como un anticuerpo secundario. Los resultados habituales se muestran en la Figura 9.

Análisis Biacore

La unión de los anticuerpos Mab#195, Mab#309, Mab#471, y Mab#476 a la IL-6 fue caracterizada cuantitativamente utilizando una máquina Biacore. Los anticuerpos fueron inmobilizados en un chip; la proteína IL-6, se pasó por el chip, y se midieron las constantes de disociación y de afinidad. Se obtuvieron los siguientes resultados.

Parámetro	mAb#195	mAb#309	mAb#471	mAb#476
K_a (1/Ms)	$2,4 \times 10^6$	8×10^5	$1,8 \times 10^6$	$2,5-2,6 \times 10^6$
k_d (1/s)	$4,8 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-5}$	$1,2-2,6 \times 10^{-4}$
K_D (pM)	2000	135	7,5	47-106

5

Inhibición de la proliferación de líneas celulares cancerígenas

Los anticuerpos de la invención fueron sometidos a prueba para su habilidad de inhibir la proliferación de células A431 y células LP-1. La inhibición de la proliferación de células LP-1 se encuentra descrita en el Ejemplo 8. La inhibición de la proliferación de A431 se midió como sigue a continuación. En el día 1, las células se colocaron en placas de 96 pocillos a razón de 25.000 células/placa en DMEM conteniendo 10% de FBS, con 200 microlitros por pocillo. En el día 3, las células se lavaron una vez con 200 microlitros de PBS. Las células se dejaron sin nutrientes durante una hora a 37 °C en 100 microlitros de DMEM.

10

En el día 3, las diluciones de los anticuerpos anti-IL-6 se prepararon en 96 placas de fondo en U en DMEM conteniendo IL6R α -IL6-His6 (33 ng/ml), con todas las proteínas preparadas como dilución 2X ya que fueron transferidos más tarde a las placas que contienen las células. Los controles incluyeron DMEM, DMEM-1 % de FBS, y IL6R α -IL6-His6 en 0% de FBS. Las placas fueron incubadas con las diluciones de proteínas durante 1 hora a 37 °C, tras lo cual 100 microlitros de mezclas de proteínas se transfirieron a las células sin nutrientes.

15

En el día 5, las células en cada pocillo se lavaron dos veces con 200 microlitros de PBS, y después con 100 microlitros de una solución para medir la fosfatasa ácida. La solución era 0,1 M de acetato de sodio pH 5,5, 0,1% Triton X-100, 2,5 mg/ml paranitrofenilfosfato. Las placas fueron incubadas a 37 °C durante una hora, tras lo cual la reacción se detuvo con 100 microlitros de 0,1 N NaOH, y la placa se leyó a 410 nm.

20

Los resultados habituales se muestran en las Figuras 10A, 10B-1 y 10B-2. Tal como se muestra en las Figuras 10B-1 y 10B-2, los anticuerpos de la invención inhiben la proliferación de células de carcinoma epitelial humano A431, observadas con estimulación por la proteína de fusión IL-6/ IL-6R α . Un resultado habitual de la proliferación de células A431 estimuladas por la proteína de fusión IL-6/ IL-6R α se muestra en la Figura 10A.

25

Ejemplo 4. Región V de secuencias de anticuerpos que se unen a la IL-6 y bloquean la interacción con la gp130.

Las secuencias de la región V de anticuerpos monoclonales Mab#195, Mab#309, Mab#471, y Mab#476 fueron determinadas de acuerdo con procedimientos estándar. El ARNm de cada uno de los clones de hibridoma fue purificado utilizando el Dynabeads mRNA Direct Kit (Dyna) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo Transcripción Inversa PCR (RT-PCR) para obtener ADNc utilizando el Kit de síntesis de ADNc BD SMART™ (BD Clontech) de acuerdo con el manual del fabricante. Se llevaron a cabo dos PCR sucesivos utilizando el DNc como plantilla, oligonucleótidos anidados y la polimerasa KOD (EMD Biosciences), tal y como se instruye por parte del fabricante. Los oligonucleótidos 3' eran específicos para amplificar VH y Vk de un anticuerpo IgGyl de un ratón mientras que los oligonucleótidos 5' eran oligonucleótidos anidados del kit de síntesis de ADNc BD SMARTY' (secuencias añadidas al 5' durante la RT-PCR).

30

35

Por ejemplo, las regiones V de la cadena pesada y la cadena liviana fueron obtenidas por amplificación de PCR utilizando un cebador de región constante con las secuencias de oligonucleótidos y condiciones indicadas más adelante.

40 Amplificación de VH:

PCR#1

ES 2 382 164 T3

5' Oligonucleótido #1: 5' ACAACGCAGAGTACGCGG 3' (SEQ ID NO:43)
 3' Oligonucleótido #1: 5' AGGAGAGCTGGGAAGGTGTG 3' (SEQ ID NO:44) PCR#2
 5' Oligonucleótido #2: 5' ACAACGCAGAGTACGCGG 3' (SEQ ID NO:45)
 3' Oligonucleótido #2: 5' TAGCCCTTGACCAGGCATCCC 3' (SEQ ID NO:46)

5 Amplificación de Vk:

PCR#1

5' Oligonucleótido #1: 5' ACAACGCAGAGTACGCGG 3' (SEQ ID NO:47)
 3' Oligonucleótido #1: 5' CTGCCATCAATCTTCCACTTGAC 3' (SEQ ID NO:48)

PCR#2

10 5' Oligonucleótido #2: 5' CATCCTCTCTTCCAGCTCTC 3' (SEQ ID NO:49)
 3' Oligonucleótido #2: 5' CTGAGGCACCTCCAGATG 3' (SEQ ID NO:50)

PCR #1	2min	94 °C		PCR #2	2min	94 °C
	30sec	90 °C			30sec	90 °C
	30sec	65 °C	X30		30sec	65 °C
	30 sec	72 °C			30 sec	72 °C
		72 °C				72 °C
						X40

15 Los productos por PCR fueron purificados del gel de agarosa utilizando el kit de extracción de gel QIAquick (QIAGEN) y subclonados en el vector pCR4 TOPO blunt (Invitrogen) para su secuenciación. Las secuencias fueron obtenidas utilizando cebadores T7 y T3 y procedimientos de secuenciación estándar.

Las secuencias de cadena liviana y cadena pesada que incluyen secuencias de región V de Mab#195, Mab#309, Mab#471, y Mab#476 se muestran a continuación.

Región madura VH de Mab #195 (SEQ ID NO:33)

**EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNNYAT
 HYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNRLRAEDTGIYYCTREDYYGYPDYWGQGTTLTVSS**

20 Región madura Vk de Mab #195 (SEQ ID NO:29)

**DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNFGISFMNWFQKPGQPPKLLIYVASNQGS
 GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGKLEIK**

Región madura VH de Mab #309 (SEQ ID NO:34)

**EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSVASGFTFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLKSNGKAT
 HYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNRLRAEDTGIYYCASLLYDGYLHWGQGTTLTVSA**

Región madura VK de Mab #309 (SEQ ID NO:30)

25 **DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVGNFGISFMNWFQKPGQPPKLLIYTASNQGS
 GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDSAMYFCQQSKEVPWTFGGGKLEIK**

Región madura VH de Mab #471 (SEQ ID NO:35)

EVKFEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFSFSNYWMNWVRQSPEKGLEWVAEIRLTSNKQAI
YYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRADDTGIYYCASLFYDGYLHWGQGLVTVSA

Región madura VK de Mab #471 (SEQ ID NO:31)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVGNFGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYTASNQGS
GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDSAMYFCQQSKEIPWTFGGGKLEIK

5 Región madura VH de Mab #476 (SEQ ID NO:36)

EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWVRQSPEKGLEWVAEIRSKANNHAT
YYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNLRADDTGIYYCTTPTLYGAMDYWGQGSVTVSA

Región madura VK de Mab #476 (SEQ ID NO:32)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVHNFGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYTASNQGS
GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDTAMYFCQOGKEVPWTFGGGKLEIK

ADN que codifica la región madura VH de mAb #195 (SEQ ID NO:51)

GAAGTGAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATCCATGAAACTC
TCCTGTGTTGCCTCTGGATTCACCTTCAGTAACTACTGGATGAACTGGGTCCGCCAGTCT
CCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGATTGAAATCTAATAATTATGCAACA
CATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGTAGT
GTCTACCTGCAAATGAACAACTTAAGAGCTGAAGACACTGGCATTATTACTGTACCAGG
10 GAGGACTACTACGGCTACCCTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

ADN que codifica la región madura VK de mAb #195 (SEQ ID NO:52)

GACATTGTGCTGACCCAGTCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGTCAGAGGGCCACC
ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTTGATAATTTTGGCATTAGTTTTATGAACTGGTTC
CAACAGAAACCTGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGTTGCATCCAACCAAGGATCC
GGGGTCCCTGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCAT
CCTATGGAGGAGGATGATACTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAAGGAGGTTCCGTGG
ACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA

ADN que codifica la región madura VH de mAb #309 (SEQ ID NO:53)

GAAGTGAAACTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTTCAACCTGGAGGATCCATGAAACTC
TCCTGTGTTGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTACTGGATGAACTGGGTCCGCCAGTCT
CCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGACTGAAATCTAATAAGGGTGCAACA
CATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTACCATCTCAAGGGATGATTCAAAAGTAGT
GTCTACCTGCAAATGAACAACCTAAGAGCTGAAGACACTGGCATTATTACTGTGCCAGC
CTTTTGTATGATGGTTACTTACATTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

ADN que codifica la región madura VK de mAb #309 (SEQ ID NO:54)

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACC
ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTGGTAATTTTGGCATTAGTTTTATGAATTGGTTC
CAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATACTGCATCCAACCAAGGATCC
GGGGTCCCTGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCAT
CCTATGGAGGAGGATGATTCTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAAGGAGGTTCCGTGG
ACGTTTCGGTGGAGGCACCAAACCTGGAAATCAAA

5

ADN que codifica la región madura VH de mAb #471 (SEQ ID NO:55)

GAAGTGAAGTTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCGGGAGGATCCATGAAACTC
TCCTGTGTTGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAACTACTGGATGAACTGGGTCCGCCAGTCT
CCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTTGCTGAAATTAGATTGACATCTAATAAGCAGGCAATA
TATTATGCGGAGTCTGTGAAAGGGAGATTCACCATCTCAAGAGATGATTCAAAAGTAGT
GTCTACCTGCAAATGAACAACCTAAGAGCTGAAGACACTGGCATTATTACTGTGCCAGC
CTTTTCTATGATGGTTACTTACATTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

ADN que codifica la región madura VK de mAb #471 (SEQ ID NO:56)

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACC
ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTGGTAATTTTGGCATTAGTTTTATGAACTGGTTC
CAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATACTGCATCCAACCAAGGATCC
GGGGTCCCTGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCAT
CCTATGGAGGAGGATGATTCTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAAGGAGATTCCGTGG
ACGTTTCGGTGGAGGCACCAAACCTGGAAATCAAA

10

ADN que codifica la región madura VH de mAb #476 (SEQ ID NO:57)

GAAGTGAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCAACCTGGAGGATCCATGAAACTC
 TCTTGTGCTGCCTCTGGATTCACTTTTAGTGACGCCTGGATGGACTGGGTCCGCCAGTCT
 CCAGAGAAGGGGCTTGAGTGGGTGCTGAAATTAGAAGTAAAGCTAATAATCATGCAACA

TACTATGCTGAGTCTGTGAAAGGGAGGTTACCATCTCAAGAGATGATTCCAAAAGTAGT
 GTCTACCTGCAAATGAACAGCCTAAGAGCTGAAGACACTGGCATTATTACTGTACGACC
 CCTACTCTCTATGGCGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCTGCA

ADN que codifica la región madura VK de mAb #476 (SEQ ID NO:58)

GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTTGGGCAGAGGGCCACC
 ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTTTCATAATTTTGGCATTAGCTTTATGAACTGGTTC
 CAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATACTGCATCCAACCAAGGATCC
 GGGGTCCCTGCCAGGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCAT
 CCTGTGGAAGAGGATGATACTGCAATGTATTTCTGTCAACAAGGTAAGGAGGTTCCGTGG
 ACGTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAAC

5 Las secuencias de las regiones V fueron alineadas tal como se muestra en la Figura 2. Las variaciones de posición entre las secuencias se encuentran indicadas con flechas. Las regiones CDR están encuadradas. En base a la alineación, resulta claro que cada anticuerpo representa un aislado independiente, y que los anticuerpos son similares entre sí. Los anticuerpos 309 y 471 están muy relacionados, con únicamente una sustitución en la cadena liviana, una sustitución Ile/Val en la posición 98; y únicamente seis sustituciones en la cadena pesada. Estos anticuerpos pueden obtenerse de un clon IgM original que se diversificó a través de mutación somática y por tanto podrían no ser verdaderamente independientes.

10 Los anticuerpos 195 y 476 son más similares entre sí que los anticuerpos 309 y 471. Los anticuerpos 195 y 176 difieren en 5 posiciones en la cadena liviana y 18 posiciones en la cadena pesada. El análisis de la CDR3 en la cadena pesada de los anticuerpos 195 y 476 sugirió que estas cadenas estaban formadas por eventos de unión V-D-J y por tanto representan anticuerpos que se obtienen de IgM parentales independientes. Por tanto, las secuencias de anticuerpo en la Figura 2 representan al menos 3 selecciones independientes de anticuerpos que se unen a la IL-6 humana y bloquean su interacción con la gp130.

20 **Ejemplo 5. Propiedades farmacocinéticas de los anticuerpos que se unen a la IL-6 y bloquean su interacción con la gp130.**

Se determinó la vida media en suero de los anticuerpos 195 y 476 en ratones. Los anticuerpos 195 y 476 fueron marcados con ¹²⁵I de acuerdo con procedimientos estándar. Se inyectaron aproximadamente 25 microgramos de proteína anticuerpo marcada por vía intravenosa en ratones Balb/C, y se extrajeron muestras de sangre en varios momentos incluyendo 12, 24, 48, y 72 horas después de la inyección. Se determinaron los niveles de radiactividad en muestras de sangre completas. En base a este análisis, la vida media de eliminación fue de alrededor de 5 días para cada anticuerpo. Los datos a modo de ejemplo se muestran en la Figura 11.

30 **Ejemplo 6. Inhibición *In vivo* de la secreción de haptoglobina.**

Los anticuerpos de la invención fueron seleccionados específicamente por su habilidad para inhibir la unión de la IL-6 a la subunidad gp130 del receptor. En este experimento, utilizando un ensayo de medición de la secreción de haptoglobina inducida por la administración de un complejo soluble de IL-6Rα/IL6, se comparó la habilidad de un anticuerpo Mab#471 y de un anticuerpo anti IL-6 comercial para bloquear la activación de una vía dependiente de gp130 *in vivo*.

En el día 0, se inyectó a ratones Balb/C hembra de nueve semanas de edad (n=3 por grupo de tratamiento) por vía intraperitoneal 100 µg de o bien un anticuerpo Mab#471 o un anticuerpo comercial anti-IL-6 de R&D Systems (R&D Systems Mab #206) en un volumen de 200 µl. Los ratones en los grupos de control positivo y negativo recibieron 200 µl de PBS. Después de 24 horas, a los ratones en el grupo experimental y en el positivo se les administró 4 µg de muFc-IL6Rα-IL6 intra-peritonealmente en un volumen de 200 µl para inducir la secreción de haptoglobina, y a los ratones en el grupo de control negativo se les administró 200 µl de PBS. En 0, 8, y 24 horas después del tratamiento, se obtuvo aproximadamente 100 µl de sangre de cada ratón por sangrado retro-orbital, y se aisló la fracción de plasma. La concentración de haptoglobina en el plasma se determinó utilizando un kit ELISA de haptoglobina murina (Immunology Consultants Laboratory, Inc., Newberg, OR, Cat # E90HPT), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Como se muestra en la Figura 12, los niveles de haptoglobina en ratones tratados con el anticuerpo Mab#471 fueron significativamente menores, alrededor de un 30% del nivel observado en el grupo de control positivo en 24 horas, y también significativamente menor que en ratones tratados con el anticuerpo comercial MAb #206. Los niveles aumentados de haptoglobina observados en ratones del grupo de control negativo ocurrieron probablemente debido a la irritación causada por el procedimiento repetido de sangrado retro-orbital. Por tanto, la inhibición real de la secreción de haptoglobina causada de manera específica por Fc-IL6Rα-IL6 es incluso mayor del 70%, cuando se sustrae la anterior secreción de haptoglobina observada en los ratones de control. Estos resultados demuestran que el anticuerpo de la invención, por ejemplo, el anticuerpo #471, que se une a la IL-6 y bloquea su interacción con la subunidad gp130 del receptor, es efectivo en la inhibición de las vías de señalización dependientes de la gp130 que pueden ser activadas mediante un complejo IL-6Rα/ IL-6 formado previamente.

Ejemplo 7. Actividad anti tumoral *in vivo*.

Los anticuerpos Mab#195, Mab#309, Mab#471 y Mab#476 se probaron para actividad anti-tumoral *in vivo*. Se estableció un modelo de metástasis de pulmón en ratones SCID utilizando células PC3-MM2 que secretan IL-6 por lo que IL-6 es un factor de crecimiento. Alrededor de $2,0 \times 10^6$ de células PC3-MM2 fueron inyectadas i.v. en cada ratón. Después de 11 días los ratones fueron tratados con cinco dosis diarias de 5 µg/ml de anticuerpos monoclonales Mab#195, Mab#309, Mab#471 y Mab#476. Los resultados habituales se muestran en la Figura 13. Tal como se ilustra en la Figura 13, los anticuerpos Mab#195, Mab#309, Mab#471 y Mab#476 inhiben la metástasis de pulmón en ratones.

Se realizó otro experimento utilizando tratamiento de anticuerpos después de sólo 5 días posteriores a la inyección de células, en lugar de los habituales 10 días. Se obtuvieron resultados similares.

Ejemplo 8. Construcción de anticuerpos anti-IL-6 con regiones constantes humanas.

Un anticuerpo quimérico contra la IL-6 que incluye las regiones V del anticuerpo Mab#471 y las regiones constantes humanas fue construido mediante técnicas como las descritas en la Patente estadounidense US No. 6,969,517, de Gillies et al., se obtuvieron secuencias de ADN que codifica las regiones V de Mab#471 por amplificación de PCR utilizando los siguientes oligonucleótidos. Las regiones en letra minúscula son para los adaptadores y las regiones en mayúsculas son regiones V específicas.

VL directo (con sitio Afl II): cttaaagcGACATTGTGCTGACCCAATC

(SEQ ID NO:59)

VL inverso (con sitio Bgl II): agatctactacgTTTGATTCCAGTTTGGTGCC

(SEQ ID NO:60)

VH directo (con sitio Afl II): cttaaagcGAAGTGAAGTTTGAGGAGTC

(SEQ ID NO:61)

VH inverso (con sitio Hind III): aagcttactaccTGCAGAGACAGTGACCAG

(SEQ ID NO:62)

Las secuencias resultantes que se obtienen de ratones se insertaron en un vector de expresión de un anticuerpo tal como se describe en la Patente estadounidense U.S. No. 6,969,517, Ejemplo 3, para generar un plásmido de expresión que codifica un anticuerpo quimérico con una cadena liviana Kappa humana y una cadena pesada IgG1 humana.

- Para obtener clones de células humanas transfectadas de manera estable, el ADN plásmidico fue introducido en células NS/0 de mieloma de ratón por electroporación tal como se describe a continuación. Las células NS/0 se cultivaron en un medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco complementado con 10% de suero fetal bovino. Alrededor de 5×10^6 de células se lavaron una vez con PBS y fueron resuspendidas en 0,5 ml de tampón fosfato salino (PBS). Después se incubaron 10 µg de ADN plasmídico linealizado con las células en una cubeta Gene Pulser® (0,4 cm de espacio entre electrodos, BioRad) durante 10 minutos en hielo. La electroporación fue realizada utilizando un Gene Pulser® (BioRad) con configuraciones a 0,25 V y 500 µF. Las células se recuperaron durante 10 minutos en hielo, tras lo cual fueron re-suspendidas en un medio de cultivo y se colocaron entonces en dos placas de 96 pocillos. Los clones transfectados de manera estable se seleccionaron mediante su cultivo en presencia de 100 nM de metotrexato (MTX), que fue añadido al medio de cultivo dos días después de la transfección. Las células se alimentaron cada 3 días durante dos o tres veces más, y los clones resistentes al MTX aparecieron en unas 2 a 3 semanas. Se sometieron a ensayo sobrenadantes de clones mediante ELISA anti-Fc humana para identificar productores altos (Gillies et al. (1989) J. Immunol. Métodos, 125:191). Los clones de alta producción se aislaron y se propagaron en un medio de cultivo que contenía 100 nM de MTX.
- 15 Para confirmar que el anticuerpo 471 quimérico mantenía las propiedades deseadas, esta molécula se probó para la inhibición de la producción de haptoglobina *in vitro*, tal como se ha descrito en el ejemplo 6 con anterioridad; para la inhibición y proliferación de las células de mieloma LP-1; y para la inhibición de la producción de la haptoglobina *in vivo*, tal como se ha descrito en el ejemplo 6 con anterioridad. Como controles, se utilizaron los anticuerpos anti-IL-6 Mab 206 (R&D Systems; Minneapolis, Minnesota) y CNTO-328 (Zaki M.H. et al., Int. J. Cancer, (2004) 111:592-5).
- 20 Los efectos del anticuerpo 471 quimérico (Ch anti IL-6 #471) producido a partir de una línea celular transfectada de manera estable en la secreción de haptoglobina se encuentran indicados en la tabla a continuación. Se obtuvieron resultados similares del anticuerpo quimérico 471 producido a partir de células transfectadas de manera transitoria.

	Inhibición de la Haptoglobina		
	IC50 (ng/ml)		
	AVG	SD	Repeticiones
Ch anti IL-6 # 471 + IL-6	1,89	0,42	2
MAb 206+ IL-6	16,08	12,48	2
Ch anti IL-6 CNTO-328 + IL-6	5,19	0,88	2
Ch anti IL-6 # 471 + IL-6Rα-IL-6	1,31	0,57	3
MAb 206+ IL-6Rα-IL-6	4,80	2,64	3
Ch anti IL-6 CNTO-328 + IL-6Rα-IL-6	>333	0,00	3

- 25 Los resultados indican que el anticuerpo quimérico 471 es efectivo en la inhibición de la función tanto de la IL-6 como de la proteína de fusión IL-6/ IL-6Rα. En contraste, Mab#206 es relativamente no efectivo en la inhibición de la secreción de haptoglobina estimulada por la IL-6 o bien la proteína de fusión IL-6/ IL-6Rα, y CNTO-328 muestra una profunda deficiencia en la inhibición de la secreción de haptoglobina estimulada por la proteína de fusión IL-6/ IL-6Rα.
- 30

El anticuerpo quimérico 471 también se probó para su habilidad para inhibir la proliferación de las células de mieloma LP-1. LP-1 es una línea celular del mieloma humano cuya proliferación puede ser estimulada por la IL-6.

5 El ensayo de proliferación de células LP-1 se llevó a cabo tal como sigue a continuación. Las células LP-1 se obtuvieron de DSMZ (gato #ACC 41) (Georgii-Hemming P. et al. Blood (1996) 88:2250). Las células se cultivaron en 20% de FBS y luego se privaron de nutrientes durante 3 días en medios con 1% de FBS antes del ensayo de proliferación. Después de la privación de nutrientes, las células se lavaron tres veces y se diluyeron en medios que
 10 contenían 0,5% de FBS. Los anticuerpos anti-IL-6 se diluyeron y se incubaron en la placa con 0,005 ng/ml de IL-6 o bien 0,05 ng/ml con estimulación de la proteína de fusión Fc-IL6R α -IL6 durante una hora a 37 °C 5% de CO₂. Entonces se añadieron alrededor de 100,000 células en 100 μ l a pocillos de una placa de 96 pocillos con 100 μ l de proteínas diluidas más estimulación, incubadas durante 56 horas, y luego se añadió ³H Timidina durante las últimas 16 horas. Las células se recogieron entonces de los pocillos con agua en placas filtrantes de microfibra de vidrio y se midió la radiactividad por recuento en centelleo líquido.

La tabla a continuación muestra los resultados habituales con el anticuerpo quimérico 471 producido a partir de una línea celular transfectada. Se obtuvieron resultados similares del anticuerpo quimérico 471 producido a partir de células transfectadas de manera transitoria.

	Proliferación de LP-1		
	IC50 (ng/ml)		
	AVG	SD	Repeticiones
Ch anti IL-6 # 471 + IL-6	5,15	2,27	3
MAB 206+ IL-6	341,87	234,58	3
Ch anti IL-6 CNTO-328 + IL-6	10,07	1,42	3
Ch anti IL-6 # 471 + IL-6R α -IL-6	0,39	0,36	3
MAB 206+ IL-6R α -IL-6	7,77	8,08	3
Ch anti IL-6 CNTO-328 + IL-6R α -IL-6	1608	539	3

15 Los resultados indican que el anticuerpo quimérico 471 es efectivo en la inhibición de la proliferación de LP-1 estimulada tanto por la IL-6 como por la proteína de fusión IL-6/ IL-6R α . En contraste, el Mab#206 es no efectivo en la inhibición de la proliferación de LP-1 estimulada por la IL-6, y CNTO-328 muestra una profunda deficiencia en la inhibición de la proliferación de LP-1 estimulada por la proteína de fusión IL-6/ IL-6R α .

20 Se sometieron también a prueba los efectos inhibitorios del anticuerpo quimérico 471 y varios anticuerpos de control en la secreción de la haptoglobina *in vivo* tal como se ha descrito en el Ejemplo 6.

Se obtuvieron los siguientes resultados.

	0 horas ug/ml		3 horas ug/ml		24 horas ug/ml		8 horas	24 horas	TTEST VS PBS	
	Haptaglobina		Haptaglobina		Haptaglobina		%	%		
	AVG	SD	AVG	SD	AVG	SD	Inhibición	Inhibición	8 Hrs	24 Hrs
Sin Tratamiento	0,8	0,1	0,8	0,9	4,2	4,7				
PBS	0,6	0,1	24	17	113	170				
Fc-IL6R α -IL6	0,8	0,1	463	128	994	125				
Ch 471	1,0	0,2	83	61	214	176	82	78	0,0	0,00
CNTO 328	0,8	0,2	406	58	1027	91	12	-3	0,52	0,73
R&O	0,6	0,3	297	71	672	58	36	32	0,12	0,02
MAB206 Anti-CD19 chB4	0,8	0,1	487	138	1335	346	-5	-34	0,86	0,18

5 Estos resultados indican que el anticuerpo quimérico 471 (denominado como Ch 471 en la tabla anterior) bloquea fuertemente la secreción de haptoglobina estimulada por un complejo IL-6/ IL-6R α , mientras que los anticuerpos de control tales como Mab#206 y CNTO-328 son menos efectivos o no efectivos en la inhibición de la secreción de haptoglobina.

Ejemplo 9. Tratamiento de un paciente humano con anticuerpos y métodos de la invención.

10 Los anticuerpos anti IL-6 de la invención se utilizan para tratar enfermedades y trastornos en humanos tal como se indica a continuación. En general, el método preferente de administración es mediante infusión *i.v.* o inyección *i.v.*, aunque la inyección subcutánea, inhalación, administración oral, y otros métodos son también posibles. Se utiliza la administración alrededor de una vez cada 2, 3 o 4 semanas, aunque la frecuencia de administración varía dependiendo de las necesidades del paciente. Una dosis típica es de aproximadamente 100 a 800 mgs para un humano adulto. Los pacientes tratados son monitoreados para posibles señales de infección que puedan ser resultado de la inmunosupresión.

15 Por ejemplo, un paciente con la enfermedad de Castleman es tratado con el anticuerpo 471 quimérico de la invención aproximadamente una vez cada dos semanas en una dosis de 8 mg/kg, con administración mediante infusión por goteo.

20 Un paciente con artritis reumatoide se trata con el anticuerpo quimérico 471 aproximadamente una vez cada cuatro semanas en una dosis de aproximadamente 8 mg/kg, con administración mediante infusión por goteo. Se descubrió que la progresión de la destrucción de articulaciones se inhibió de manera significativa mediante monoterapia, incluso cuando se compara con fármacos anti-reumáticos modificadores de la enfermedad. Un paciente con la enfermedad de Crohn se trata con el anticuerpo quimérico 471 alrededor de una vez cada cuatro semanas en una dosis de aproximadamente 8 mg/kg, con administración mediante infusión por goteo.

25 Un paciente con mieloma múltiple se trata con un anticuerpo quimérico 471 alrededor de una vez cada tres semanas en una dosis de aproximadamente 8 mg/kg, con administración mediante infusión por goteo. El tratamiento con el anticuerpo 471 quimérico se combina con un tratamiento de cuidado estándar para el mieloma múltiple según se determina por parte de un médico como apropiado para el paciente.

30 Un paciente con cáncer de próstata metastásico avanzado, con una historia de tratamiento mediante quimioterapia convencional, se trata con el anticuerpo 471 quimérico alrededor de una vez cada tres semanas en una dosis de aproximadamente 8 mg/kg, con administración mediante infusión por goteo. El tratamiento con el anticuerpo 471 quimérico se combina con un tratamiento de cuidado estándar para el cáncer de próstata según se determina por parte de un médico como apropiado para el paciente. También se prescriben fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo NaproxenoTM. Como resultado de la quimioterapia previa, el paciente presenta leucocitos deprimidos y niveles bajos de linfocitos T naive. El paciente es monitorizado de manera particularmente atenta para una posible infección como resultado de la inmunosupresión y se trata con antibióticos profilácticos. Se ha

descubierto que el tratamiento presenta un efecto positivo en los síntomas del tipo caquexia, tales como pérdida ósea.

5 Un paciente con cáncer de mama refractario a hormonas se trata con anticuerpo quimérico 471 aproximadamente una vez cada tres semanas en una dosis de alrededor de 8 mg/kg mediante infusión por goteo. El tratamiento con el anticuerpo 471 quimérico se combina con un tratamiento de cuidado estándar para el tratamiento del cáncer de mama avanzado según se determina por parte de un médico como apropiado para el paciente. También se prescriben fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo Naproxeno™.

10 En una estrategia de tratamiento alternativa, un paciente con un cáncer refractario a hormonas avanzado o un cáncer de mama refractario a hormonas avanzado, se trata con el anticuerpo 471 quimérico aproximadamente una vez cada tres semanas en una dosis de alrededor de 8 mg/kg, en combinación con una inmunocitoquina tal como Ks-IL2. Estos dos agentes pueden ser co-administrados mediante goteo por infusión. Previamente al tratamiento, se dosifica al paciente con una cantidad de ciclofosfamida inmunoestimuladora. También se prescriben fármacos antiinflamatorios no esteroideos, por ejemplo Naproxeno™. Sin la intención de estar sujeto a la teoría, la combinación de un anticuerpo anti IL-6 de la invención y la inmunocitoquina tal como KS-IL2 resulta particularmente efectiva, en parte porque la IL-6 causa una supresión de la señalización de la IL-2 y las respuestas TH1, y los anticuerpos de la invención invierten esta inhibición.

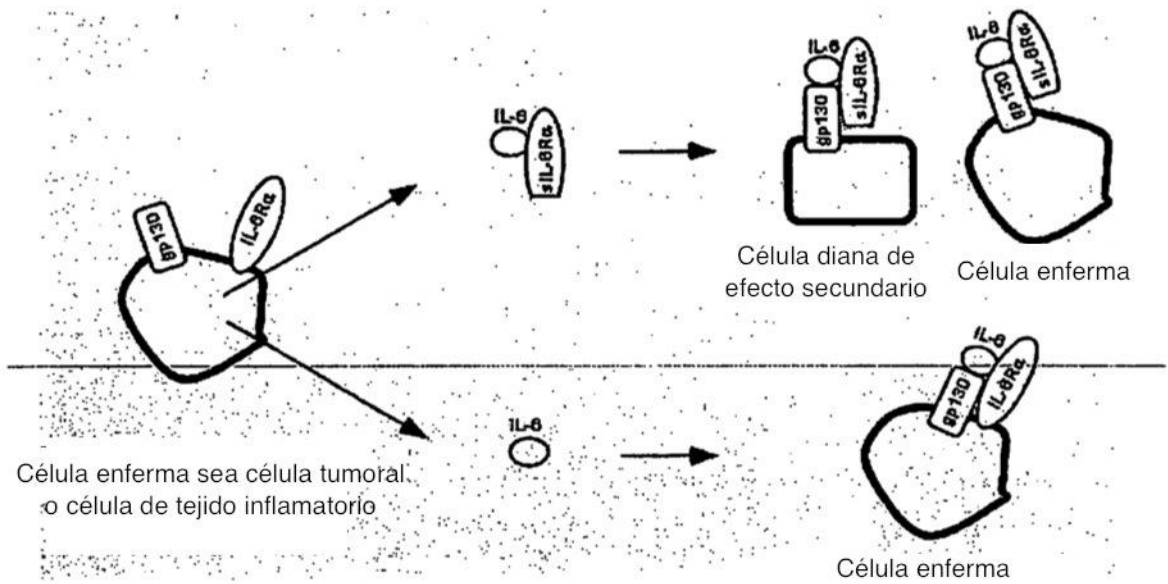
20 Un paciente con un linfoma de linfocitos B se trata con el anticuerpo 471 quimérico aproximadamente una vez cada tres semanas en una dosis de alrededor de 8 mg/kg, de manera opcional en combinación con un anticuerpo tal como Rituxan™ en alrededor de 375 miligramos por metro cuadrado de área de superficie corporal, que se administra cada semana. De manera alternativa, en el caso de un paciente con linfoma refractario, el tratamiento con el anticuerpo 471 quimérico se combina con radioinmunoconjugados tal como Bexxar™ o Zevalin™.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que consta de
- (i) Una fracción Fc de un anticuerpo,
 - (ii) IL6R α y
 - 5 (iii) IL6.
2. Una proteína de fusión según la reivindicación 1, en donde el IL6R α se fusiona al C-terminal de la fracción Fc, y la IL6 se fusiona al C-terminal del IL6R α .
3. Una proteína de fusión según la reivindicación 1 o 2, en donde la fracción Fc es murina y el IL6R α y la IL6 son humanos.
- 10 4. Uso de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 1 – 3 para la fabricación de un anticuerpo anti-IL-6 para el tratamiento del cáncer y enfermedades autoinmunes promovidas por IL-6, en donde este anticuerpo se obtuvo mediante la inmunización de un mamífero con dicha proteína de fusión, y presenta las siguientes propiedades:
- (i) La región variable de dicho anticuerpo se une a un epítipo en la IL-6,
 - 15 (ii) Bloquea estéricamente la interacción entre la IL-6 y la gp130 en la superficie de una célula enferma, y
 - (iii) Evita que la IL-6 en complejo con el IL-6R α se una a la gp130, pero no bloquea estéricamente la interacción entre IL-6 y IL-6R α .
- 20 5. Uso según la reivindicación 4, en donde el anticuerpo cribado es un anticuerpo que consta de (a) una cadena pesada y (b) una cadena liviana que constan de secuencias de aminoácidos seleccionadas del grupo que consiste en
- (i) (a) SEQ ID NO:35 y (b) SEQ ID NO:31,
 - (ii) (a) SEQ ID NO:34 y (b) SEQ ID NO:30,
 - (iii) (a) SEQ ID NO:36 y (b) SEQ ID NO:32, y
 - (iv) (a) SEQ ID NO:33 y (b) SEQ ID NO:29.

Figura 1. El método de tratamiento según la invención

A. Sin tratamiento



B. Tratamiento con un anticuerpo de la invención

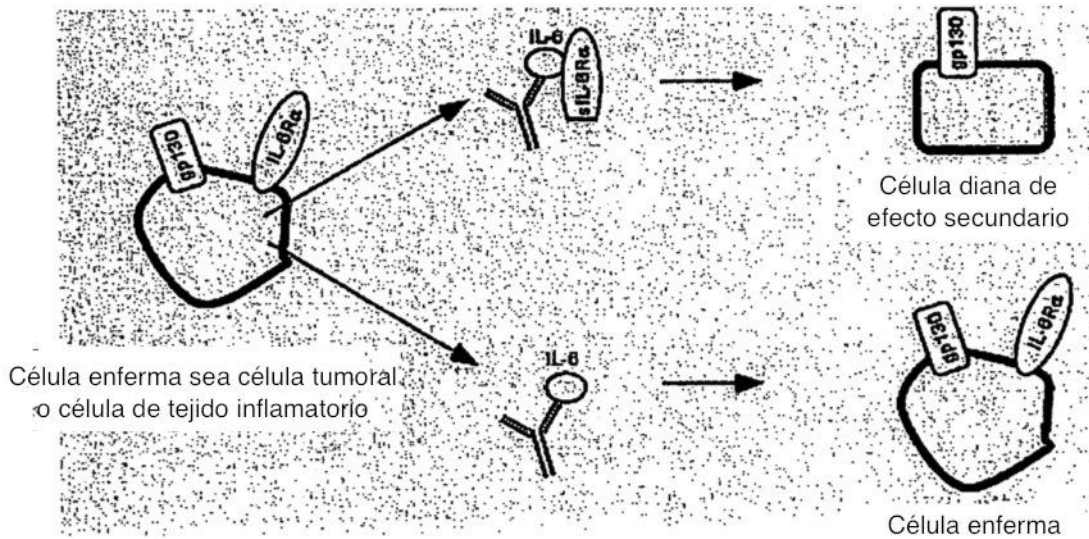


Figura 2. Alineamiento de las secuencias de la región V del anticuerpo que se une a IL-6 y la interacción que bloquea gp130. Las variaciones en las posiciones de las secuencias están indicadas con flechas. Las CDR están encuadradas.

Cadena liviana

			↓		
Mab#195 Vk	(1)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNFGISFMNWFQOKPGQPPKL			(SEQ ID NO:29)
Mab#309 Vk	(1)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVGNFGISFMNWFQOKPGQPPKL			(SEQ ID NO:30)
Mab#471 Vk	(1)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVGNFGISFMNWFQOKPGQPPKL			(SEQ ID NO:31)
Mab#476 Vk	(1)	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVHNFEGISFMNWFQOKPGQPPKL			(SEQ ID NO:32)
			↓		
Mab#195 Vk	(51)	LIYVASNQGSVVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQOSKEVPW			(SEQ ID NO:29)
Mab#309 Vk	(51)	LIYTASNQGSVVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDSAMYFCQOSKEVPW			(SEQ ID NO:30)
Mab#471 Vk	(51)	LIYTASNQGSVVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDSAMYFCQOSKEIPW			(SEQ ID NO:31)
Mab#476 Vk	(51)	LIYTASNQGSVVPARFSGSGSGTDFSLNIHPVEEDDTAMYFCQOSKEVPW			(SEQ ID NO:32)
			↓		
Mab#195 Vk	(101)	TFGGGTKLEIK			(SEQ ID NO:29)
Mab#309 Vk	(101)	TFGGGTKLEIK			(SEQ ID NO:30)
Mab#471 Vk	(101)	TFGGGTKLEIK			(SEQ ID NO:31)
Mab#476 Vk	(101)	TFGGGTKLEIK			(SEQ ID NO:32)

Cadena pesada

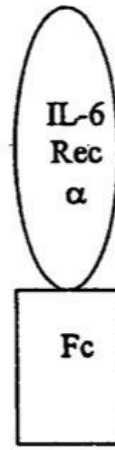
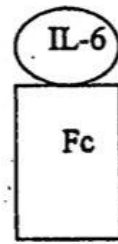
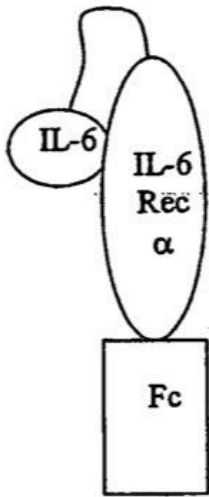
			↓		
Mab#195 VH	(1)	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNYWMNWRQSPKGLWVAE			(SEQ ID NO:33)
Mab#309 VH	(1)	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFTFSNYWMNWRQSPKGLWVAE			(SEQ ID NO:34)
Mab#471 VH	(1)	EVKFEESGGGLVQPGGSMKLSCVASGFSFSNYWMNWRQSPKGLWVAE			(SEQ ID NO:35)
Mab#476 VH	(1)	EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCAASGFTFSDAWMDWRQSPKGLWVAE			(SEQ ID NO:36)
			↓		
Mab#195 VH	(51)	IRLKSNNYATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNRLRAEDTGIYYCTR			(SEQ ID NO:33)
Mab#309 VH	(51)	IRLKSNGATHYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNRLRAEDTGIYYCAS			(SEQ ID NO:34)
Mab#471 VH	(51)	IRLTSNKQAIYYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNRLRAEDTGIYYCAS			(SEQ ID NO:35)
Mab#476 VH	(51)	IRSKANNHATYYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNRLRAEDTGIYYCTT			(SEQ ID NO:36)
			↓		
Mab#195 VH	(101)	EDYYGYPDYWGQGTTLTVSS			(SEQ ID NO:33)
Mab#309 VH	(101)	LLYDGY-LHWGQGTTLTVSA			(SEQ ID NO:34)
Mab#471 VH	(101)	LFYDGY-LHWGQGTTLTVSA			(SEQ ID NO:35)
Mab#476 VH	(101)	PTLYGAMDYWGQGTSTVTVSA			(SEQ ID NO:36)

Figura 3. Representación esquemática de las proteínas aquí utilizadas

A. Fc-IL6R alfa -IL6

B. Fc-IL6

C. Fc-IL6R alfa



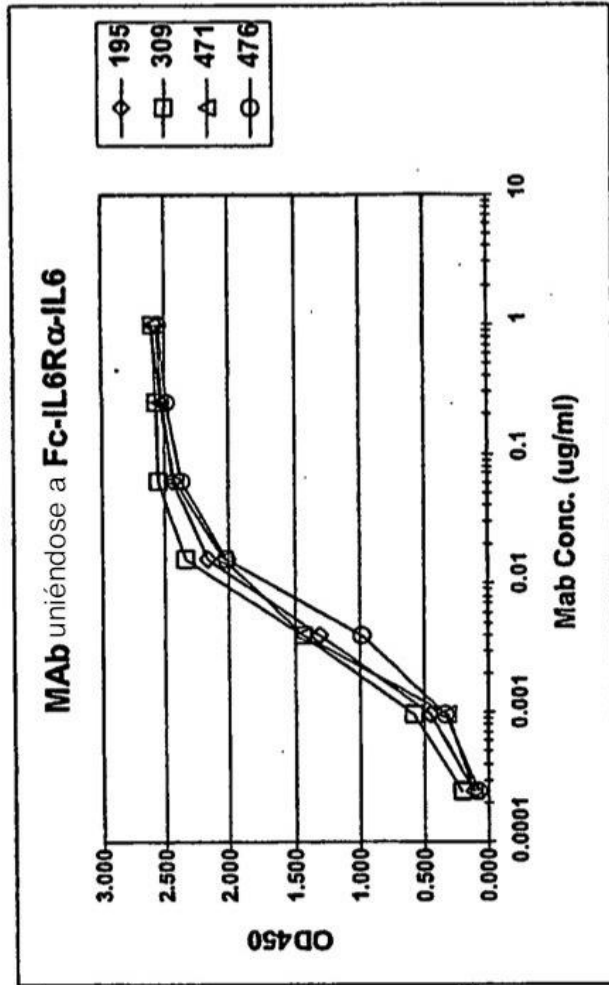


Figura 4

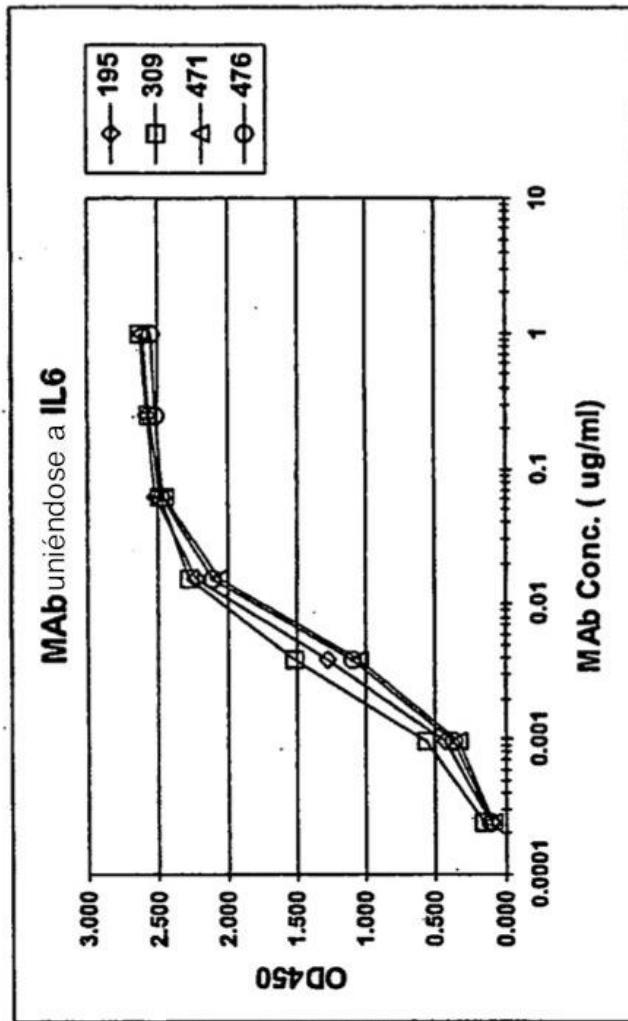


Figura 5

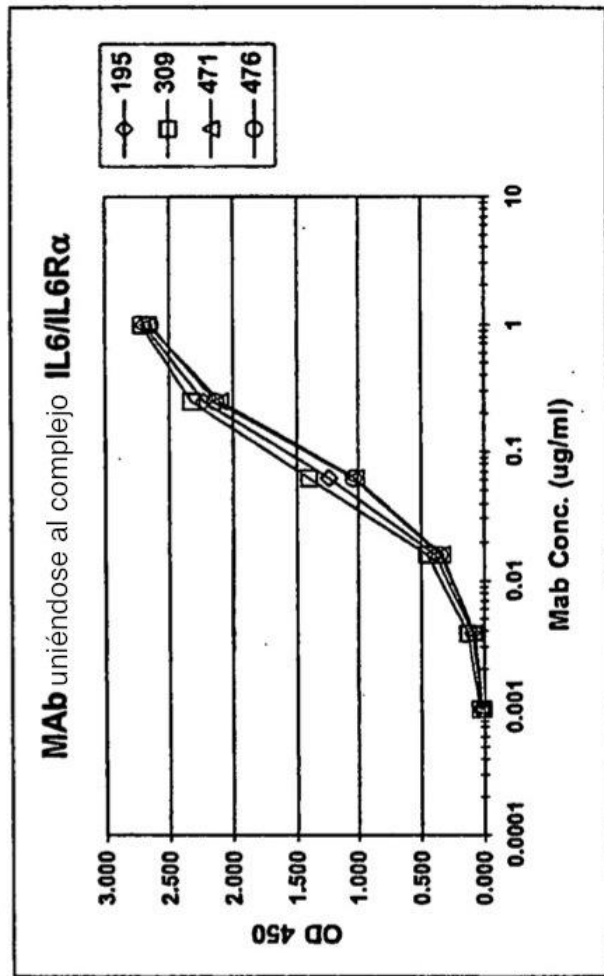


Figura 6

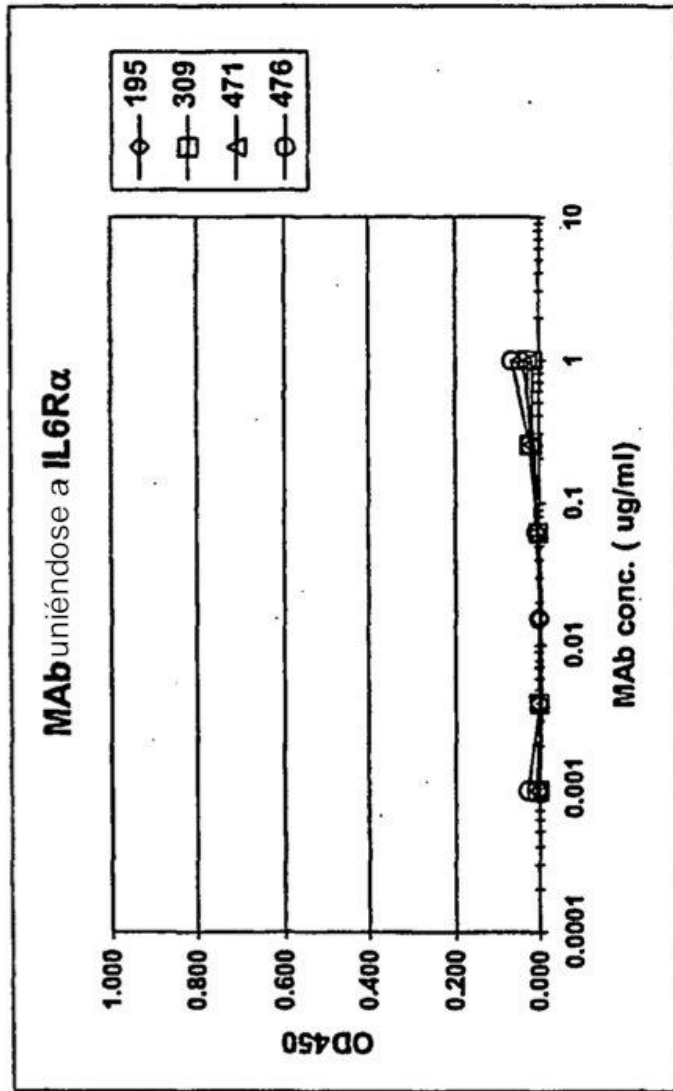


Figura 7

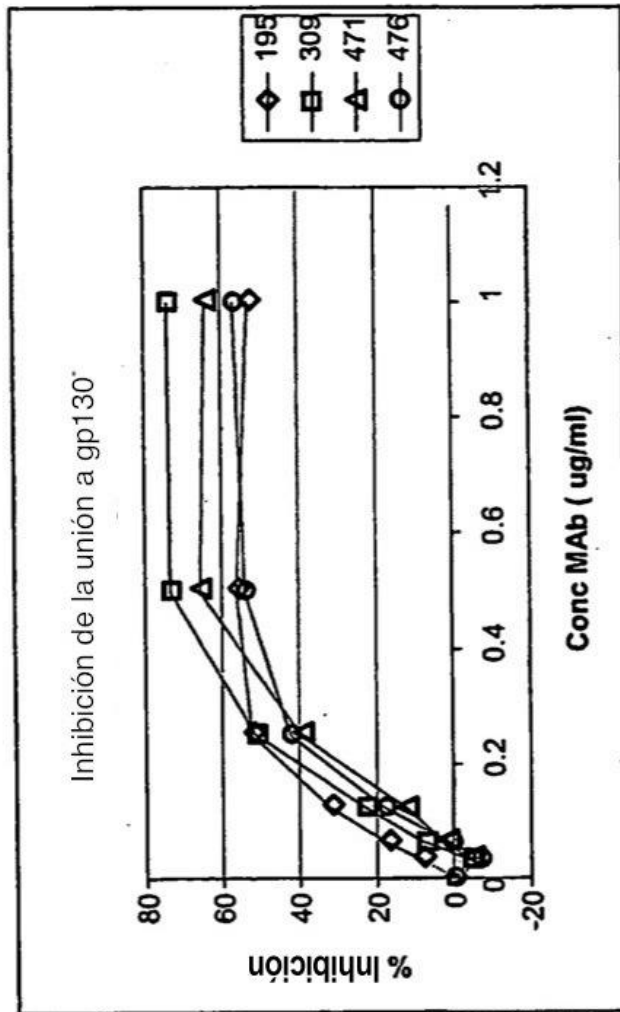


Figura 8

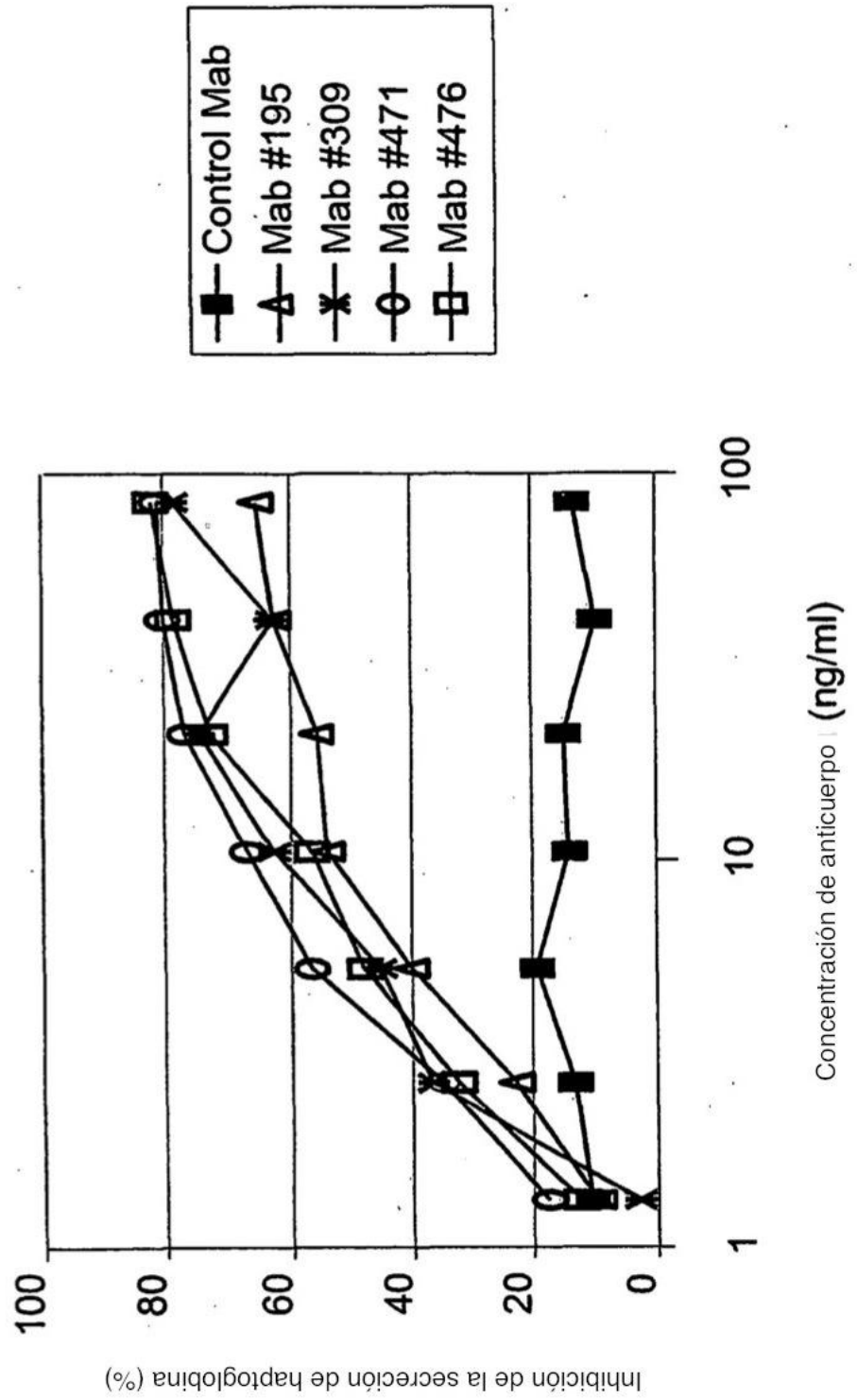


Figura 9

Figura 10A

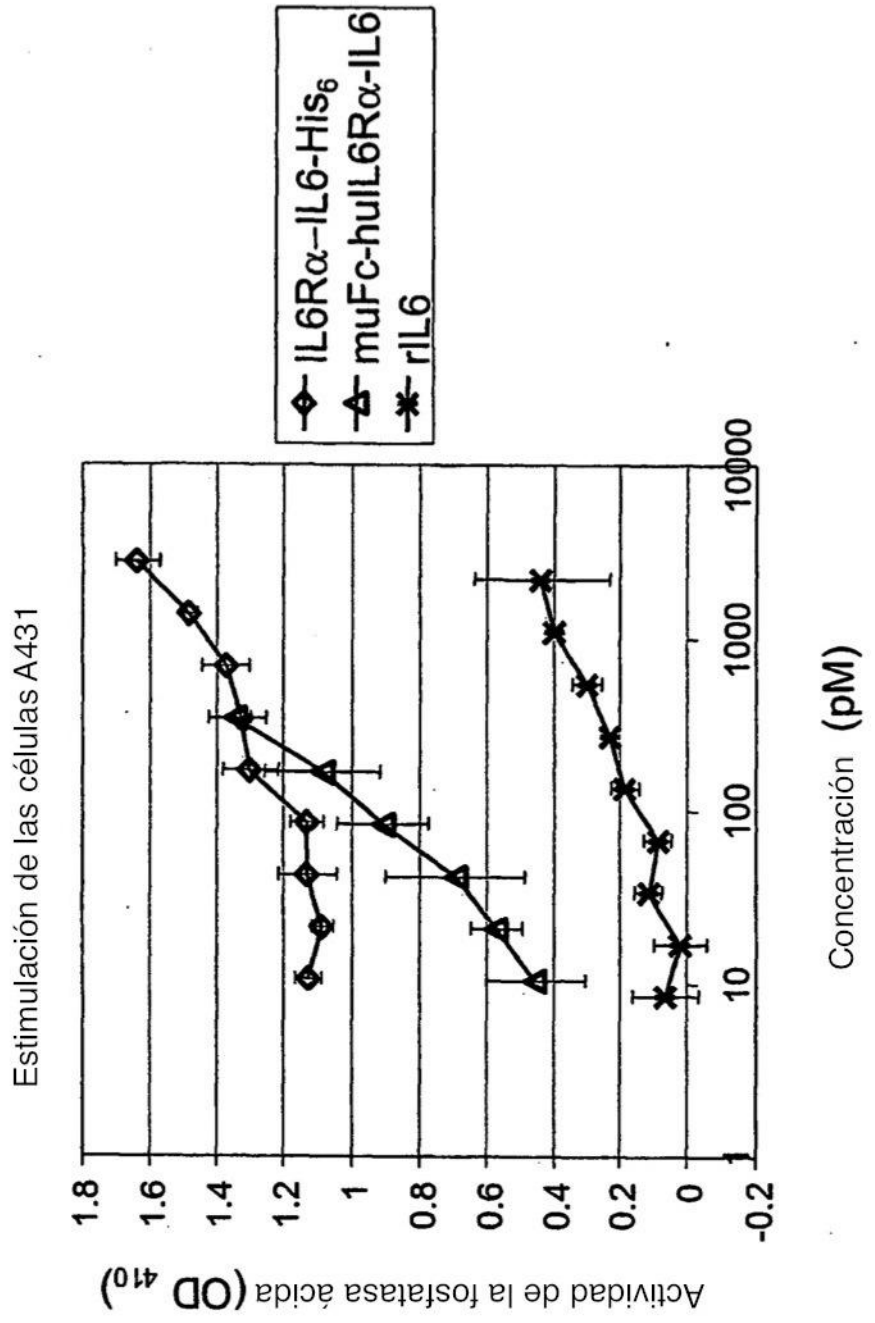


Figura 10B-1

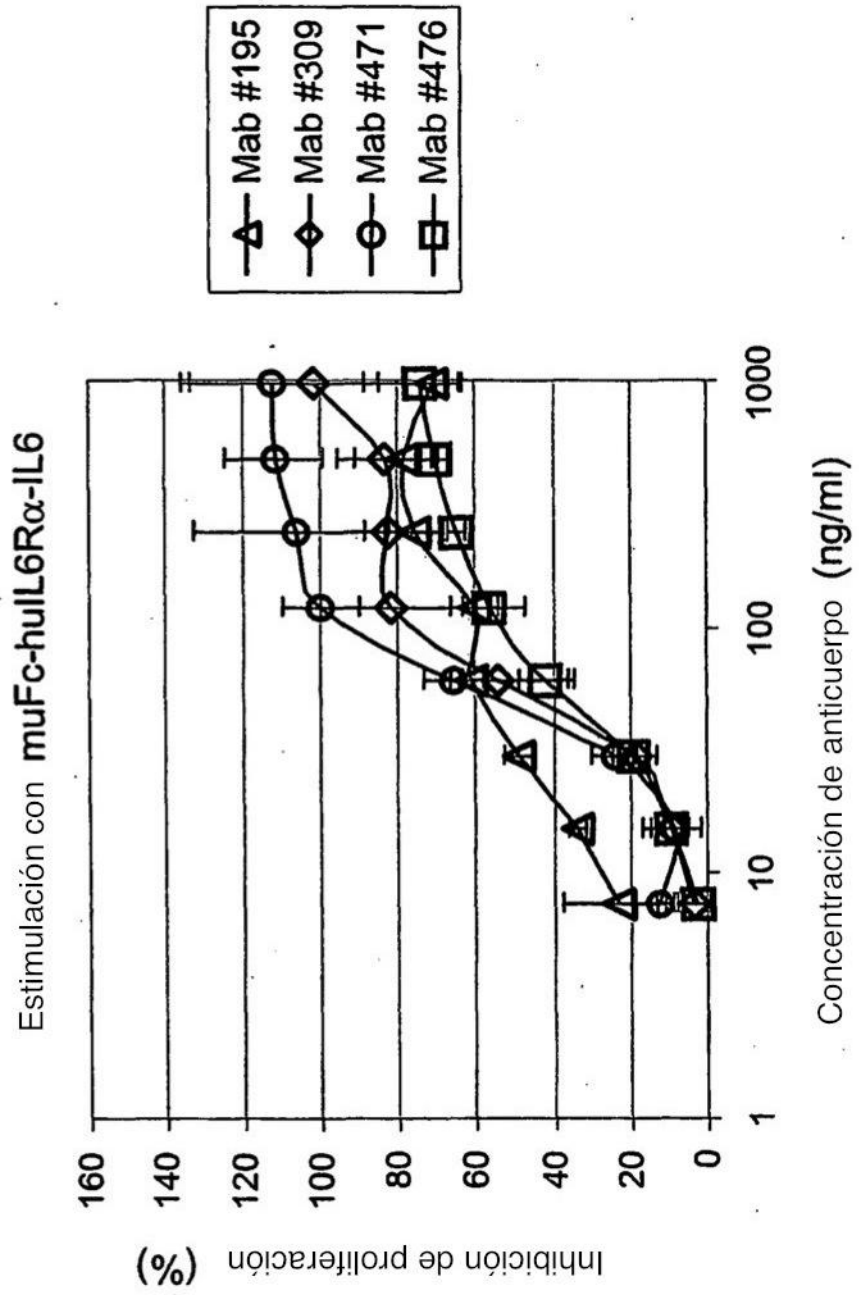
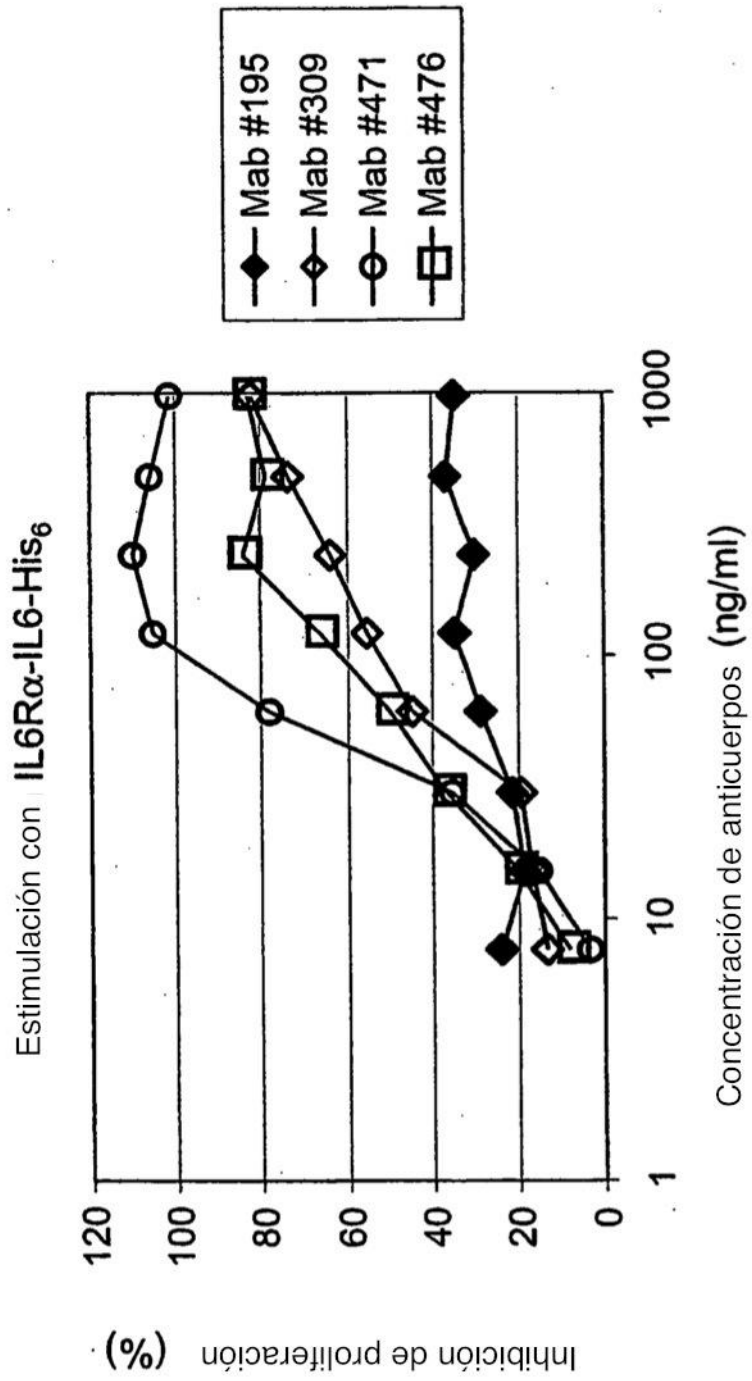


Figura 10B-2



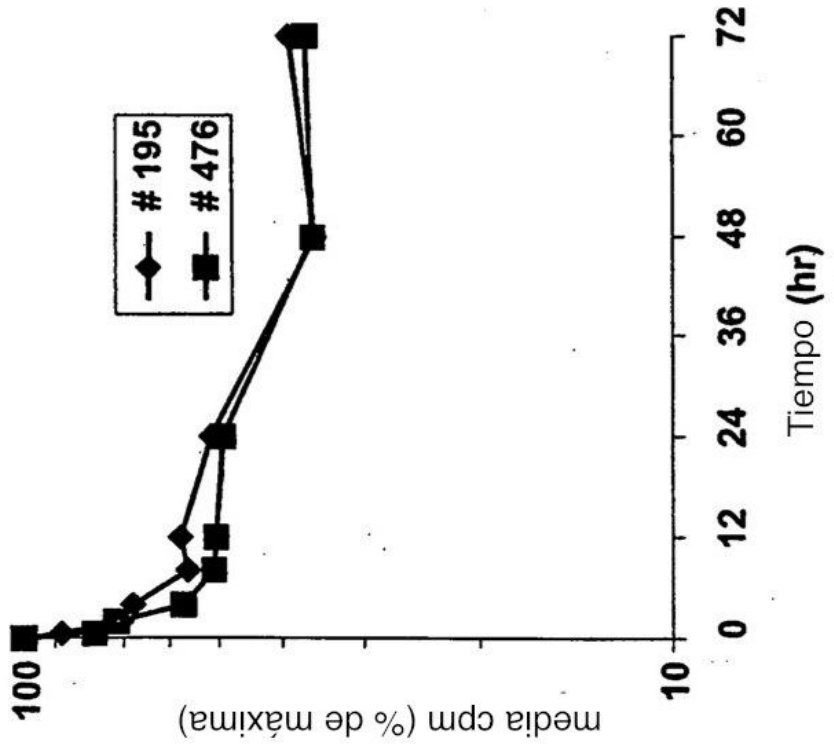


Figura 11

Figura 12. Inhibición in vivo de la secreción de haptoglobina

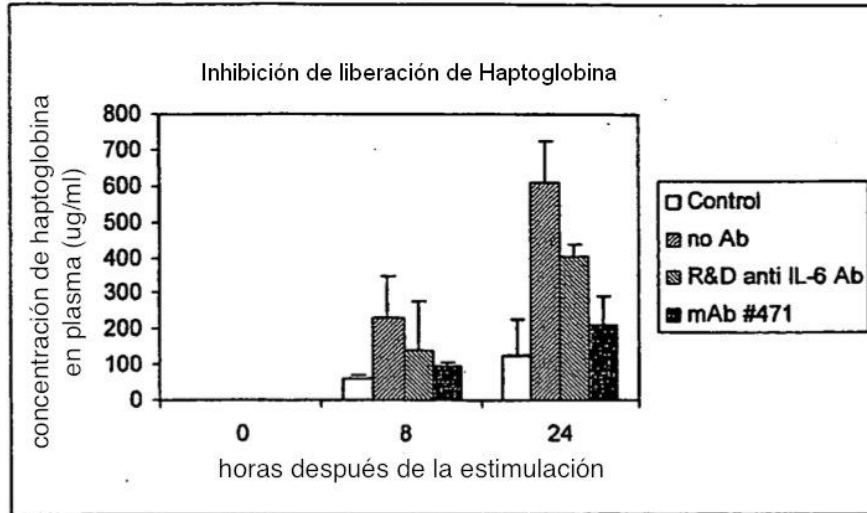


Figura 13

