

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 433 380**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2007 E 07824726 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2013 EP 2074146**

54 Título: **Anticuerpos específicos para el complejo de interleucina 6 y el receptor de interleucina 6**

30 Prioridad:

30.11.2006 US 861705 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

10.12.2013

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE LIMITED (100.0%)
Milstein Building Granta Park
Cambridge CB21 6GH, GB**

72 Inventor/es:

**BOWERS, KEITH CYRIL;
LANE, STEVEN GODFREY;
MALLINDER, PHILIP y
OSSONA DE MENDEZ, ISABELLE VERONIQUE
YOLANDE**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 433 380 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 específicos para el complejo de interleucina 6 y el receptor de interleucina 6

5 Esta invención divulga miembros de unión, especialmente moléculas de anticuerpo, que inhiben los efectos biológicos de la IL-6. Los miembros de unión son útiles para el tratamiento de trastornos asociados con la IL-6, incluyendo enfermedades inflamatorias y tumores.

10 La interleucina 6 (IL-6) es una citocina proinflamatoria pleiotrópica de 26 kDa producida por una variedad de tipos de células, incluyendo fibroblastos estimulados, monocitos y células endoteliales, que constituyen la fuente principal de IL-6 *in vivo*. Células tales como los linfocitos T, los linfocitos B, los macrófagos, los queratinocitos, los osteoblastos y varias otras pueden producir IL-6 con estimulación. La IL-6 también se expresa por líneas de células tumorales y células tumorales, por ejemplo, células de carcinoma de pulmón, cáncer de próstata, mieloma, hipernefoma y mixoma cardíaco (Kishimoto, T., *Blood* 74:1-10 (1989) y Smith P.C. *et al.* *Cytokine and Growth factor Reviews* 12:33-40 (2001)). En condiciones no inflamatorias, se secreta IL-6 desde el tejido adiposo (Wallenius *et al.*, *Nat. Med.* 8:75 (2002)).

20 La regulación de la expresión de la IL-6 depende del tipo de célula que la produce. En células de mieloma múltiple parece que la IL-6 actúa en un bucle de retroalimentación positiva, que estimula el crecimiento de las células y la producción de más IL-6 (Kawano *et al.* *Nature* 332:83 (1988) y Van Zaanen *et al.* *J. Clin Invest.* 98:1441-1448 (1996)). En otros tipos de células, parece que la IL-6 inhibe el crecimiento y la activación de las células y puede actuar como regulador negativo para algunas citocinas proinflamatorias.

25 Para iniciar la señalización celular, la IL-6 se une con baja afinidad a un receptor transmembranario, el receptor de IL-6 alfa (denominado también IL-6R α , IL-6Ra, IL-6R, gp80 o CD126) para formar un complejo "IL-6:IL-6Ra". Este complejo se une al receptor de señales gp130; IL-6R α y gp130 forman conjuntamente un sitio de unión de IL-6 de alta afinidad e inducen la formación de un hexámero compuesto por dos copias de cada uno de IL-6, IL-6Ra y gp130 (Somers, W., *et al.* 1997. *EMBO J.* 16:989-997). Los dominios transmembranario y citoplásmico del IL-6Ra no son necesarios para la transducción de señales, ya que el IL-6Ra existe también en forma secretada soluble (sIL-6R o sIL-6Ra). El receptor soluble se produce por ajuste diferencial del mensajero de IL-6Ra o por liberación proteolítica. El sIL-6R puede formar un complejo ligando-receptor con la IL-6, "IL-6:sIL-6Ra". Este complejo se puede unir a gp130 de las células y, de este modo, iniciar la señalización celular en células positivas para gp130, incluso si esas células no expresan el IL-6Ra. Así, el sIL-6R tiene el potencial de ampliar el repertorio de células que responden a la IL-6 y se cree que desempeñan un papel importante en la inflamación mediada por IL-6 (Jones, S. A *et al.* 2001. *FASEB J.* 15:43-58).

40 Se ha dilucidado la estructura cristalina del ligando de IL-6 humana (Somers *et al.* *EMBO J.* (1997) 16:989-997). También se han resuelto la estructura cristalina del dominio extracelular del IL-6Ra humano (Varghese *et al.* *Proc Nat Acad Sci* (2002) 99:15959-15964) y la estructura hexamérica del complejo IL-6/IL-6R/gp130 (Boulanger *et al.* *Science* 300:2101-2104 (2003)). Estas estructuras combinadas con estudios de mutagénesis han identificado tres sitios sobre la superficie de la IL-6 que están implicados en la actividad funcional de la IL-6 en complejo con los diversos componentes del receptor. Los residuos del sitio 1 están implicados en la interacción entre la IL-6 y el IL-6Ra. Los residuos del sitio 2 están implicados en la interacción entre la IL-6 y el dominio de unión a citocinas de gp130. Los residuos del sitio 3 de la IL-6 están implicados en la interacción con el dominio de tipo Ig del segundo gp130 del complejo hexamérico. También se ha identificado un cuarto sitio en IL-6 donde la IL-6 interacciona con la segunda molécula de IL-6 del complejo hexamérico IL-6/IL-6R/gp130 (Menziani *et al.* (1997) *Proteins: Structure Function and Genetics* 29, 528).

50 Se han llevado a cabo estudios similares en el dominio extracelular del IL-6Ra humano. Esta región extracelular tiene 3 dominios D1 (P26-V112), D2 (P113-Q215), D3 (P216-M311). Aunque se ha demostrado que el dominio Ig D1 no es imprescindible para el reconocimiento del ligando y la inhibición de la señal, está implicado en la internalización del receptor y la estabilidad de la proteína. Los dominios D2 y D3 son dominios de fibronectina de tipo III y forman el dominio de unión a citocinas. En estudios estructurales se han identificado tres sitios "de agrupación" en este dominio extracelular (Varghese *et al.* *Proc Nat Acad Sci* (2002) 99:15959-15964); Los residuos de la agrupación 1 están implicados de forma predominante en la unión al ligando IL-6. Los residuos de la agrupación 2 forman parte de la interfaz de dimerización del IL-6Ra. Estos residuos interfieren con la formación del dímero de IL-6R y tienen un efecto significativo sobre la señalización de IL-6, pero no en la unión de IL-6. Los residuos de la agrupación 3 del IL-6Ra están implicados en la formación del complejo IL-6/IL6R con gp130 para formar el complejo hexamérico IL-6/IL-6Ra/gp130.

60 Se han aislado una serie de anticuerpos monoclonales anti-ligando IL-6. Se han realizado estudios de mapeo que demuestran que éstos se unen a diferentes sitios de unión, como se describe anteriormente, sobre la superficie de la IL-6 humana (Brakenhoff *et al.* *J. Immunol.* (1990) 145:561-568, Wijdenes *et al.* *Mol Immunol.* (1991) 28:1183-1191, Brakenhoff *et al.* (1994) *JBC* 269:86, Kalai *et al.* (1996) *Eur J Biochem* 238 714-723, Kalai *et al.* (1997) *Blood* 89:1319-1333).

También se han generado una serie de anticuerpos monoclonales anti-IL-6Ra y se han mapeado sus sitios de unión en el IL-6Ra (Hirata *et al.* (1989) *J. Immunol* 143:2900-2906, Kalai *et al.* (1996) *Eur J Biochem* 238 714-723, Kalai *et al.* (1997) *Blood* 89:1319-1333, Kalai *et al.* (1997) *Eur J. Biochem* 249:690-700).

5 La IL-6 pertenece a una familia de citocinas que incluye la interleucina 11 (IL-11), el factor neurotrófico ciliar (CNTF), la oncostatina M (OsM), el factor inhibidor de la leucemia (LIF), la citocina similar a la cardiotrofina (CLC) y la cardiotrofina 1 (CT-1). Cada uno de los miembros de esta familia tiene sus propias subunidades de receptor alfa específicas y forma complejos con la subunidad de receptor común gp130. La alteración dirigida del gen de gp130 es mortal para los embriones (Ernst, M. y B. J. Jenkins. 2004. *Trends Genet.* 20:23-32 y Yoshida, K. *et al.* 1996. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:407-411). Todos los miembros de la familia de la IL-6 pueden inducir la expresión de proteínas de fase aguda a partir de hepatocitos.

15 La señalización de IL-6 implica la fosforilación de tirosinas por cinasas de la familia JAK y la posterior activación de dos cascadas de señalización intracelular principales, las rutas SHP2/ERK MAPK y STAT1/3, que dan lugar a la expresión génica a través de NF-IL-6 y AP-1 (Ernst, M. y B. J. Jenkins. 2004. *Trends Genet.* 20:23-32, y Heinrich, P. C. *et al.* 2003. *Biochem.J.* 374:1-20).

20 La IL-6 muestra un amplio espectro de funciones biológicas, incluyendo la hematopoyesis, la inducción de respuestas de fase aguda, la activación de linfocitos T, la estimulación de la secreción de anticuerpos, la defensa del huésped contra la infección, la activación de células de mieloma y de osteoclastos (Choy, E. 2004. *Rheum.Dis.Clin.North Am.* 30:405-415 y Jones SA *et al.* *FASEB J* 15:43-58 (2001)). Para una revisión de los efectos de la IL-6, véase Kishimoto *Arthritis Research & Therapy* 2006 8: Supl. 2/S2. Originalmente, se identificó la IL-6 como un factor de diferenciación de linfocitos B generado por linfocitos T (Hirano T *et al.* *Nature* (1986) 324:73-76), pero posteriormente se ha identificado como un potente factor activador y promotor del crecimiento de muchos tipos de células. Induce la maduración final de los linfocitos B a células productoras de anticuerpos y es un factor accesorio esencial para la activación y proliferación de los linfocitos T. Se ha demostrado en estudios que la IL-6 está implicada en la activación de linfocitos T autorreactivos y la proliferación y diferenciación de linfocitos T citotóxicos. Se ha implicado la IL-6 en la hematopoyesis como un cofactor que provoca la activación y la diferenciación de células madre hematopoyéticas. El efecto de la IL-6 sobre la respuesta de fase aguda también está bien documentado (para una revisión, véase Moshage *J Pathol.* (1997) 181:257-266). La IL-6 induce una variedad de proteínas de fase aguda, incluyendo, el fibrinógeno, la alfa-anti-quimotripsina, la proteína amiloide A sérica y la C-reactiva, a partir de hepatocitos humanos. Las proteínas de fase aguda controlan las respuestas inmunitarias y la inflamación y tienen efectos sobre la remodelación de los tejidos. El nivel sérico de IL-6 se correlaciona bien con el de la proteína C-reactiva en una variedad de patologías, lo que apunta a un papel causal de la IL-6 en la respuesta de fase aguda. También se ha demostrado que la IL-6 se produce por osteoblastos y parece estar implicada en la activación de los osteoclastos y la resorción ósea (Guillen, C. *et al.* 2004. *Calcif.Tissue Int.* 75:153-159, Tamura, T., *et al.* . 1993. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:11924-11928, Udagawa, N *et al.* 1995. *J.Exp.Med.* 182:1461-1468). Paradójicamente, se ha sugerido que la IL-6 no sólo desempeña papeles como citocina proinflamatoria, sino que, en determinadas circunstancias y tipos de células, también puede amortiguar los efectos de otras citocinas proinflamatorias, dando lugar a una disminución de la inflamación.

45 Debido a que la IL-6 tiene una variedad de efectos biológicos, se ha implicado la elevación de la IL-6 como citocina clave en indicaciones de una variedad de enfermedades. Se ha demostrado que los niveles de IL-6 circulante son elevados en enfermedades tales como la artritis reumatoide, la enfermedad de Castleman, la artritis idiopática juvenil y la enfermedad de Crohn (Nishimoto N, y Kishimoto T., *Curr Op in Pharmacology* (2004) 4:386-391). Por este motivo, se ha implicado la IL-6 en el control de la patología de estas indicaciones inflamatorias. Además, se ha demostrado que la IL-6 estimula una variedad de tipos de tumores, incluyendo el melanoma, el carcinoma de células renales, el sarcoma de Kaposi, el carcinoma ovárico, el linfoma y la leucemia, el mieloma múltiple y el carcinoma de próstata (Keller E.T. *et al.* *Front Biosci*;1:340-57 (1996)). Además, se ha informado de niveles circulantes de IL-6 aumentados en varios cánceres. En algunas indicaciones de cáncer, se han usado los niveles de IL-6 elevados como indicadores de diagnóstico de la enfermedad.

Debido al papel de la IL-6 en las enfermedades, se han desarrollado una variedad de anticuerpos monoclonales murinos y quiméricos anti-IL-6 humana como tratamientos potenciales.

55 El documento US 5856135 describe un anticuerpo humano remodelado frente a IL-6, derivado de un anticuerpo monoclonal de ratón "SK2".

60 El documento JP-10-66582 informa de un anticuerpo quimérico frente a IL-6, del que se indica que reconoce la región de hélice D de la IL-6 (sitio 1).

El documento WO 2004/020633 (documento EP 1536012) describe una molécula de anticuerpo scFv humano frente a IL-6 aislado usando tecnología de presentación en fagos. Se informa de que el scFv tiene una afinidad de 13 nM.

65 Se ha usado un anticuerpo murino anti-IL-6, el silimomab (también conocido como B-E8) para tratar pacientes con mieloma múltiple (Bataille *et al.* *Blood* (1995) 86:685-691, Lu *et al.* *Blood* (1995) 68:3123-3131), carcinoma de

células renales (Blay *et al.* Int J. Cancer 1997, 424-430 y artritis reumatoide (Wendling *et al.* J. Rheumatol. (1993). 20:259-262) y en pacientes tratados con estas tres enfermedades se observaron mejoras en determinados marcadores de diagnóstico. También se ha usado el BE-8 para tratar pacientes VIH-positivos con linfoma inmunoblástico o de células grandes polimorfas (Emilie *et al.* Blood 1994, 84:2472-2479) con alivio de síntomas sistémicos (es decir, fiebre, sudores, caquexia) y supresión del crecimiento espontáneo del linfoma en aproximadamente un 50 % de los pacientes.

Sin embargo, la rápida eliminación de este anticuerpo y las posibles reacciones anafilácticas debidas a la producción de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) frente al elsilimomab han limitado su uso en el ámbito clínico (Brochier J *et al.* Int. J. of Immunopharm. 1995, 17:41-48).

En general, el uso clínico de anticuerpos monoclonales murinos es limitado, ya que estos anticuerpos inducen frecuentemente HAMA. Con frecuencia, se producen HAMA dirigidos contra la porción Fc de la inmunoglobulina de ratón, lo que da lugar a una rápida eliminación de Acm anti-IL-6 y una posible reacción anafiláctica (Brochier J *et al.* Int. J. of Immunopharm. 1995, 17:41-48). También se sabe que la farmacocinética de los anticuerpos de ratón en los seres humanos es diferente de la de los anticuerpos humanos, con semividas más cortas y tasas de eliminación aumentadas.

Para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos murinos en los seres humanos, se han construido anticuerpos quiméricos con regiones variables de ratón y regiones constantes humanas. Se ha usado un anticuerpo quimérico humano-de ratón anti-IL-6 cCLB8 (conocido como CNTO 328) para tratar pacientes con mieloma múltiple (van Zaanen *et al.* J. Clin Invest 1996, 98:1441-1448 y van Zaanen *et al.* Brit. Journal. Haematology 1998, 102:783), con estabilización de la enfermedad observada en la mayoría de los pacientes.

Sin embargo, aunque los anticuerpos quiméricos son menos inmunógenos que los Acm murinos, se ha informado de respuestas de anticuerpos humanos anti-anticuerpos quiméricos (HACA) (Bell y Kamm, (2000) Aliment. Pharmacol. Ther. 14, 501-514).

El efecto positivo de la inhibición de la señalización de IL-6 en el cáncer y en enfermedades inflamatorias también se ha resaltado adicionalmente por el uso de un anticuerpo humanizado anti-IL-6Ra Tocilizumab (también conocido como hPM-1, MRA y Actemra). Esta es una versión humanizada del anticuerpo murino anti-IL6Ra PM-1. El tratamiento de pacientes con este anticuerpo se ha demostrado eficaz en una serie de enfermedades, incluyendo la artritis reumatoide, la artritis idiopática juvenil, la enfermedad de Crohn, trastornos mieloproliferativos, la enfermedad de Castleman y el lupus sistémico eritematoso (Mihara *et al.* Expert Opinion on Biological Therapy. 2005 5:683-90).

La invención proporciona un anticuerpo aislado, que se une al complejo IL-6:IL-6Ra formado por la IL-6 y el IL-6Ra, y que no se une ni a IL-6 ni a IL-6Ra solos y que inhibe la unión del complejo IL-6:IL-6Ra a gp130, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH de anticuerpo y un dominio VL de anticuerpo, en el que la molécula de anticuerpo comprende un conjunto de CDR, en el que el dominio VH comprende HCDR1, HCDR2, HCDR3 y una región estructural y el dominio VL comprende LCDR1, LCDR2, LCDR3 y una región estructural, en el que el conjunto de CDR se selecciona del grupo que consiste en:

a. HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3, HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8, LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9 y LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10;

b. HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13, HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14, HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15, LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18, LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19 y LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20;

c. HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23, HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24, HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25, LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 28, LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 29 y LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 30;

d. HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 33, HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 34, HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 35, LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 38, LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 39 y LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 40; y

e. HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 43, HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 44, HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 45, LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 48, LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 49 y LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 50.

Preferentemente, un anticuerpo de la invención comprende:

5 un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7; o

un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12 y un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17; o

10 un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22 y un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 27; o

un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 32 y un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 37; o

15 un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 42 y un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 47.

20 Preferentemente, un anticuerpo de acuerdo con la invención puede inhibir la unión del complejo IL-6:IL-6Ra a gp130 y tiene una CI50 de no más de 700 nM en un ensayo de fluorescencia de resolución temporal homogénea para la inhibición de la unión del complejo IL-6:IL-6Ra a gp130, con una concentración final de 1 nM de complejo y 1 nM de gp130.

25 La invención proporciona además una composición que comprende un anticuerpo aislado de acuerdo con la invención y un excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o de animal por intervención quirúrgica o tratamiento.

30 La invención proporciona un anticuerpo de acuerdo con la invención para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado con la IL-6 en un individuo, en el que el trastorno asociado con la IL-6 se selecciona de entre: una enfermedad inflamatoria y/o autoinmunitaria, un tumor y/o un cáncer, un trastorno linfoproliferativo, rechazo de aloinjerto, caquexia, osteoporosis, traumatismo cerebral, edema cerebral, depresión, insuficiencia cardíaca congestiva o dolor óseo.

35 La invención proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo de acuerdo con la invención.

La invención proporciona una célula huésped transformada *in vitro* con ácido nucleico de acuerdo con la invención.

40 La invención proporciona un método de producción de un anticuerpo que comprende cultivar células huésped de acuerdo con la invención en condiciones para la producción del anticuerpo. Este método de acuerdo con la invención puede comprender además aislar y/o purificar el anticuerpo.

45 Un método de la invención puede comprender además formular el anticuerpo en una composición que comprende al menos un componente adicional.

50 Los anticuerpos aislados de la invención se unen al complejo IL-6:IL-6Ra formado por IL-6 e IL-6Ra y no se unen ni a IL-6 ni a IL-6Ra solos. En el presente documento se describen miembros de unión que se unen al complejo formado por IL-6 y sIL-6Ra (IL-6:sIL-6Ra) y que no se unen ni a IL-6 ni a sIL-6Ra solos. Por tanto, los anticuerpos de la invención no se unen a IL-6 que no está complejada con IL-6Ra, por ejemplo, sIL-6Ra. Los anticuerpos de la invención tampoco se unen al IL-6Ra, por ejemplo, sIL-6Ra, a menos que el IL-6Ra esté complejado con IL-6.

55 Se reconoció que un miembro de unión que podría unirse al complejo formado por IL-6 e IL-6Ra y que no se une ni a IL-6 ni a IL-6Ra solos podría ofrecer ventajas significativas en comparación con miembros de unión que se unen a IL-6 y/o a IL-6Ra fuera del complejo IL-6:IL-6Ra. Como se describe en el ejemplo 1, se inventó un método novedoso para seleccionar miembros de unión para un complejo formado entre un ligando y un receptor (en este caso, IL-6 y IL-6Ra), en el que los miembros de unión no se unen ni al ligando (en este caso, IL-6) ni al receptor (en este caso, IL-6Ra) solos (es decir, cuando el ligando y el receptor no están unidos entre sí). Por tanto, se aislaron por primera vez anticuerpos que se unen específicamente a IL-6:IL-6Ra. Como se describe en otra parte del presente documento, este complejo representa el mecanismo por el que la IL-6 ejerce sus efectos *in vivo*. La unión y la inhibición de este complejo (por ejemplo, la inhibición de la unión del complejo a gp130) es un mecanismo por el que se puede inhibir directamente la actividad biológica de la IL-6 y ofrece la posibilidad de lograr la inhibición de manera más específica que dirigiéndose a la IL-6 o a su receptor solos. Los miembros de unión divulgados en el presente documento tienen numerosas aplicaciones útiles, por ejemplo en los campos del tratamiento terapéutico y el diagnóstico, y ofrecen ventajas nuevas y únicas con respecto a la técnica anterior, dado que todos los anticuerpos conocidos anteriormente se unen a IL-6 o a IL-6Ra fuera del complejo IL-6:IL-6Ra.

- Debido al mecanismo de señalización de IL-6, para que se active la IL-6, tiene que formar un complejo con el IL-6Ra (soluble o unido a la membrana). Los niveles circulantes de IL-6 son significativamente más bajos que los niveles circulantes de sIL-6Ra en la enfermedad (Desgeorges *et al.* J. Rheumatol (1997) 24:1510; Yokota *et al.* Arth & Rheum (2005) 52:818). Como IL-6 se une al IL-6R con afinidad nanomolar, la concentración de complejo IL-6:IL-6R será aproximadamente 10 veces menor que las concentraciones de IL-6 libre e IL-6Ra libre. Por lo tanto, un miembro de unión dirigido al complejo IL-6:IL-6Ra, por ejemplo, dirigido a IL-6:sIL-6Ra, tiene una cantidad mucho más baja de objetivo que neutralizar y, en consecuencia, potencialmente, puede ser necesario menos miembro de unión, es decir, una dosis más baja, para inhibirlo.
- Esto tiene ventajas significativas en cuanto que la cantidad de fármaco que se debe fabricar para cada dosis para los pacientes puede ser más baja. Asimismo, si la dosis de un tratamiento anti-IL-6 es más baja, entonces puede haber ventajas significativas en cuanto que la dosis baja facilita las inyecciones subcutáneas, así como las inyecciones intravenosas (i.v.). Los expertos en la técnica conocen bien que la dosificación subcutánea puede estar limitada por la cantidad de anticuerpo necesaria por dosis. Esto se debe a que las inyecciones subcutáneas están limitadas por el volumen que se puede inyectar en un sitio en la piel. Típicamente, se utilizan volúmenes de inyección subcutánea de 1,2 ml o menos. Como puede ser cada vez más difícil formular un anticuerpo para inyección subcutánea a concentraciones mayores de 50 mg/ml, las dosis superiores a 100 mg por esta vía suelen requerir varias inyecciones y más molestias para el paciente.
- Por lo tanto, una dosis más baja de tratamiento anti-IL-6:IL-6Ra puede tener ventajas significativas con respecto a un tratamiento anti-ligando IL-6 o anti-IL-6Ra que podría requerir dosis mayores.
- Al tener una dosis más baja de tratamiento anti-IL-6:IL-6Ra, también puede ser necesario una dosis "de carga" más baja de miembro de unión para inhibir toda la IL-6 activa complejada con IL-6Ra, en comparación con IL-6 y sIL-6Ra libres sistémicos (no complejados) que están a concentraciones significativamente más altas.
- En la circulación sistémica de los individuos puede haber IL-6Ra soluble e IL-6:sIL-6Ra y, en individuos que tienen un trastorno relacionado con la IL-6, pueden estar presentes a niveles elevados. Se cree que muchos efectos patológicos de la IL-6, es decir, su implicación en las enfermedades, están mediados por el complejo IL-6 soluble:IL-6Ra. Sin embargo, la IL-6 también tiene efectos biológicos beneficiosos *in vivo*, tal como en la mediación de la respuesta del organismo frente a la infección. Determinados efectos beneficiosos de la IL-6 pueden estar mediados a través de la unión a IL-6Ra transmembranario más que a través de sIL-6Ra. Dado que el complejo IL-6:sIL-6Ra se forma en la circulación sistémica, mientras que el complejo IL-6:IL-6Ra transmembranario se forma sobre la superficie de la célula y se internaliza rápidamente en la célula, el IL-6:sIL-6Ra puede estar más disponible que el complejo transmembranario para la unión por miembros de unión de la invención. En consecuencia, los miembros de unión divulgados en el presente documento pueden tener mayor especificidad por inhibir los efectos patológicos de la IL-6 que por los efectos beneficiosos de la IL-6, en comparación con los miembros de unión que se unen a IL-6 o a IL-6Ra fuera del complejo IL-6:IL-6Ra.
- Se puede usar cualquier método adecuado para determinar si un miembro de unión se une a IL-6:IL-6Ra (por ejemplo, IL-6:sIL-6Ra), IL-6 y/o IL-6Ra (por ejemplo, sIL-6Ra). En la técnica se conocen métodos de determinación y cuantificación de miembros de unión y en el presente documento se describen ejemplos con detalle (véase la sección de materiales y métodos). Los métodos descritos en los ejemplos se ejemplifican para su uso con moléculas de anticuerpo, pero se pueden adaptar para su uso con cualquier miembro de unión. Un método adecuado puede comprender cuantificar la unión de un miembro de unión (i) a IL-6 sola (no complejada con IL-6Ra), (ii) a IL-6Ra solo, por ejemplo, sIL-6Ra (no complejado con IL-6), y (iii) a IL-6:IL-6Ra, por ejemplo, IL-6:sIL-6Ra. Como se destaca en otra parte del presente documento, se puede usar hiper IL-6 en ensayos para representar IL-6:IL-6Ra. Por tanto, un miembro de unión divulgado en el presente documento se puede unir a hiper IL-6 y no unirse a IL-6 o a IL-6Ra solos. Como se ejemplifica en el presente documento, un método puede comprender un ELISA para determinar la especificidad de moléculas de anticuerpo. En los ejemplos, se midió el nivel de unión como cuentas de europio; sin embargo, se puede emplear cualquier sistema indicador o marcador detectable adecuado. Además, un método puede comprender cuantificar la unión a (iv) un antígeno de control, en el que el antígeno de control es un antígeno al que no se une el miembro de unión, es decir, un control negativo. Se puede decir que un miembro de unión se une a IL-6 si el nivel de unión a IL-6 es al menos 2,5 veces mayor que el nivel de unión al antígeno de control. Se puede decir que un miembro de unión se une a IL-6R si el nivel de unión a IL-6R es al menos 2,5 veces mayor que el nivel de unión al antígeno de control. Se puede decir que un miembro de unión se une a IL-6:IL-6Ra si el nivel de unión a IL-6:IL-6Ra es al menos 2,5 veces mayor que el nivel de unión al antígeno de control.
- El nivel de unión a (iii) con relación a la unión a (i) y (ii) cuantificado para un miembro de unión indica el grado de especificidad del miembro de unión para el complejo IL-6:IL-6Ra en relación con IL-6 y IL-6Ra solos. Por ejemplo, el nivel de unión a IL-6:IL-6Ra puede ser al menos 2,5 veces mayor que el nivel de unión a IL-6 y IL-6Ra, respectivamente. El nivel de unión puede ser al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 80, 85 o al menos 90 veces mayor.
- Como se describe con más detalle a continuación, se ha demostrado que los miembros de unión divulgados en el presente documento neutralizan el IL-6:IL-6Ra con gran potencia. La neutralización significa la inhibición de una

actividad biológica de IL-6:IL-6Ra (por ejemplo, IL-6:sIL-6Ra). Los miembros de unión divulgados en el presente documento pueden neutralizar una o más actividades de IL-6:IL-6Ra. Típicamente, la actividad biológica inhibida es la unión de IL-6:IL-6Ra (por ejemplo, IL-6:sIL-6Ra) a gp130. De acuerdo con la invención, se inhibe la unión de IL-6:IL-6Ra a gp130.

5 La inhibición de la actividad biológica puede ser parcial o total. Los miembros de unión pueden inhibir la actividad biológica de IL-6:IL-6Ra en un 100 %, o al menos un 95 %, al menos un 90 %, al menos un 85 %, al menos un 80 %, al menos un 75 %, al menos un 70 %, al menos un 60 %, o al menos un 50 % de la actividad en ausencia del miembro de unión.

10 Se puede determinar la potencia neutralizadora de un miembro de unión. Normalmente, la potencia se expresa como un valor de CI_{50} , en nM a menos que se indique lo contrario. En ensayos funcionales, la CI_{50} es la concentración de un miembro de unión que reduce una respuesta biológica en un 50 % de su máximo. En estudios de unión de ligando, la CI_{50} es la concentración que reduce la unión al receptor en un 50 % del nivel de unión específica máxima. Por tanto, en un ensayo que mide la inhibición de la unión del complejo IL-6:IL-6Ra a gp130, la CI_{50} es la concentración que reduce la unión a gp130 en un 50 % del nivel de unión específica máxima. La CI_{50} se puede calcular representando gráficamente el % de respuesta biológica máxima en función del log de la concentración de miembro de unión, y usando un programa informático, tal como Prism (GraphPad) para ajustar una función sigmoideal a los datos para generar valores de CI_{50} . La potencia se puede determinar o medir usando uno o más ensayos conocidos por el experto y/o como se describe o se refiere en el presente documento.

20 La neutralización de la actividad de IL-6:IL-6Ra por un miembro de unión en un ensayo descrito en el presente documento indica que el miembro de unión se une y neutraliza IL-6:IL-6Ra. Otros métodos que se pueden usar para determinar la unión de un miembro de unión a IL-6:IL-6Ra incluyen ELISA, transferencia de bandas western, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad y ensayos bioquímicos.

30 Un miembro de unión divulgado en el presente documento puede inhibir la unión del complejo IL-6:IL-6Ra a gp130. La inhibición de la unión de IL-6:IL-6Ra a gp130 se puede medir en un ensayo, por ejemplo, un ensayo HTRF® (de fluorescencia de resolución temporal homogénea) para la inhibición de la unión de hiper IL-6 marcada con FLAG HIS a Fc de gp130 humano recombinante, como se describe en la sección de materiales y métodos de los ejemplos. Los valores de CI_{50} del ensayo HTRF como se describe en el presente documento son para una concentración final de 1 nM de complejo y 1 nM de gp130. Como se muestra en los ejemplos del presente documento, un miembro de unión puede tener una potencia neutralizadora o CI_{50} de no más de 700 nM en un ensayo HTRF con una concentración final de 1 nM de complejo IL-6:IL-6Ra y una concentración final de 1 nM de gp130, por ejemplo, de no más de 30, 25, 20, 15, 10, 5, 1,5, 1, 0,8 o 0,7 nM (véase, por ejemplo, la tabla 2).

40 Un miembro de unión puede comprender una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una molécula de anticuerpo humano. Normalmente, el miembro de unión comprende un dominio VH y/o VL de anticuerpo. También se proporcionan como parte de la invención dominios VH y VL de miembros de unión. Dentro de cada uno de los dominios VH y VL hay regiones determinantes de la complementariedad ("CDR") y regiones estructurales ("FR"). Un dominio VH comprende un conjunto de HCDR y un dominio VL comprende un conjunto de LCDR. Una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VH de anticuerpo que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 y una región estructural de VH. Una molécula de anticuerpo puede comprender alternativamente o además un dominio VL de anticuerpo que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 y una región estructural de VL. Los ejemplos de dominios VH y VL de anticuerpo y CDR son como se enumera en el listado de secuencias adjunto que forma parte de la presente divulgación.

50 Como se describe en el presente documento, un "conjunto de CDR" comprende CDR1, CDR2 y CDR3. Por tanto, un conjunto de HCDR se refiere a HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y un conjunto de LCDR se refiere a LCDR1, LCDR2 y LCDR3. A menos que se indique lo contrario, un "conjunto de CDR" incluye HCDR y LCDR. Típicamente, los miembros de unión divulgados en el presente documento son anticuerpos monoclonales.

55 Un miembro de unión como se divulga puede comprender un sitio de unión a antígeno dentro de una molécula que no es un anticuerpo, proporcionado normalmente por una o más CDR, por ejemplo, un conjunto de CDR en un esqueleto proteínico que no es un anticuerpo, como se analiza con más detalle a continuación.

60 Como se describe con más detalle en los ejemplos, se aislaron cinco moléculas de anticuerpo, numerados anticuerpos de 1 a 5. Las secuencias de cada uno de los anticuerpos 1 a 5 se proporcionan en el listado de secuencias adjunto, en el que para cada anticuerpo se muestran las siguientes secuencias en orden: secuencia de nucleótidos que codifica el dominio VH; secuencia de aminoácidos del dominio VH; secuencia de aminoácidos de CDR1 de VH, secuencia de aminoácidos de CDR2 de VH; secuencia de aminoácidos de CDR3 de VH; secuencia de nucleótidos que codifica el dominio VL; secuencia de aminoácidos del dominio VL; secuencia de aminoácidos de CDR1 de VL; secuencia de aminoácidos de CDR2 de VL; y secuencia de aminoácidos de CDR3 de VL, respectivamente.

65 Un miembro de unión como el de la divulgación puede comprender una o más CDR como se describe en el presente

documento, por ejemplo, una CDR3, y, opcionalmente, también una CDR1 y una CDR2 para formar un conjunto de CDR. La CDR o conjunto de CDR puede ser una CDR o conjunto de CDR de cualquiera de los anticuerpos 1 a 5, o puede ser una variante de los mismos como se describe en el presente documento.

- 5 La invención divulga miembros de unión que comprenden una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 de cualquiera de los anticuerpos 1 a 5 y/o una LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 de cualquiera de los anticuerpos 1 a 5, por ejemplo, un conjunto de CDR de cualquiera de los anticuerpos 1 a 5.

- 10 El miembro de unión puede comprender un conjunto de CDR de VH de uno de estos anticuerpos. Opcionalmente, también puede comprender un conjunto de CDR de VL de uno de estos anticuerpos, y las CDR de VL pueden ser del mismo anticuerpo o de uno diferente que las CDR de VH.

- 15 Se divulgan un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR de cualquiera de los anticuerpos 1 a 5 y/o un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR de cualquiera de los anticuerpos 1 a 5.

- 20 Típicamente, se empareja un dominio VH con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión a antígeno de anticuerpo, aunque como se analiza con más detalle a continuación, se puede usar un dominio VH o VL solo para unir el antígeno. Se puede emparejar el dominio VH del anticuerpo 1 con el dominio VL del anticuerpo 1, de modo que se forma un sitio de unión a antígeno de anticuerpo que comprende tanto el dominio VH como el VL del anticuerpo 1. Se proporcionan modos de realización análogos para los demás dominios VH y VL divulgados en el presente documento. En otros aspectos, el VH del anticuerpo 1 se empareja con un dominio VL distinto del VL del anticuerpo. La mezcla de cadenas ligeras está bien establecida en la técnica. De nuevo, la invención proporciona modos de realización análogos para los demás dominios VH y VL divulgados en el presente documento.

- 25 Por tanto, el VH de cualquiera de los anticuerpos 1 a 5 se puede emparejar con el VL de cualquiera de los anticuerpos 1 a 5.

- 30 Un miembro de unión puede comprender un conjunto de H y/o L CDR de cualquiera de los anticuerpos 1 a 5 con una o más mutaciones de aminoácidos dentro del conjunto de H y/o L CDR divulgado. La mutación puede ser una sustitución, delección o inserción de aminoácido. Por tanto, por ejemplo, puede haber una o más sustituciones de aminoácidos dentro del conjunto de H y/o L CDR divulgado. Por ejemplo, puede haber hasta 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 mutaciones, por ejemplo, sustituciones, dentro del conjunto de H y/o L CDR. Por ejemplo, puede haber hasta 6, 5, 4, 3 o 2 mutaciones, por ejemplo, sustituciones, en HCDR3 y/o puede haber hasta 6, 5, 4, 3, o 2 mutaciones, por ejemplo, sustituciones, en LCDR3.

- 35 Un miembro de unión puede comprender una molécula de anticuerpo que tiene una o más CDR, por ejemplo, un conjunto de CDR, dentro de una región estructural de un anticuerpo. Por ejemplo, se pueden injertar una o más CDR o un conjunto de CDR de un anticuerpo en una región estructural (por ejemplo, una región estructural humana) para proporcionar una molécula de anticuerpo. Las regiones estructurales pueden ser de secuencias de segmentos génicos de línea germinal humana. Por tanto, la región estructural se puede germinalizar, de manera que se cambian uno o más residuos de la región estructural para que coincidan con los residuos en la posición equivalente de la región estructural germinalizada más similar. Un miembro de unión puede ser una molécula de anticuerpo humano aislado que tiene un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR en una región estructural de línea germinal humana.

- 45 Normalmente, el miembro de unión también tiene un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR, por ejemplo, en una región estructural de línea germinal humana.

- 50 Un dominio VL germinalizado puede estar o no germinalizado en el residuo de Vernier, pero normalmente no lo está.

- El codón ggt en 3' y el residuo de glicina correspondiente, mostrados en las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos de los dominios VL de los anticuerpos 1, 2, 3, 4 y 5, respectivamente, se incluyeron en las secuencias de scFv e IgG expresadas de estos anticuerpos. El residuo de glicina C terminal es el residuo 109 de SEQ ID NO: 7, el residuo 114 de SEQ ID NO: 17, el residuo 112 de SEQ ID NO: 27 y 47 y el residuo 113 de SEQ ID NO: 37.

- 55 Usando la numeración de Kabat, estas posiciones corresponden al residuo de Kabat 108. El origen de este residuo y su triplete codificante ggt se explica a continuación.

- 60 Para expresar la cadena ligera de la IgG, se proporcionó una secuencia de nucleótidos que codificaba la cadena ligera, que comprendía un primer exón que codificaba el dominio VL, un segundo exón que codificaba el dominio CL y un intrón que separaba el primer exón y el segundo exón. En circunstancias normales, el intrón se elimina por ajuste por la maquinaria celular de procesamiento del ARNm, uniendo el extremo 3' del primer exón al extremo 5' del segundo exón. Por tanto, cuando se expresó el ADN que tenía dicha secuencia de nucleótidos como ARN, se juntaron por ajuste el primer y el segundo exón. La traducción del ARN ajustado produce un polipéptido que comprende el dominio VL y el dominio CL. Después del ajuste, la glicina C terminal (correspondiente al residuo de Kabat 108) se codifica por la última base (g) de la secuencia de la región estructural 4 del dominio VL y las dos primeras bases (gt) del dominio CL. Se puede considerar que el residuo de glicina del residuo de Kabat 108 es el

residuo C terminal del dominio VL de la molécula de anticuerpo.

Un miembro de unión puede ser uno que compite por la unión a IL-6:IL-6Ra, por ejemplo, IL-6:sIL-6Ra, con cualquier miembro de unión que (i) se une a IL-6:IL-6Ra, por ejemplo, IL-6:sIL-6Ra y (ii) comprende un miembro de unión, una CDR, por ejemplo, HCDR3, y/o un conjunto de CDR de dominio VH y/o VL divulgadas en el presente documento.

La competición entre los miembros de unión se puede someter a ensayo fácilmente *in vitro*, por ejemplo, usando un ELISA y/o uniendo como marca a un miembro de unión una molécula indicadora específica que se puede detectar en presencia de uno o más miembros de unión no marcados, para permitir la identificación de miembros de unión que se unen al mismo epítipo o a un epítipo superpuesto. Un experto en la técnica conoce fácilmente estos métodos y se describen con más detalle en el presente documento. Por tanto, otro aspecto de la presente divulgación proporciona un miembro de unión que comprende un sitio de unión a antígeno de anticuerpo que compite con una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una molécula de anticuerpo que comprende una CDR, por ejemplo, HCDR3, o un conjunto de CDR de dominio VH y/o VL de cualquiera de los anticuerpos 1 a 5 para la unión a IL-6:IL-6Ra, por ejemplo, IL-6:sIL-6Ra.

En otros aspectos, la invención divulga un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un miembro de unión, un dominio VH y/o un dominio VL de acuerdo con la presente invención y métodos de preparación de un miembro de unión, un dominio VH y/o un dominio VL de la invención, que comprenden expresar dicho ácido nucleico en condiciones para dar lugar a la producción de dicho miembro de unión, dominio VH y/o dominio VL, y recuperarlo.

Otro aspecto de la presente invención divulga un ácido nucleico, en general aislado, que codifica una secuencia CDR de VH o CDR de VL divulgada en el presente documento.

Otro aspecto divulga una célula huésped que contiene o está transformada con un ácido nucleico de la invención.

Otros aspectos de la presente invención divulgan composiciones que contienen miembros de unión de la invención y su uso en métodos de unión, inhibición y/o neutralización de IL-6:IL-6Ra, por ejemplo, el complejo IL-6:sIL-6Ra, incluyendo métodos para tratar el cuerpo humano o de animal mediante tratamiento.

Los miembros de unión de la divulgación son útiles para tratar trastornos asociados con la IL-6, como se describe con detalle en otra parte del presente documento.

Los miembros de unión de acuerdo con la divulgación se pueden usar en un método de tratamiento o diagnóstico, tal como un método de tratamiento (que puede incluir tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno del cuerpo humano o de animal (por ejemplo, en un paciente humano), que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un miembro de unión de la invención. Las afecciones tratables de acuerdo con la presente divulgación incluyen cualquiera en la que la IL-6 desempeñe un papel, como se analiza con detalle en otra parte del presente documento.

Estos y otros aspectos de la invención se describen con más detalles a continuación.

Terminología

Conviene destacar aquí que "y/o" cuando se usa en el presente documento se debe tomar como la divulgación específica de cada uno de los dos componentes o características especificados con o sin el otro. Por ejemplo "A y/o B" se debe tomar como la divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, exactamente igual que si se describiera cada uno individualmente en el presente documento.

IL-6 y receptor de IL-6

IL-6 es interleucina 6.

La secuencia de aminoácidos de longitud completa de la IL-6 humana es SEQ ID NO: 51. Esta secuencia se escinde *in vivo* para eliminar un péptido líder N-terminal y la secuencia madura de la IL-6 es SEQ ID NO: 59. La secuencia madura representa la IL-6 circulante *in vivo*, que es el antígeno objetivo para las aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico *in vivo* como se describe en el presente documento. En consecuencia, normalmente, la IL-6 a la que se hace referencia en el presente documento es la IL-6 humana madura, a menos que el contexto indique lo contrario.

El receptor a de IL-6, IL-6Ra, es el receptor de la interleucina 6. El IL-6Ra también se conoce como IL-6R α , IL-6Ra, IL-6R y CD126. El IL-6Ra existe *in vivo* en forma transmembranaria y en forma soluble. Las referencias al IL-6Ra pueden ser al IL-6Ra transmembranario y/o al IL-6Ra soluble, a menos que el contexto indique lo contrario.

Una secuencia de aminoácidos del IL-6Ra humano soluble (sIL-6R, sIL-6Ra) es SEQ ID NO: 51. Una secuencia de aminoácidos del IL-6Ra humano transmembranario es SEQ ID NO: 57.

La IL-6 se une al IL-6Ra para formar un complejo, IL-6:IL-6Ra. El IL-6:IL-6Ra también se puede denominar en el presente documento "el antígeno". El complejo puede ser soluble (con sIL-6Ra) o estar unido a la membrana (con IL-6Ra). Cuando el IL-6Ra está en la forma soluble, es complejo se denomina IL-6:sIL-6Ra. Las referencias al IL-6:IL-6Ra pueden incluir IL-6 complejada con IL-6Ra transmembranario o soluble, a menos que se indique lo contrario.

Los aspectos de la invención como se describen en el presente documento se detallan en los ejemplos con referencia al sIL-6Ra y el IL-6:sIL-6Ra, y el IL-6:sIL-6Ra es un antígeno objetivo de interés, por ejemplo, para aplicaciones *in vivo*, ya que este complejo se puede unir en la circulación sistémica a miembros de unión de la invención. Sin embargo, los miembros de unión de la invención pueden unirse también o en su lugar al complejo formado por la IL-6 y el IL-6Ra transmembranario, lo que también es un antígeno objetivo de interés para aplicaciones *in vivo*.

La hiper IL-6 es una proteína de fusión en la que la IL-6 está unida covalentemente al sIL-6Ra por medio de un péptido enlazador. La secuencia de la hiper IL-6 como se usa en los ejemplos es SEQ ID NO: 55.

La IL-6, el IL-6Ra (por ejemplo, el sIL-6Ra) y la hiper IL-6 se pueden conjugar con un marcador detectable, tal como HIS FLAG, por ejemplo, para su uso en ensayos como se describe en el presente documento. Por ejemplo, se puede usar una proteína de fusión que comprenda IL-6, IL-6Ra (por ejemplo, sIL-6Ra) o hiper IL-6 conjugados con una secuencia HIS FLAG. Una secuencia de IL-6 humana marcada con HIS FLAG es SEQ ID NO: 52. Una secuencia de sIL-6Ra humano marcado con HIS FLAG es SEQ ID NO: 53. Una secuencia de hiper IL-6 marcada con HIS FLAG es SEQ ID NO: 56.

gp130

gp130 es un receptor del complejo IL-6:IL-6Ra. En Hibi *et al.*, Cell 63:1149-1157 1990 se informa de la clonación y la caracterización de gp130. Una secuencia de gp130 humano es SEQ ID NO: 58.

Miembro de unión

Esto describe un miembro de un par de moléculas que se unen entre sí. Los miembros de un par de unión se pueden obtener de forma natural o producirse total o parcialmente de forma sintética. Un miembro del par de moléculas tiene una zona en su superficie, o una cavidad, que se une a y, por lo tanto, es complementaria a una organización espacial y polar en particular del otro miembro del par de moléculas. Los ejemplos de tipos de pares de unión son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando, enzima-sustrato. La presente invención se refiere a las reacciones de tipo antígeno-anticuerpo.

Normalmente, un miembro de unión comprende una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno. Por ejemplo, un miembro de unión puede ser una molécula de anticuerpo o una proteína que no es un anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno.

Se puede proporcionar un sitio de unión a antígeno por medio del reordenamiento de CDR en esqueletos de proteínas que no son anticuerpos, tales como fibronectina o citocromo B etc. [1, 2, 3], o por aleatorización o mutación de residuos de aminoácido de un bucle del esqueleto de la proteína para conferir especificidad de unión por un objetivo deseado. Los esqueletos para crear sitios de unión novedosos en proteínas se han revisado con detalle por Nygren *et al.* [3]. Se divulgan esqueletos proteínicos para miméticos de anticuerpos en el documento WO /0034784, en el que los inventores describen proteínas (miméticos de anticuerpos) que incluyen un dominio de fibronectina tipo III que tiene al menos un bucle aleatorizado. Un esqueleto adecuado en el que injertar una o más CDR, por ejemplo, un conjunto de HCDR, lo puede proporcionar cualquier miembro de dominio de la superfamilia de genes de inmunoglobulina. El esqueleto puede ser una proteína humana o no humana. Una ventaja de un esqueleto proteínico que no es un anticuerpo es que puede proporcionar un sitio de unión a antígeno en una molécula esqueleto que es más pequeña y/o más fácil de fabricar que al menos algunas moléculas de anticuerpo. El tamaño pequeño de un miembro de unión puede conferir propiedades fisiológicas útiles, tales como una capacidad de entrar en las células, penetrar profundamente en tejidos o alcanzar objetivos dentro de otras estructuras, o unirse dentro de cavidades proteínicas del antígeno objetivo. El uso de sitios de unión a antígeno en esqueletos proteínicos que no son anticuerpos se revisa en Wess, 2004 [4]. Son típicas las proteínas que tienen una estructura estable y uno o más bucles variables, en los que se muta la secuencia de aminoácidos del bucle o bucles de forma específica o aleatoria para crear un sitio de unión a antígeno que se una al antígeno objetivo. Estas proteínas incluyen los dominios de unión a IgG de la proteína A de *S. aureus*, la transferrina, la tetranectina, la fibronectina (por ejemplo, el 10^o dominio de fibronectina de tipo III), las lipocalinas y la gamma-cristalina y otros esqueletos Affilin™ (Scil Proteins). Los ejemplos de otros enfoques incluyen "microcuerpos" sintéticos a base de ciclótidos (proteínas pequeñas que tienen enlaces disulfuro intramoleculares), microproteínas (Versabodies™, Amunix) y proteínas con repeticiones de anquirina (DARPs, Molecular Partners).

Además de las secuencias de anticuerpo y/o un sitio de unión a antígeno, un miembro de unión puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, que formen un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o para impartir a

la molécula otra característica funcional además de la capacidad de unir antígenos. Los miembros de unión de la invención pueden llevar un marcador detectable o pueden estar conjugados con una toxina o un resto marcador o enzima (por ejemplo, por medio de un enlazador o un enlace peptídico). Por ejemplo, un miembro de unión puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio enzimático), así como un sitio de unión a antígeno, en el que el sitio de unión a antígeno se une al antígeno y dirige así el sitio catalítico al antígeno. El sitio catalítico puede inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo, por escisión.

No obstante, como se indica, las CDR las pueden llevar esqueletos que no son anticuerpos, por lo general, la estructura portadora de una CDR o un conjunto de CDR de la invención será una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o una parte sustancial de la misma en la que se sitúa la CDR o el conjunto de CDR en una posición que corresponde a la CDR o conjunto de CDR de dominios variables de anticuerpo VH y VL naturales codificados por genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y posiciones de los dominios variables de inmunoglobulina se pueden determinar por referencia a Kabat, *et al.*, 1987 [5] y actualizaciones del mismo. En esta base de datos existen una serie de recursos académicos y comerciales en línea disponibles para su consulta. Por ejemplo, véase la ref. [6] y el recurso en línea asociado, actualmente en la dirección de Internet <http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>.

Con región CDR o CDR, se pretende indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina como se define por Kabat *et al.* 1991 [7] y ediciones posteriores. Típicamente, un anticuerpo contiene 3 CDR de cadena pesada y 3 CDR de cadena ligera. El término CDR se usa aquí con el fin de indicar, según el caso, una de estas regiones o varias, o incluso la totalidad, de estas regiones que contienen la mayoría de los residuos de aminoácido responsables de la unión por afinidad del anticuerpo por el antígeno o el epítipo que reconoce.

Entre las seis secuencias de CDR cortas, las tercera CDR de la cadena pesada (HCDR3) tiene una mayor variabilidad de tamaño (mayor diversidad, debida esencialmente a los mecanismos de reordenamiento de los genes que dan lugar a ella). Puede ser de tan solo 2 aminoácidos, aunque el tamaño más largo conocido es de 26. La longitud de la CDR puede variar también de acuerdo con la longitud que pueda alojar la región estructural subyacente en particular. Funcionalmente, la HCDR3 desempeña un papel en parte en la determinación de la especificidad del anticuerpo [refs. 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15].

Molécula de anticuerpo

Esto describe una inmunoglobulina bien natural o parcial o totalmente producida de forma sintética. El término también cubre cualquier polipéptido o proteína que comprenda un sitio de unión a antígeno de anticuerpo. Se debe entender aquí que la invención no se refiere a los anticuerpos en forma natural, es decir, no están en su entorno natural, sino que se han podido aislar u obtener por purificación a partir de fuentes naturales, o se han obtenido por recombinación genética, o por síntesis química, y que pueden contener aminoácidos no naturales como se describirá más adelante. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión a antígeno de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, moléculas tales como Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb y Fd. Se han creado diversas otras moléculas de anticuerpo que incluyen uno o más sitios de unión a antígeno de anticuerpo, incluyendo, por ejemplo, Fab₂, Fab₃, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y minicuerpos. En [16] se describen moléculas de anticuerpo y métodos para su construcción y uso.

Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que se unen al antígeno objetivo. Estas técnicas pueden implicar introducir ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina, o las CDR, de un anticuerpo en las regiones constantes, o regiones constantes más regiones estructurales, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400, y un gran volumen de literatura posterior. Se puede someter un hibridoma u otra célula que produzca un anticuerpo a mutación genética u otros cambios, que pueden o no modificar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

Como los anticuerpos se pueden modificar de una serie de maneras, se debería considerar que el término "molécula de anticuerpo" cubre cualquier miembro de unión o sustancia que tenga un sitio de unión a antígeno de anticuerpo con la especificidad y/o unión al antígeno necesarias. Por tanto, este término cubre fragmentos de anticuerpo y derivados, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un sitio de unión a antígeno de anticuerpo, sea natural o total o parcialmente sintético. Por lo tanto, se incluyen las moléculas quiméricas que comprenden un sitio de unión a antígeno de anticuerpo, o equivalente, fusionado a otro polipéptido (por ejemplo, derivado de otra especie o perteneciente a otra clase o subclase de anticuerpo). La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EP-A-0120694 y EP-A-0125023 y en un gran volumen de literatura posterior.

Otras técnicas disponibles en la técnica de la creación de anticuerpos han permitido aislar anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, se pueden preparar hibridomas humanos como se describe por Kontermann y Dubel [17]. La presentación en fagos, otra técnica establecida para generar miembros de unión, se ha descrito con detalle en muchas publicaciones, tales como Kontermann y Dubel [17] y en el documento WO 92/0104 (analizado con detalle a continuación) y en las patentes de EE. UU. US 5969108, US 5565332, US 5733743, US 5858657, US

5871907, US 5872215, US 5885793, US 5962255, US 6140471, US 6172197, US 6225447, US 6291650, US 6492160, US 6521404.

5 Para aislar anticuerpos humanos se pueden usar ratones transgénicos en los que se inactivan los genes de anticuerpo de ratón y se reemplazan funcionalmente con genes de anticuerpo humanos dejando intactos al mismo tiempo otros componentes del sistema inmunitario del ratón [18]. Se pueden producir anticuerpos humanos usando técnicas conocidas en la técnica como las divulgadas, por ejemplo, en los documentos WO 91/09967, US 5585089, EP 592106, US 565332 y WO 93/17105. WO 93/17105. Además, el documento WO 2004/006955 describe métodos para humanizar anticuerpos, basados en seleccionar secuencias de región estructural de región variable de genes de anticuerpo humanos por comparación de tipos de estructuras de CDR canónicas para secuencias CDR de la región variable de un anticuerpo no humano con tipos de estructuras de CDR canónicas para CDR correspondientes de una colección de secuencias de anticuerpos humanos, por ejemplo, segmentos de genes de anticuerpos de línea germinal. Las regiones variables de anticuerpos humanos que tienen tipos de estructuras de CDR canónicas similares a las de CDR no humanas forman un subconjunto de miembros de secuencias de anticuerpos humanos del que seleccionar secuencias de región estructural humanas. Los miembros del subconjunto se pueden clasificar además por similitud de aminoácidos entre las secuencias de CDR humanas y no humanas. En el método del documento WO 2004/006955, se seleccionan las secuencias humanas mejor clasificadas para proporcionar las secuencias de región estructural para construir un anticuerpo quimérico que reemplace funcionalmente las secuencias de CDR humanas con las equivalentes de CDR no humanas usando las regiones estructurales humanas de los miembros del subconjunto seleccionados, proporcionando de este modo un anticuerpo humanizado de alta afinidad y baja inmunogenicidad sin necesidad de comparar las secuencias de región estructural entre anticuerpos humanos y no humanos. También se divulgan anticuerpos quiméricos preparados de acuerdo con el método.

25 Se pueden crear moléculas de anticuerpo sintéticas por expresión de genes generados por medio de oligonucleótidos sintetizados y ensamblados en vectores de expresión adecuados, por ejemplo, como se describe por Knappik *et al.* [19] o Krebs *et al.* [20].

30 Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de unir antígenos. Son ejemplos de fragmentos de unión (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un anticuerpo individual; (iv) el fragmento dAb [21, 22, 23], que consiste en un dominio VH o uno VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados (vii) moléculas Fv monocatenarias (scFv), en las que un dominio VH y uno VL están enlazados por un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno [24, 25]; (viii) dímeros biespecíficos de Fv monocatenarios (en el documento PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multispecíficos construidos por fusión génica (en el documento WO 94/13804 [26]). Las moléculas de Fv, scFv o diacuerpos se pueden estabilizar por la incorporación de puentes disulfuro que enlazan los dominios VH y VL [27]. También se pueden preparar minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 [28]. Otros ejemplos de fragmentos de unión son Fab', que difiere de los fragmentos Fab por la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxilo del de cadena pesada CH1, incluyendo una o más cisteínas de la región de bisagra del anticuerpo, y Fab'-SH, que es un fragmento Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre.

45 Qui *et al.* [29] describieron moléculas de anticuerpo que contenían sólo dos CDR enlazadas por una región estructural. La CDR3 del dominio VH o VL estaba enlazada al bucle CDR1 o CDR2 del otro dominio. El enlace era a través del extremo C terminal de las CDR1 o CDR2 seleccionadas al extremo N terminal de la CDR3, por medio de una región FR. Qui *et al.* seleccionaron la región FR con menos parches hidrófobos. Se descubrió que la mejor combinación para los anticuerpos sometidos a prueba era la CDR1 de VL enlazada por la FR2 de VH a la CDR3 de VH (VHCDR1-VHFR2-VLCDR3). A un peso molecular de aproximadamente 3 kDa, estas moléculas de anticuerpo ofrecen ventajas en términos de mejor penetración en el tejido en comparación con inmunoglobulinas completas (aprox. 150 kDa) o scFv (aprox. 28 kDa).

55 Se pueden obtener fragmentos de anticuerpo de la invención partiendo de cualquiera de las moléculas de anticuerpo 1 a 5, por métodos tales como digestión con enzimas, por ejemplo, pepsina o papaína, y/o por escisión de los puentes disulfuro por reducción química.

60 De otro modo, los fragmentos de anticuerpo comprendidos en la presente invención se pueden obtener por técnicas de recombinación genética bien conocidas también por el experto en la técnica o, si no, por síntesis peptídica, por ejemplo, por medio de sintetizadores peptídicos automáticos, tales como los suministrados por la empresa Applied Biosystems, etc., o por síntesis y expresión de ácidos nucleicos.

Los fragmentos de anticuerpo funcionales de acuerdo con la presente divulgación incluyen cualquier fragmento funcional cuya semivida esté aumentada por una modificación química, especialmente por PEGilación, o por incorporación en un liposoma.

65 Un dAc (anticuerpo de dominio) es un fragmento de unión a antígeno monomérico pequeño de un anticuerpo, a

saber, la región variable de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo [23]. Los dAc de VH se producen de forma natural en camélidos (por ejemplo, camello, llama) y se pueden producir inmunizando un camélido con un antígeno objetivo, aislando linfocitos B específicos de antígeno y clonando directamente los genes de dAc a partir de linfocitos B individuales. Los dAc también se pueden reproducir en cultivo celular. Su pequeño tamaño, buena solubilidad y estabilidad térmica los hace particularmente útiles en el ámbito fisiológico y adecuados para la selección y la maduración de la afinidad.

Se están desarrollando dAc de VH de camélidos para uso terapéutico con el nombre "nanocuerpos[™]". Un miembro de unión de la presente divulgación puede ser un dAc que comprende un dominio VH o VL sustancialmente como se describe en el presente documento, o un dominio VH o VL que comprende un conjunto de CDR sustancialmente como se describe en el presente documento.

Los anticuerpos biespecíficos o bifuncionales forman una segunda generación de anticuerpos monoclonales en la que se combinan dos regiones variables diferentes en la misma molécula [30]. Se ha demostrado su uso tanto en el campo del diagnóstico como en el campo del tratamiento por su capacidad para reclutar nuevas funciones efectoras o para dirigirse a varias moléculas sobre la superficie de células tumorales. Cuando se quieren usar anticuerpos biespecíficos, pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que se pueden fabricar de una variedad de maneras [31], por ejemplo, preparados químicamente o a partir de hibridomas híbridos, pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpo biespecíficos mencionados anteriormente. Estos anticuerpos se pueden obtener por métodos químicos [32, 33] o métodos somáticos [34, 35], pero también y de forma preferente, por técnicas de ingeniería genética que permiten forzar la heterodimerización y facilitar así el proceso de purificación del anticuerpo deseado [36]. Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen los de la tecnología BiTE[™], en los que se pueden usar los dominios de unión de dos anticuerpos con diferente especificidad y enlazarlos directamente por medio de péptidos flexibles cortos. Esto combina dos anticuerpos en una sola cadena polipeptídica corta. Se pueden construir diacuerpos y scFv sin una región Fc, usando sólo dominios variables, reduciendo potencialmente los efectos de la reacción antiidiotípica.

Los anticuerpos biespecíficos se pueden construir como IgG enteras, como Fab'2 biespecíficos, como Fab'PEG, como diacuerpos o, si no, como scFv biespecíficos. Además, se pueden enlazar dos anticuerpos biespecíficos usando métodos de rutina conocidos en la técnica para formar anticuerpos tetravalentes.

Los anticuerpos biespecíficos, en contraposición con los anticuerpos completos biespecíficos, también pueden ser particularmente útiles porque se pueden construir fácilmente y expresarse en *E.coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos, tales como fragmentos de anticuerpo) de especificidades de unión apropiadas se pueden seleccionar fácilmente usando presentación en fagos (en el documento WO 94/13804) de colecciones. Si se debe mantener constante un brazo del diacuerpo, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra IL-6:IL-6Ra, entonces se puede preparar una colección donde se varíe el otro brazo y seleccionar un anticuerpo de especificidad apropiada. Se pueden preparar anticuerpos completos biespecíficos por métodos de creación alternativos como los descritos en Ridgeway *et al.*, 1996 [37].

En la técnica están disponible diversos métodos para obtener anticuerpos contra IL-6:IL-6Ra.

Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, especialmente de origen humano, murino, quimérico o humanizado, que se pueden obtener de acuerdo con los métodos estándar bien conocidos por el experto en la técnica.

En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, especialmente de origen murino, es posible referirse a técnicas que se describen en particular en el manual "Antibodies" [38] o a la técnica de preparación a partir de hibridomas descrita por Köhler y Milstein [39].

Se pueden obtener anticuerpos monoclonales, por ejemplo, a partir de una célula animal inmunizada contra IL-6:IL-6Ra, por ejemplo, usando hiper IL-6, o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales. En el presente documento se describen fragmentos adecuados y péptidos o polipéptidos que los comprenden, y se pueden usar para inmunizar animales para generar anticuerpos contra IL-6:IL-6Ra, por ejemplo, IL-6:sIL-6Ra. Dicho IL-6:sIL-6Ra, o uno de sus fragmentos, se puede producir especialmente de acuerdo con los métodos de trabajo habituales, por recombinación genética partiendo de una secuencia de ácido nucleico contenida en una secuencia de ADN que codifica la hiper IL-6 o un fragmento de la misma, por síntesis peptídica partiendo de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia peptídica del IL-6:sIL-6Ra y/o un fragmento de la misma.

Los anticuerpos monoclonales se pueden purificar, por ejemplo, en una columna de afinidad en la que se ha inmovilizado previamente IL-6:sIL-6Ra, o hiper IL-6, o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales. Más en particular, los anticuerpos monoclonales se pueden purificar por cromatografía sobre proteína A y/o G, seguida o no seguida de cromatografía de intercambio iónico con el objetivo de eliminar los contaminantes proteínicos residuales, así como el ADN y los LPS, en sí mismos, seguida o no seguida de cromatografía de exclusión en gel de sefrosa con el fin de eliminar los posibles agregados debidos a la

presencia de dímeros u otros multímeros. En un modo de realización, se pueden usar la totalidad de estas técnicas simultánea o sucesivamente.

Sitio de unión a antígeno

5 Esto describe la parte de una molécula que se une a y es complementaria a la totalidad o a parte del antígeno objetivo. En una molécula de anticuerpo, se denomina sitio de unión a antígeno del anticuerpo y comprende la parte del anticuerpo que se une a y es complementaria a la totalidad o a parte del antígeno objetivo. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo puede unirse sólo a una parte en particular del antígeno, parte que se llama epítipo. Un sitio de unión a antígeno de anticuerpo se puede proporcionar por uno o más dominios variables de anticuerpo. Un sitio de unión a antígeno de anticuerpo puede comprender una región variable de cadena ligera (VL) de anticuerpo y una región variable de cadena pesada (VH) de anticuerpo.

Aislado/a(s)

15 Esto se refiere al estado en el que estarán por lo general los miembros de unión de la invención, o los ácidos nucleicos que codifican tales miembros de unión, de acuerdo con la presente invención. Por tanto, los miembros de unión, dominios VH y/o VL y vectores y moléculas de ácido nucleico codificantes de acuerdo con la presente divulgación se pueden proporcionar aislados y/o purificados, por ejemplo, a partir de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u homogénea o, en el caso del ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o genes de origen distinto de la secuencia que codifica un polipéptido con la función necesaria. Los miembros aislados y el ácido nucleico aislado estarán libres o sustancialmente libres de material con el que se asocian de forma natural, tales como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural o el entorno en el que se preparan (por ejemplo, cultivo celular) cuando dicha preparación es por tecnología de ADN recombinante practicada *in vitro* o *in vivo*. Los miembros y el ácido nucleico se pueden formular con diluyentes o coadyuvantes y, aun así, aislarse con fines prácticos (por ejemplo, normalmente, los miembros estarán mezclados con gelatina u otros vehículos si se usan para recubrir placas de microvaloración para su uso en inmunoensayos, o estarán mezclados con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se usen en diagnóstico o tratamientos). Los miembros de unión pueden estar glucosilados, bien de manera natural o por sistemas heterólogos de células eucariotas (por ejemplo, células CHO o NSO (ECACC 85110503), o pueden estar no glucosilados (por ejemplo, si se producen por la expresión en una célula procariota).

Las preparaciones heterogéneas que comprenden moléculas de anticuerpo anti-IL-6:IL-6Ra (por ejemplo, anti-IL-6:sIL-6Ra) también forman parte de la invención. Por ejemplo, las preparaciones de este tipo pueden ser mezclas de anticuerpos con cadenas pesadas de longitud completa y cadenas pesadas que carecen de la lisina C-terminal, con diversos grados de glucosilación y/o con aminoácidos derivatizados, tal como la ciclación de un ácido glutámico N-terminal para formar un residuo de ácido piroglutámico.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente como se describe" se refiere a que la(s) característica(s) de las CDR pertinentes del dominio VH o VL de los miembros de unión descritos en el presente documento serán idénticas o muy similares a las regiones especificadas cuya secuencia se describe en el presente documento. Tal como se describe en el presente documento, la expresión "muy similar(es)" con respecto a la(s) región/regiones especificadas de uno o más dominios variables, se contempla que se pueden realizar desde 1 hasta aproximadamente 5, por ejemplo, desde 1 hasta 4, incluyendo de 1 a 3, o 1 o 2, o 3 o 4, sustituciones de aminoácidos en la CDR y/o el dominio VH o VL.

Descripción detallada de la invención

50 Como se destaca anteriormente, un miembro de unión de acuerdo con la presente divulgación modula y puede neutralizar una actividad biológica de la IL-6 y/o el IL-6Ra, por ejemplo, el sIL-6Ra. Un miembro de unión de la presente divulgación se puede someter a una optimización de potencia, para mejorar más su potencia neutralizadora. En general, la optimización de la potencia implica mutar la secuencia de un miembro de unión seleccionado (normalmente la secuencia del dominio variable de un anticuerpo) para generar una colección de miembros de unión, que después se someten a ensayo para determinar la potencia y se seleccionan los miembros de unión más potentes. Por tanto, los miembros de unión de "potencia optimizada" seleccionados tienden a tener una potencia mayor que el miembro de unión a partir del cual se generó la colección.

60 No obstante, se pueden obtener miembros de unión de alta potencia sin optimización. Como se demuestra en el presente documento, se pueden obtener miembros de unión de potencia alta directamente a partir de un cribado inicial, por ejemplo, un ensayo de neutralización bioquímica.

Un miembro de unión de "potencia optimizada" se refiere a un miembro de unión con una potencia de neutralización optimizada de una actividad o función posterior en particular de IL-6 y/o IL-6Ra, por ejemplo, sIL-6Ra. En otra parte del presente documento se describen con más detalle ensayos y potencias.

65 Los miembros de unión de potencia optimizada y no optimizada son aspectos de la invención, así como todos los

métodos para la optimización de la potencia de un miembro de unión seleccionado. La presente invención permite, por tanto, que el experto en la técnica genere miembros de unión con potencia alta.

5 Tal como se describe en el presente documento, el anticuerpo 1 tenía una potencia neutralizadora (CI50) de menos de 700 nM en un ensayo HTRF® (fluorescencia de resolución temporal homogénea) para la inhibición de la unión de hiper IL-6 marcada con FLAG HIS a Fc de gp130 humano recombinante. Por tanto, un miembro de unión que comprende el conjunto de CDR del anticuerpo 1 puede presentar una CI50 de menos de 700 nM en este ensayo. La variantes del anticuerpo 1, con una o más sustituciones, deleciones o inserciones en el conjunto de CDR del anticuerpo 1, pueden ser de la misma potencia o más potentes que el anticuerpo 1.

10 Tal como se describe en el presente documento, el anticuerpo 2 tenía una potencia neutralizadora (CI50) de menos de 1,5 nM en un ensayo HTRF® (fluorescencia de resolución temporal homogénea) para la inhibición de la unión de hiper IL-6 marcada con FLAG HIS a Fc de gp130 humano recombinante. Por tanto, un miembro de unión que comprende el conjunto de CDR del anticuerpo 2 puede presentar una CI50 de menos de 1,5 nM en este ensayo. La variantes del anticuerpo 2, con una o más sustituciones, deleciones o inserciones en el conjunto de CDR del anticuerpo 2, pueden ser de la misma potencia o más potentes que el anticuerpo 2.

20 Tal como se describe en el presente documento, el anticuerpo 3 tenía una potencia neutralizadora (CI50) de menos de 25 nM en un ensayo HTRF® (fluorescencia de resolución temporal homogénea) para la inhibición de la unión de hiper IL-6 marcada con FLAG HIS a Fc de gp130 humano recombinante. Por tanto, un miembro de unión que comprende el conjunto de CDR del anticuerpo 3 puede presentar una CI50 de menos de 25 nM en este ensayo. La variantes del anticuerpo 3, con una o más sustituciones, deleciones o inserciones en el conjunto de CDR del anticuerpo 3, pueden ser de la misma potencia o más potentes que el anticuerpo 3.

25 Tal como se describe en el presente documento, el anticuerpo 4 tenía una potencia neutralizadora (CI50) de menos de 30 nM en un ensayo HTRF® (fluorescencia de resolución temporal homogénea) para la inhibición de la unión de hiper IL-6 marcada con FLAG HIS a Fc de gp130 humano recombinante. Por tanto, un miembro de unión que comprende el conjunto de CDR del anticuerpo 4 puede presentar una CI50 de menos de 30 nM en este ensayo. La variantes del anticuerpo 4, con una o más sustituciones, deleciones o inserciones en el conjunto de CDR del anticuerpo 4, pueden ser de la misma potencia o más potentes que el anticuerpo 4.

35 Tal como se describe en el presente documento, el anticuerpo 5 tenía una potencia neutralizadora (CI50) de menos de 0,8 nM en un ensayo HTRF® (fluorescencia de resolución temporal homogénea) para la inhibición de la unión de hiper IL-6 marcada con FLAG HIS a Fc de gp130 humano recombinante. Por tanto, un miembro de unión que comprende el conjunto de CDR del anticuerpo 5 puede presentar una CI50 de menos de 0,8 nM en este ensayo. La variantes del anticuerpo 5, con una o más sustituciones, deleciones o inserciones en el conjunto de CDR del anticuerpo 5, pueden ser de la misma potencia o más potentes que el anticuerpo 5.

40 En otro aspecto, la presente invención divulga un método de obtención de uno o más miembros de unión que se pueden unir al antígeno, incluyendo el método poner en contacto una colección de miembros de unión de acuerdo con la divulgación y dicho antígeno, y seleccionar uno o más miembros de unión de la colección que se pueden unir a dicho antígeno.

45 La colección se puede presentar en partículas o complejos moleculares, por ejemplo, paquetes genéticos replicables, tales como partículas de levadura, bacterianas o de bacteriófagos (por ejemplo, T7), virus, células o sistemas de presentación covalentes, ribosómicos u otros *in vitro*, conteniendo cada partícula o complejo molecular ácido nucleico que codifica el dominio variable VH de anticuerpo presentado en ellos y, opcionalmente, también un dominio VL presentado si está presente. La presentación en fagos se describe en el documento WO 92/01047 y, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. US 5969108, US 5565332, US 5733743, US 5858657, US 5871907, US 5872215, US 5885793, US 5962255, US 6140471, US 6172197, US 6225447, US 6291650, US 6492160 y US 6521404.

50 Después de la selección de miembros de unión que se pueden unir al antígeno y presentarlos en bacteriófagos o partículas o complejos moleculares de otra colección, se puede tomar el ácido nucleico de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que presenta uno de dichos miembros de unión seleccionados. Este ácido nucleico se puede usar en la producción posterior de un miembro de unión o un dominio variable VH o VL de anticuerpo por expresión a partir del ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico tomada de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que presenta uno de dichos miembros de unión seleccionados.

60 Un dominio variable VH de anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de un dominio variable VH de anticuerpo de uno de dichos miembros de unión seleccionados se puede proporcionar en forma aislada, como un miembro de unión que comprende un dominio VH de este tipo.

65 Otros aspectos de la divulgación se refiere en general al aislamiento o selección de un miembro de unión de entre una pluralidad de miembros de unión, en los que el miembro de unión seleccionado o aislado se une a un complejo formado por una primera entidad y una segunda entidad y no se une a la primera entidad o a la segunda entidad

solas.

La pluralidad de miembros de unión puede ser una colección de miembros de unión, como se describe anteriormente. En otra parte del presente documento se definen y describen con más detalle los miembros de unión.

5 Convenientemente, como es común en las colecciones, cada miembro de unión de la pluralidad de miembros de unión puede estar asociado con información genética que lo codifica, lo que permite la recuperación de la información genética cuando se selecciona un miembro de unión.

10 En un aspecto, la divulgación es un método de selección de un miembro de unión de entre una pluralidad de miembros de unión, en el que el miembro de unión se une a un complejo formado por una primera entidad y una segunda entidad y no se une a la primera entidad o a la segunda entidad solas.

en el que el método comprende:

15 (i) exponer la pluralidad de miembros de unión a la primera entidad, en condiciones que permitan la unión de los miembros de unión a la primera entidad;

(ii) exponer la pluralidad de miembros de unión al complejo formado por la primera entidad y la segunda entidad, en condiciones que permitan la unión de los miembros de unión al complejo;

20 (iii) aislar el complejo sobre un soporte sólido al que está unida la segunda entidad; y

(iv) recuperar uno o más miembros de unión unidos al complejo.

25 Por tanto, el método puede seleccionar, de entre una pluralidad de miembros de unión, una población de miembros de unión que se unen al complejo.

Opcionalmente, el método puede comprender además amplificar los uno o más miembros de unión recuperados para producir una pluralidad de miembros de unión, por ejemplo:

30 (v) amplificando la información genética que codifica los uno o más miembros de unión recuperados; y

(vi) expresando la información genética para producir una pluralidad de miembros de unión.

35 El método puede comprender repetir las etapas (i) a (iv) anteriores, para ciclos de selección posteriores. Por tanto, en ciclos de selección posteriores se puede seleccionar adicionalmente de entre una población de miembros de unión que se unen al complejo y se puede seleccionar negativamente contra miembros de unión inespecíficos o miembros de unión que se unen a la primera o la segunda entidad sola.

40 De forma ventajosa, en ciclos de selección posteriores se puede alternar la orientación en la que se une el complejo al soporte (es decir, si está unido por medio de la primera entidad o por medio de la segunda entidad). Por tanto, opcionalmente, el método puede comprender además:

45 (vii) exponer la pluralidad de miembros de unión a la segunda entidad, en condiciones que permitan la unión de los miembros de unión a la segunda entidad;

(viii) exponer la pluralidad de miembros de unión al complejo formado por la primera entidad y la segunda entidad, en condiciones que permitan la unión de los miembros de unión al complejo;

50 (ix) aislar el complejo sobre un soporte sólido al que está unida la primera entidad; y

(x) recuperar uno o más miembros de unión unidos al complejo.

55 Después, se pueden repetir las etapas (i)-(vi) anteriores y se pueden realizar múltiples ciclos de selección, en los que se alterna la entidad unida al soporte. Por tanto, el método puede comprender un primer ciclo de selección en el que la primera entidad está unida al soporte, y un segundo ciclo de selección en el que la segunda entidad está unida al soporte, después un tercer ciclo de selección en el que la primera entidad está unida al soporte, y así sucesivamente en ciclos posteriores hasta completar el número de ciclos de selección deseados, alternando así la orientación en la que se aísla el complejo sobre el soporte. Esta alternancia de la orientación de unión del complejo al soporte contribuye a la selección específica de miembros de unión que se unen al complejo y no se unen a la primera o a la segunda entidad solas. La alternancia puede ayudar en particular en la selección contra miembros de unión que se unen a la primera o a la segunda entidad solas.

65 El soporte al que se une la entidad puede ser, por ejemplo, una perla. Convenientemente, se pueden usar perlas paramagnéticas, que se pueden recuperar fácilmente de la solución.

La entidad unida al soporte puede estar unida directa o indirectamente. Por ejemplo, el soporte puede comprender o estar recubierto con un miembro de unión que se une a la entidad. De forma alternativa, la entidad puede estar marcada, es decir, unida covalentemente a una marca tal como un péptido, para la unión del soporte, en el que el soporte comprende o está recubierto con un miembro de unión que se une a la marca. Por ejemplo, un polipéptido

5 puede estar enlazado a una marca peptídica heteróloga, por ejemplo una marca FLAG, y puede estar unido a un soporte sólido por medio de una molécula de anticuerpo u otro miembro de unión que se une a la marca, por ejemplo, un anticuerpo anti-FLAG. Convenientemente, se puede recubrir el miembro de unión que se une a la marca sobre el soporte por medio de un complejo de estreptavidina:biotina, por ejemplo, se puede unir un miembro de unión biotinilado a un soporte recubierto con estreptavidina, por ejemplo, perlas recubiertas con estreptavidina.

10 Convenientemente, en cada ciclo de selección, una entidad puede estar enlazada a una marca para la unión al soporte, mientras que la otra entidad no está enlazada a la marca (la otra entidad puede estar no marcada o puede estar enlazada a una marca diferente). Por tanto, en un primer ciclo de selección, la segunda entidad puede estar enlazada a una marca para la unión al soporte, mientras que la primera entidad no está enlazada a la marca, y en el

15 segundo ciclo de selección la primera entidad puede estar enlazada a la marca mientras que la segunda entidad no lo está. El uso de la misma marca para la unión de la primera y la segunda entidad al soporte en ciclos de selección alternos permite convenientemente usar el mismo tipo de soporte en todos los ciclos.

20 Normalmente, la primera y/o la segunda entidad y el complejo se proporcionan en solución. Sin embargo, en algunos casos, la primera y/o la segunda entidad puede estar sobre una superficie, por ejemplo, presentada sobre una superficie celular, de modo que el complejo se forma sobre la superficie, entonces el método puede comprender exponer la pluralidad de miembros de unión en solución a células que expresan la primera y/o la segunda entidad sobre la superficie celular. Los métodos que usan células son adecuados, por ejemplo, cuando una o ambas de las entidades primera y segunda son proteínas transmembranarias o proteínas asociadas a la membrana. Sin embargo,

25 una alternativa es el uso de porciones solubles de estas proteínas, por ejemplo, se puede usar un dominio extracelular o porción de un dominio extracelular en el método, lo que permite proporcionar el polipéptido en solución.

30 Se puede formar el complejo exponiendo la primera entidad a la segunda entidad, de tal forma que la primera y la segunda entidad se asocian para formar un complejo. En cada ciclo de selección, normalmente, se proporciona la entidad que no se tiene que unir al soporte a una concentración en exceso de la entidad que se tiene que unir al soporte, por ejemplo, un exceso molar de al menos el doble. Esto garantiza que toda la entidad que se va a unir al soporte está presente en forma complejada, lo que reduce al mínimo la cantidad de entidad no complejada que se recupera del soporte y, de este modo, se reduce al mínimo la recuperación no deseada de miembro de unión que se

35 une a la entidad en forma no complejada. Una alternativa es exponer los miembros de unión a un complejo preformado, por ejemplo, un complejo en el que la primera y la segunda entidad están unidas covalentemente entre sí. Por ejemplo, cuando las entidades primera y segunda son polipéptidos, se puede usar una proteína de fusión que comprende la primera entidad y la segunda entidad, por ejemplo, en la que la primera y la segunda entidad están enlazadas por medio de una marca peptídica. Sin embargo, formar el complejo mediante la exposición de la primera entidad a la segunda entidad tiene ventajas, ya que esto representa la situación *in vivo* y evita anomalías en la conformación o la formación de epítopos provocadas por el enlace covalente de la primera y la segunda entidad en el complejo, si el enlace covalente del complejo no es fisiológico.

45 La etapa (i) y la etapa (ii) se pueden realizar secuencialmente (la etapa (i) y después la (ii)) o simultáneamente. Por ejemplo, se pueden exponer los miembros de unión a la primera entidad y después a la segunda, a la primera y a la segunda entidad simultáneamente, en el que la primera entidad está a una concentración en exceso de la segunda entidad, por ejemplo, un exceso molar de al menos el doble, y en el que la primera y la segunda entidad forman el complejo.

50 Una ventaja de realizar la etapa (i) antes que la etapa (ii) es que los miembros de unión se exponen a la primera entidad antes de exponerse al complejo y, por lo tanto, los miembros de unión que se unen a la primera entidad sola se pueden unir en la etapa inicial, lo que reduce la probabilidad de que estos miembros de unión se unan al complejo en la etapa (ii). La situación es análoga para las etapas (viii) y (iv), excepto porque se intercambian las entidades primera y segunda.

55 La unión de la segunda entidad al soporte se puede producir antes de la etapa (ii) o en la etapa (ii) o la etapa (iii). Por ejemplo, la etapa (iii) puede comprender exponer el complejo a un soporte que se une a la segunda entidad, por ejemplo, se une a una marca unida a la segunda entidad. La situación es análoga para las etapas (ix) y (x) en relación con la unión de la primera entidad al soporte.

60 Los complejos aislados se pueden lavar para eliminar los miembros de unión no unidos y, de este modo, se puede recuperar en el soporte el miembro de unión unido al complejo de entre la pluralidad de miembros de unión.

65 Los métodos pueden comprender además ensayos adicionales (por ejemplo, un ELISA, donde los miembros de unión seleccionados son moléculas de anticuerpo) para confirmar que los miembros de unión seleccionados se unen al complejo y no se unen a la primera o a la segunda entidad solas, y/o para seleccionar más miembros de unión

con propiedades deseadas tales como mayor especificidad por el complejo.

En un ejemplo, la divulgación es un método de selección de un miembro de unión de entre una pluralidad de miembros de unión, en el que el miembro de unión se une a un complejo formado por una primera entidad y una segunda entidad y no se une a la primera entidad o a la segunda entidad solas, en el que el método comprende:

proporcionar la primera y la segunda entidad, una de las cuales está enlazada a una marca para unirse a un soporte sólido ("entidad marcada") y una de las cuales no está enlazada a la marca ("entidad no marcada");

(i) exponer la pluralidad de miembros de unión a la entidad no marcada, en condiciones que permitan la unión de los miembros de unión a la entidad no marcada;

(ii) exponer la pluralidad de miembros de unión y la entidad no marcada a la entidad marcada, en el que la entidad no marcada está a una concentración al menos dos veces mayor que la concentración de la entidad marcada, de tal forma que la entidad marcada forma un complejo con la entidad no marcada, exponiendo de este modo la pluralidad de miembros de unión al complejo, en condiciones que permiten la unión de miembros de unión al complejo;

(iii) aislar el complejo sobre un soporte sólido al que está unida la entidad marcada; y

(iv) recuperar uno o más miembros de unión unidos al complejo.

Opcionalmente, el método puede comprender además:

(v) amplificar la información genética que codifica los uno o más miembros de unión recuperados; y

(vii) expresar la información genética para producir una pluralidad de miembros de unión.

El método puede comprender además repetir después las etapas (i) a (iv), para uno o más ciclos de selección posteriores. De forma ventajosa, se puede alternar la orientación en la que el complejo se une al soporte en ciclos posteriores. Por tanto, si la primera entidad está marcada en el ciclo 1, la segunda entidad está marcada en el ciclo 2, después la primera entidad está marcada en el ciclo 3 y así sucesivamente. Como se describe anteriormente, el uso de la misma marca para la primera y la segunda entidad en ciclos de selección alternos permite convenientemente usar el mismo tipo de soporte en todos los ciclos, es decir, un soporte que comprende o está recubierto con un miembro de unión que se une a la marca. Opcionalmente, sin embargo, se pueden marcar ambas entidades primera y segunda y usar un tipo de soporte diferente para aislar el complejo en ciclos de selección alternos. Por tanto, opcionalmente, la "entidad no marcada" puede estar unida a la marca, con la condición de que no sea la misma marca que está unida a la entidad marcada.

Típicamente, las entidades primera y segunda son moléculas orgánicas, normalmente moléculas biológicas que se asocian para formar un complejo. Los ejemplos incluyen complejos ligando:receptor formados por un ligando y un receptor, complejos enzima:sustrato formados por una enzima y un sustrato de la enzima; y complejos anticuerpo:antígeno formados por una molécula de anticuerpo y un antígeno al que se une la molécula de anticuerpo. La primera y/o la segunda entidad puede ser un polipéptido y, por tanto, el método puede comprender seleccionar un miembro de unión que se une a un complejo formado por un primer polipéptido y un segundo polipéptido y no se une al primer o al segundo polipéptido solos.

Las entidades primera y segunda pueden ser iguales o diferentes. Típicamente, las entidades primera y segunda son diferentes, por ejemplo, moléculas orgánicas o biológicas diferentes, por ejemplo, polipéptidos diferentes. Por tanto, el método puede comprender seleccionar un miembro de unión que se une a un complejo en el que están asociadas dos entidades diferentes, por ejemplo, en el que el complejo es un heterodímero.

Cuando las entidades primera y segunda forman un complejo, se forma un epítipo unido por miembros de unión de la invención. Por ejemplo, el epítipo puede comprender una parte de la primera entidad y una parte de la segunda entidad, por ejemplo, puede comprender uno o más aminoácidos del primer polipéptido y uno o más aminoácidos del segundo polipéptido. De forma alternativa, el epítipo puede estar sólo en una entidad y puede estar presente o expuesto sólo cuando esa entidad está complejada con la otra entidad, como consecuencia de un cambio conformacional en la entidad cuando forma el complejo.

En métodos de la divulgación, se puede someter a prueba adicionalmente la capacidad para unirse a IL-6:IL-6Ra (por ejemplo, IL-6:sIL-6Ra), también se puede determinar la capacidad para competir con un miembro de unión, por ejemplo, una molécula de anticuerpo de 1 a 5 (por ejemplo, en formato scFv y/o formato IgG, por ejemplo, IgG1), para unirse a IL-6:IL-6Ra, por ejemplo, IL-6:sIL-6Ra. Se puede someter a prueba la capacidad para neutralizar IL-6:IL-6Ra (por ejemplo, IL-6:sIL-6Ra), como se analiza con más detalle en otra parte del presente documento.

Un miembro de unión de acuerdo con la presente divulgación se puede unir a IL-6:IL-6Ra, por ejemplo, IL-6:sIL-6Ra, con la afinidad de uno de los anticuerpos de 1 a 5, por ejemplo, scFv o IgG1, o con una afinidad mejor.

Un miembro de unión de acuerdo con la presente divulgación puede neutralizar una actividad biológica de IL-6:IL-6Ra (por ejemplo, IL-6:sIL-6Ra) con la potencia de uno de los anticuerpos de 1 a 5, por ejemplo, scFv o IgG1, o con una potencia mejor.

5 Se pueden comparar la afinidad de unión y la potencia de neutralización de los diferentes miembros de unión en condiciones apropiadas.

10 Las variantes de los dominios VH y VL y las CDR de la presente divulgación, incluyendo aquellas para las que se exponen secuencias de aminoácidos en el presente documento, y que se pueden emplear en miembros de unión de la divulgación, se pueden obtener por medio de métodos de alteración o mutación de secuencia y detección de miembros de unión a antígeno con las características deseadas. Los ejemplos de características deseadas incluyen, pero no se limitan a:

15 • Incremento en la afinidad de unión para antígeno con relación a anticuerpos conocidos que son específicos para el antígeno

20 • Incremento en la neutralización de una actividad de antígeno con relación a anticuerpos conocidos que son específicos para el antígeno si se conoce la actividad

• Capacidad competitiva especificada con un anticuerpo o ligando conocido para el antígeno a una proporción molar específica

25 • Capacidad para inmunoprecipitar el complejo

• Capacidad para unirse a un epítipo especificado

30 ○ Epítipo lineal, por ejemplo secuencia peptídica identificada usando unión a péptido como se describe en el presente documento, por ejemplo usando péptidos detectados en conformación lineal y/o restringida

○ Epítipo conformacional, formado por residuos no continuos

35 ○ Capacidad para modular una actividad biológica nueva de IL-6:IL-6Ra (por ejemplo, IL-6:sIL-6Ra) o molécula posterior.

Tales métodos también se proporcionan en el presente documento.

40 Se pueden producir y usar variantes de moléculas de anticuerpo divulgadas en el presente documento. Siguiendo el ejemplo de la química computacional en la aplicación de técnicas para el análisis de datos multivariados para las relaciones de estructura/propiedad-actividad [40], se pueden derivar relaciones cuantitativas de actividad-propiedad de anticuerpos usando técnicas matemáticas bien conocidas, tales como regresión estadística, reconocimiento de patrones y clasificación [41, 42, 43, 44, 45, 46]. Las propiedades de los anticuerpos se pueden derivar de modelos empíricos y teóricos (por ejemplo, análisis de residuos en contacto probable o propiedad fisicoquímica calculada) de secuencia de anticuerpo, las estructuras funcionales y tridimensionales y estas propiedades se pueden considerar de forma individual y en combinación.

50 Típicamente, un sitio de unión a antígeno del anticuerpo compuesto de un dominio VH y a dominio VL se forma por seis bucles de polipéptido: tres del dominio variable de cadena ligera (VL) y tres del dominio variable de cadena pesada (VH). El análisis de anticuerpos de estructura atómica conocida ha dilucidado relaciones entre la secuencia y la estructura tridimensional de sitios de combinación de anticuerpo [47, 48]. Estas relaciones implican que, excepto para la tercera región (bucle) en dominios VH, los bucles del sitio de unión tiene uno de un pequeño número de conformaciones de cadena principal: estructuras canónicas. Se ha demostrado que la estructura canónica formada en un bucle particular está determinada por su tamaño y la presencia de determinados residuos en sitios clave tanto en las regiones de bucle como en las regiones estructurales [47, 48].

55 Este estudio de relación de secuencia-estructura se puede usar para la predicción de estos residuos en un anticuerpo de secuencia conocida, pero de una estructura tridimensional desconocida, que son importantes en el mantenimiento de la estructura tridimensional de sus bucles de CDR y por lo tanto, mantienen la especificidad de unión. Estas predicciones se pueden respaldar comparando las predicciones con los resultados de los experimentos de optimización principales. En un enfoque estructural, se puede crear un modelo de la molécula de anticuerpo [49] usando cualquier paquete informático comercial o disponible gratuitamente, tal como WAM [50]. Entonces, se puede usar un paquete de programas informáticos de análisis y visualización de proteínas, tal como Insight II (Accelrys, Inc.) o Deep View [51] para evaluar posibles sustituciones en cada posición en la CDR. A continuación, se puede usar esta información para realizar sustituciones propensas a tener un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad.

65

En general, las técnicas necesarias para realizar sustituciones dentro de secuencias de aminoácidos de CDR, dominios VH o VL de anticuerpo y miembros de unión están disponibles en la técnica. Las secuencias de variantes se pueden realizar con sustituciones que se puede predecir o no que tengan un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad, y se pueden someter a prueba para determinar su capacidad para unirse a y/o neutralizar la IL-6 y/o IL-6Ra (por ejemplo, sIL-6Ra) y/o para cualquier otra propiedad deseada.

Las variantes de secuencia de aminoácidos de dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL con secuencias que se divulgan específicamente en el presente documento se pueden emplear de acuerdo con la presente divulgación, como se analizó.

Las variantes de dominios VL de la divulgación, y los miembros de unión o moléculas de anticuerpo que los comprenden, incluyen dominios VL en los que la glicina no está presente en el residuo de Kabat 108, por ejemplo donde el residuo de Kabat 108 es un residuo diferente o está eliminado. Por ejemplo, una molécula de anticuerpo, tal como una molécula de anticuerpo que carece de un dominio constante, por ejemplo un scFv, puede comprender un dominio VL que tiene una secuencia de dominio VL o variante del mismo como se describe en el presente documento, en el que la glicina en el residuo Kabat 108 es un residuo de aminoácido diferente de glicina o está eliminado.

Otro aspecto de la divulgación es una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % con un dominio VH de cualquiera de los anticuerpos 1 a 5 mostrados en el listado de secuencias adjunto, y/o que comprende un dominio VL que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de al menos el 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o 99 % con un dominio VL de cualquiera de los anticuerpos 1 a 5 mostrados en el listado de secuencias adjunto. Los algoritmos que se pueden usar para calcular el % de identidad de dos secuencias de aminoácidos incluyen, por ejemplo, BLAST [52], FASTA [53], o el algoritmo Smith-Waterman [54], por ejemplo, que emplean parámetros por defecto.

Las variantes particulares pueden incluir una o más alteraciones de secuencia de aminoácidos (adición, deleción, sustitución y/o inserción de un residuo de aminoácido).

Las alteraciones se pueden realizar en una o más regiones estructurales y/o una o más CDR. Normalmente las alteraciones no dan como resultado una pérdida de función, de modo que un miembro de unión que comprende una secuencia de aminoácidos alterada de este modo puede retener una capacidad para unirse a y/o neutralizar la IL-6 y/o IL-6Ra (por ejemplo sIL-6Ra). Puede retener la misma capacidad de unión y/o neutralización cuantitativa que un miembro de unión en el que no se realiza la alteración, por ejemplo medida en un ensayo descrito en el presente documento. El miembro de unión que comprende una secuencia de aminoácidos alterada de este modo puede tener una capacidad mejorada para unirse a y/o neutralizar la IL-6 y/o IL-6Ra (por ejemplo sIL-6Ra).

La alteración puede comprender reemplazar uno o más residuos de aminoácido con un aminoácido no natural o no estándar, modificar uno o más residuos de aminoácido de una forma no natural o no estándar, o insertar uno o más aminoácidos no naturales o no estándar en la secuencia. Los ejemplos de números y localizaciones de las alteraciones en secuencias de la invención se describen en otra parte del presente documento. Los aminoácidos naturales incluyen los 20 L-aminoácidos "estándar" identificados como G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E por sus códigos de una letra estándar. Los aminoácidos no estándar incluyen cualquier otro residuo que se pueda incorporar en un esqueleto polipeptídico o que pueda resultar de una modificación de un residuo de aminoácido existente. Los aminoácidos no estándar pueden ser naturales o no naturales. Varios aminoácidos naturales no estándar son conocidos en la técnica, tales como 4-hidroxiprolina, 5-hidroxilisina, 3-metilhistidina, N-acetilserina, etc. [55]. Estos residuos de aminoácido que están derivatizados en su posición N-alfa estarán situados sólo en el extremo N-terminal de una secuencia de aminoácidos. Normalmente, en la presente invención, un aminoácido es un L-aminoácido, pero puede ser un D-aminoácido. Por lo tanto, la alteración puede comprender modificar un L-aminoácido en, o reemplazarlo con, un D-aminoácido. También son conocidas formas metiladas, acetiladas y/o fosforiladas de aminoácidos, y los aminoácidos en la presente divulgación pueden estar sujetos a dicha modificación.

Las secuencias de aminoácidos en dominios de anticuerpo y miembros de unión de la divulgación pueden comprender aminoácidos no naturales o no estándar descritos anteriormente. Los aminoácidos no estándar (por ejemplo D-aminoácidos) se pueden incorporar en una secuencia de aminoácidos durante la síntesis, o por la modificación o la sustitución de los aminoácidos estándar "originales" después de la síntesis de la secuencia de aminoácidos.

El uso de aminoácidos no estándar y/o no naturales incrementa la diversidad estructural y funcional, y por tanto puede incrementar el potencial para lograr las propiedades de neutralización y unión a IL-6:IL-6Ra (por ejemplo IL-6:sIL-6Ra) deseadas en un miembro de unión de la invención. Adicionalmente, se ha demostrado que los D-aminoácidos y análogos tienen perfiles farmacocinéticos diferentes en comparación con L-aminoácidos estándar, debido a una degradación *in vivo* de polipéptidos que tienen L-aminoácidos después de la administración a un animal, por ejemplo, un ser humano, lo que significa que los D-aminoácidos son ventajosos para algunas

aplicaciones *in vivo*.

5 Las regiones VH o VL novedosas que llevan secuencias derivadas de CDR de la divulgación se pueden generar usando mutagénesis aleatoria de uno o más genes de VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones dentro de todo el dominio variable. Dicha técnica se describe por Gram *et al.* [56], que usó PCR propensa a error. En algunos aspectos, se realizan una o dos sustituciones de aminoácidos dentro de todo un dominio variable o conjunto de CDR.

10 Otro método que se puede usar es dirigir la mutagénesis a regiones CDR de los genes de VH o VL. Dichas técnicas se describen por Barbas *et al.* [57] y Schier *et al.* [58].

Todas las técnicas descritas anteriormente son conocidas como tales en la técnica y el experto será capaz de usar dichas técnicas para proporcionar miembros de unión de la invención usando metodología rutinaria en la técnica.

15 Otro aspecto de la invención divulga un método para obtener un sitio de unión a antígeno del anticuerpo para IL-6:IL-6Ra, por ejemplo IL-6:sIL-6Ra, comprendiendo el método proporcionar por medio de adición, delección, sustitución o inserción de uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH expuesto en el presente documento un dominio VH que es una variante de secuencia de aminoácidos del dominio VH, combinando opcionalmente el dominio VH proporcionado así con uno o más dominios VL, y sometiendo a prueba el dominio VH o la combinación o combinaciones de VH/VL para identificar un miembro de unión o un sitio de unión a antígeno del anticuerpo para IL-6:IL-6Ra, por ejemplo IL-6:sIL-6Ra y opcionalmente con una o más propiedades deseadas, por ejemplo, la capacidad para neutralizar la actividad de IL-6 y/o IL-6Ra (por ejemplo sIL-6Ra). Dicho dominio VL puede tener una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente como se expone en el presente documento. Se puede emplear un método análogo en el que una o más variantes de secuencia de un dominio VL divulgado en el presente documento se combinan con uno o más dominios VH.

30 Como se destaca anteriormente, una secuencia de aminoácidos de CDR como se expone sustancialmente en el presente documento se pueden llevar como una CDR en un dominio variable de anticuerpo humano o una partes sustancial del mismo. Las secuencias de HCDR3 como se exponen sustancialmente en el presente documento representan modos de realización de la presente invención y cada una de éstas se puede llevar como una HCDR3 en un dominio variable de cadena pesada humano o una parte sustancial del mismo.

35 Los dominios variables empleados en la invención se pueden obtener o derivar de cualquier línea germinal o dominio variable humano reorganizado, o puede ser un dominio variable sintético en secuencias reales o de consenso de dominios variables humanos conocidos. Un dominio variable se puede derivar de un anticuerpo no humano. Una secuencia de CDR de la invención (por ejemplo CDR3) se puede introducir en un repertorio de dominios variables que carecen de una CDR (por ejemplo CDR3), usando tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, Marks *et al.* [59] describen métodos de producción de repertorios de dominios variables de anticuerpo en los que los cebadores de consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' del área de dominio variable se usan junto con cebadores de consenso para la tercera región estructural de genes de VH humano para proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carecen de una CDR3. Marks *et al.* describen además cómo se puede combinar este repertorio con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente invención se pueden reordenar con repertorios de dominios VH o VL que carecen de una CDR3, y los dominios VH o VL completos reordenados se pueden combinar con un dominio VL o VH afín para proporcionar miembros de unión de la divulgación. Después, el repertorio se puede presentar en un sistema de huésped adecuado, tal como el sistema de presentación de fagos del documento WO 92/01047, o cualquiera de un gran volumen de literatura posterior, incluyendo Kay, Winter y McCafferty [60], de modo que se puedan seleccionar los miembros de unión adecuados. Un repertorio puede consistir en desde cualquier número de 10^4 miembros individuales en adelante, por ejemplo al menos 10^5 , al menos 10^6 , al menos 10^7 , al menos 10^8 , al menos 10^9 o al menos 10^{10} miembros o más. Otros sistemas de huésped adecuados incluyen, pero no se limitan a, presentación de levaduras, presentación bacteriana, presentación de T7, presentación vírica, presentación celular, presentación ribosómica y presentación covalente.

55 Se proporciona un método de preparación de un miembro de unión para IL-6:IL-6Ra, por ejemplo IL-6:sIL-6Ra, método que comprende:

(a) proporcionar un repertorio de partida de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH que incluyen una CDR3 que se va a reemplazar o bien una región codificante de CDR3;

60 (b) combinar dicho repertorio con un ácido nucleico dador que codifica una secuencia de aminoácidos como se expone sustancialmente en el presente documento para una CDR3 de VH de modo que se inserta dicho ácido nucleico dador en la región CDR3 en el repertorio, para proporcionar un repertorio producto de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH;

65 (c) expresar los ácidos nucleicos de dicho repertorio de producto;

(d) seleccionar un miembro de unión para IL-6:IL-6Ra, por ejemplo IL-6:sIL-6Ra; y

(e) recuperar dicho miembro de unión o ácido nucleico que lo codifica.

- 5 De nuevo, se puede emplear un método análogo en el que una CDR3 VL de la invención se combina con un repertorio de ácidos nucleicos que codifican un dominio VL que incluye una CDR3 que se va a reemplazar o bien que carece de una región codificante de CDR3.

10 De forma similar, una o más, o las tres CDR se pueden injertar en un repertorio de dominios VH o VL que a continuación se criban para detectar un miembro de unión o miembros de unión para IL-6:IL-6Ra, por ejemplo IL-6:sIL-6Ra.

15 Por ejemplo, se puede emplear uno o más del anticuerpo de 1 a 5 HCDR1, HCDR2 y HCDR3 o el conjunto de anticuerpos de 1 a 5 de HCDR, y/o se puede emplear uno o más del anticuerpo de 1 a 5 LCDR1, LCDR2 y LCDR3 o el conjunto de anticuerpo de 1 a 5 de LCDR.

De forma similar, se pueden emplear otros dominios VH y VL, conjuntos de CDR y conjuntos de HCDR y/o conjuntos de LCDR divulgados en el presente documento.

20 Una parte sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina puede comprender al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones estructurales de intervención. La parte también puede incluir al menos aproximadamente un 50 % de cualquiera o ambas de la primera y cuarta regiones estructurales, siendo el 50 % un 50 % del extremo C terminal de la primera región estructural y un 50 % del extremo N terminal de la cuarta región estructural. Los
25 residuos adicionales en el extremo N terminal o C terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser los que normalmente no están asociados con regiones de dominios variables naturales. Por ejemplo, la construcción de miembros de unión de la presente invención realizada por técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de residuos N o C terminales codificados por enlazadores introducidos para facilitar la clonación u
30 otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlazadores para unir dominios variables de la invención a secuencias de proteínas adicionales que incluyen regiones constantes del anticuerpo, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de diacuerpos) o marcadores detectables/funcionales como se analiza con más detalle en otra parte del presente documento.

35 Aunque en algunos aspectos de la divulgación, los miembros de unión comprenden un par de dominios VH y VL, los dominios de unión individuales basados en secuencias de dominio VH o bien VL forman otros aspectos de la divulgación. Se sabe que los dominios de inmunoglobulina individuales, en especial los dominios VH, se pueden unir a antígenos objetivo de una manera específica. Por ejemplo, véase el análisis de dAc anterior.

40 En el caso de cualquiera de los dominios de unión individuales, se pueden usar estos dominios para cribar dominios complementarios que pueden formar un miembro de unión de dos dominios que se puede unir a IL-6:IL-6Ra, por ejemplo IL-6:sIL-6Ra.

45 Esto se puede lograr por métodos de cribado de presentación de fagos usando el denominado enfoque combinatorio dual jerárquico como se divulga en el documento WO 92/01047, en el que una colonia individual que contiene un clon de cadena H o bien L se usa para infectar una colección completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el miembro de unión de dos cadenas resultante se selecciona de acuerdo con técnicas de presentación de fagos, tales como las descritas en esa referencia. Esta técnica también se divulga en Marks *et al*, *ibid*. [59]

50 Los miembros de unión de la presente divulgación pueden comprender además regiones constantes de anticuerpo o partes de las mismas, por ejemplo regiones constantes de anticuerpo humano o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio VL puede estar unido en su extremo C terminal a dominios constantes de cadena ligera de anticuerpo incluyendo cadenas C_K o C_λ humanas. De forma similar, un miembro de unión basado en un dominio VH puede estar unido en su extremo C terminal a toda o parte (por ejemplo, un dominio CH1) de una cadena pesada de
55 inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo IgG, IgA, IgE y IgM y cualquiera de las subclases de isotipos, en particular IgG1 y IgG4. La IgG1 es ventajosa, debido a su función efectora y a la facilidad de fabricación. También puede ser útil cualquier variante de región sintética u otra constante que tiene estas propiedades y que estabiliza regiones variables, en la presente divulgación.

60 Los miembros de unión de la divulgación pueden estar marcados con un marcador detectable o funcional. Por tanto, un miembro de unión o molécula de anticuerpo puede estar presente en forma de un inmunoconjugado para obtener una señal detectable y/o cuantificable. Un inmunoconjugado puede comprender una molécula de anticuerpo de la invención conjugada con un marcador detectable o funcional. Un marcador puede ser cualquier molécula que produzca o que se pueda inducir para que produzca una señal, incluyendo pero sin limitarse a agentes fluorescentes, radiomarcadores, enzimas, quimioluminiscentes o fotosensibilizadores. Por tanto, la unión se puede
65 detectar y/o medir detectando la fluorescencia o luminiscencia, radioactividad, actividad enzimática o absorbancia de luz.

Los marcadores adecuados incluyen, a modo de ilustración y sin limitación,

- 5 - enzimas, tales como fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH"), alfa-D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa amilasa, anhidrasa carbónica, acetilcolinesterasa, lisozima, malato deshidrogenasa y peroxidasa, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante;
- colorantes;
- 10 - marcadores fluorescentes o agentes fluorescentes, tales como fluoresceína y sus derivados, fluorocromo, compuestos de rodamina y derivados, GFP (GFP de "Green Fluorescent Protein"), dansilo, umbelliferona, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído, y fluorescamina; fluoróforos tales como criptatos de lantánidos y quelatos, por ejemplo, europio, etc (Perkin Elmer y Cis Biointernational),
- 15 - marcadores quimioluminiscentes o agentes quimioluminiscentes, tales como isoluminol, luminol y los dioxetanos;
- marcadores bioluminescentes, tales como luciferasa y luciferina;
- sensibilizadores;
- 20 - coenzimas;
- sustratos enzimáticos;
- 25 - radiomarcadores incluyendo pero sin limitarse a bromo77, carbono14, cobalto57, flúor8, galio67, galio 68, hidrógeno3 (tritio), indio111, indio 113m, yodo123m, yodo125, yodo126, yodo131, yodo133, mercurio107, mercurio203, fósforo32, renio99m, renio101, renio105, rutenio95, rutenio97, rutenio103 , rutenio105, scandio47, selenio75, azufre35, tecnecio99, tecnecio99m, telurio121m, telurio122m, telurio125m, tulio165, tulio1,67, tulio168, ytrio199 y otros radiomarcadores mencionados en el presente documento;
- 30 - partículas, tales como látex o partículas de carbono; sol metálica; cristalita; liposomas; células, etc., que pueden estar marcadas adicionalmente con un colorante, catalizador u otro grupo detectable;
- moléculas tales como biotina, digoxigenina o 5-bromodesoxiuridina;
- 35 - restos de toxina, tales como por ejemplo un resto de toxina seleccionado de un grupo de exotoxina de Pseudomonas (PE o un fragmento citotóxico o mutante del mismo), toxina de difteria o un fragmento citotóxico o mutante del mismo, una toxina botulínica A, B, C, D, E o F, ricina o un fragmento citotóxico de la misma por ejemplo ricina A, abrina o un fragmento citotóxico de la misma, saporina o un fragmento citotóxico de la misma, toxina antivirica de fitolaca o a fragmento citotóxico de la misma y briodina 1 o un fragmento citotóxico de la misma.
- 40 Las enzimas y coenzimas adecuadas se divulgan en Litman, *et al.*, documento US 4275149, y Boguslaski, *et al.*, documento US 4318980. Los agentes fluorescentes y quimioluminiscentes adecuados se divulgan en Litman, *et al.*, documento US 4275149. Los marcadores incluyen además restos químicos, tales como biotina que se puede detectar por medio de la unión a un resto detectable afín específico, por ejemplo avidina o estreptavidina marcada.
- 45 Los marcadores detectables se pueden unir a anticuerpos de la invención usando química convencional conocida en la técnica.
- 50 Los inmunoconjugados o sus fragmentos funcionales se pueden preparar por métodos conocidos para el experto en la técnica. Se pueden acoplar a enzimas o a marcadores fluorescentes directamente o por el intermediario de un grupo espaciador o de un grupo enlazador, tal como un polialdehído, como glutaraldehído, ácido etilendiamintetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminpentaacético (DPTA), o en presencia de agentes de acoplamiento, tales como los mencionados anteriormente para los conjugados terapéuticos. Los marcadores que contienen conjugados de tipo fluoresceína se pueden preparar por reacción con un isotiocianato.
- 55 Los métodos conocidos para el experto en la técnica que existen para el acoplamiento de los radioisótopos terapéuticos a los anticuerpos directamente o bien por medio de un agente quelante, tal como EDTA, DTPA mencionado anteriormente se pueden usar para los radioelementos que se pueden usar en diagnóstico. Asimismo es posible realizar el marcado con sodio125 por el método de cloramina T [61] o también con tecnecio99m por la técnica de Crockford *et al.*, (documento US 4424200), o unirse por medio de DTPA como se describe por Hnatowich
- 60 (documento US 4479930).
- Existen numerosos métodos por los que el marcador puede producir una señal detectable por medios externos, por ejemplo, por examen visual, radiación electromagnética, calor y reactivos químicos. El marcador también se puede unir a otro miembro de unión que se une al anticuerpo de la invención, o a un soporte.
- 65 El marcador puede producir directamente una señal, y por lo tanto, no se requieren componentes adicionales para

producir una señal. Numerosas moléculas orgánicas, por ejemplo agentes fluorescentes, pueden absorber luz ultravioleta y visible, donde la absorción de luz transfiere energía a estas moléculas y las eleva a un estado de energía excitado. Esta energía absorbida se disipa a continuación por emisión de luz a una segunda longitud de onda. Esta emisión de segunda longitud de onda también puede transferir energía a una molécula aceptora
 5 marcada, y la energía resultante disipada de la molécula aceptora por emisión de luz, por ejemplo transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Otros marcadores que producen directamente una señal incluyen colorantes e isótopos radioactivos.

De forma alternativa, el marcador puede necesitar otros componentes para producir una señal, y entonces el sistema que produce la señal incluiría todos los componentes necesarios para producir una señal medible, que
 10 puede incluir sustratos, coenzimas, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, neutralizadores, iones metálicos, y una sustancia de unión específica necesaria para la unión de sustancias que generan señal. Se puede encontrar un análisis detallado de sistemas de producción de señal adecuados en Ullman *et al.* documento US 5185243,

La presente invención divulga un método que comprende provocar o permitir la unión de un miembro de unión como se proporciona en el presente documento a IL-6:IL-6Ra, por ejemplo IL-6:sIL-6Ra. Como se destaca, dicha unión puede tener lugar *in vivo*, por ejemplo después de la administración de un miembro de unión, o ácido nucleico que codifica un miembro de unión, o puede tener lugar *in vitro*, por ejemplo en ELISA, transferencia western,
 15 inmunocitoquímica, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad, y ensayos basados en células o bioquímicos, tales como un ensayo de proliferación de TF-1.

La presente invención también divulga niveles de medida de antígeno directamente, empleando un miembro de unión de acuerdo con la invención, por ejemplo, en un sistema de biosensor. Por ejemplo, la presente invención comprende un método de detección y/o medida de la unión a IL-6:IL-6Ra, por ejemplo IL-6:sIL-6Ra, que comprende,
 25 (i) exponer dicho miembro de unión a IL-6:IL-6Ra, por ejemplo IL-6:sIL-6Ra y (ii) detección de la unión de dicho miembro de unión a IL-6:IL-6Ra, por ejemplo IL-6:sIL-6Ra, en el que la unión se detecta usando cualquier método o marcador detectable descrito en el presente documento. Este , y cualquier otro método de detección de la unión descrito en el presente documento, puede ser interpretado directamente por la persona que lleva a cabo el método,
 30 por ejemplo, observando visualmente un marcador detectable. De forma alternativa, este método, o cualquier otro método de detección de la unión descrito en el presente documento, puede producir un informe en forma de autorradiografía, una fotografía, una impresión de ordenador, un informe de citometría de flujo, una gráfica, un gráfico, un tubo de ensayo o recipiente o pocillo que contiene el resultado, o cualquier otra representación visual o física de un resultado del método.

Se puede determinar la cantidad de unión del miembro de unión a IL-6:IL-6Ra, por ejemplo IL-6:sIL-6Ra. La cuantificación puede estar relacionada con la cantidad del antígeno en una muestra de prueba, que puede ser de interés diagnóstico. El cribado para detectar IL-6:IL-6Ra, por ejemplo IL-6:sIL-6Ra, la unión y/o la cuantificación del mismo puede ser útil, por ejemplo, en el cribado de pacientes para detectar enfermedades o trastornos denominados
 35 en el presente documento y/o cualquier otra enfermedad o trastorno que implique una expresión y/o actividad de IL-6 y/o IL-6Ra (por ejemplo sIL-6Ra) anómalo. Los niveles de IL-6:IL-6Ra (por ejemplo IL-6:sIL-6Ra) se pueden usar como una medida del nivel de IL-6 en una muestra.

Varias enfermedades están asociadas con un incremento en los niveles de IL-6. Los niveles de IL-6 son un indicador de diagnóstico y/o pronóstico útil para varios trastornos, por ejemplo cánceres asociados con un incremento en los niveles de IL-6, y enfermedades inflamatorias y/o autoinmunitarias, como se describe en otra parte en el presente documento.

Un método de diagnóstico o pronóstico de la divulgación puede comprender (i) obtener una muestra de tejido o fluido de un sujeto, (ii) exponer dicha muestra de tejido i fluido a uno o más miembros de unión de la presente invención; y (iii) detectar IL-6:IL-6Ra unido, por ejemplo IL-6:sIL-6Ra, en comparación con una muestra de control, en el que un incremento en la cantidad de unión de IL-6:IL-6Ra (por ejemplo IL-6:sIL-6Ra) en comparación con el control puede indicar un nivel anómalo de expresión o actividad de IL-6 y/o IL-6Ra (por ejemplo sIL-6Ra). Las muestras de tejido o fluido que se van a someter a prueba incluyen sangre, suero, orina, material de biopsia,
 40 tumores, o cualquier tejido sospechoso de contener niveles anómalos de IL-6:IL-6Ra (por ejemplo IL-6:sIL-6Ra). Los sujetos puestos a prueba positivos para actividad o niveles anómalos de IL-6:IL-6Ra (por ejemplo IL-6:sIL-6Ra) también se pueden beneficiar de los métodos de tratamiento divulgados en el presente documento.

Los expertos en la técnica son capaces de elegir un modo adecuado de determinación de la unión del miembro de unión a un antígeno de acuerdo con su preferencia y conocimiento general, en vista de los métodos divulgados en el presente documento.

Las reactividades de los miembros de unión en una muestra se pueden determinar por cualquier medio apropiado. El radioinmunoensayo (RIA) es una posibilidad. El antígeno marcado radioactivo se mezcla con antígeno no marcado (la muestra de prueba) y se deja que se una al miembro de unión. El antígeno unido se separa físicamente del antígeno no unido y se determina la cantidad de antígeno radioactivo unido al miembro de unión. Cuanto más
 65

antígeno haya en la muestra de prueba, menos antígeno radioactivo se unirá al miembro de unión. También se puede usar un ensayo de unión competitiva con antígeno no radioactivo, usando un antígeno o un análogo enlazado a una molécula indicadora. La molécula indicadora puede ser un fluorocromo, fósforo o colorante de láser con características de absorción o emisión espectralmente aisladas. Los fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y Texas Red, y quelatos de lantánidos o criptatos. Los colorantes cromógenos adecuados incluyen diaminobenzidina.

Otros indicadores incluyen partículas coloidales macromoleculares o material particulado, tal como perlas de látex que son agentes coloreados, magnéticos o paramagnéticos, y biológica o químicamente activos que pueden provocar directa o indirectamente señales detectables para observarse visualmente, detectarse electrónicamente o registrarse de otro modo. Estas moléculas pueden ser enzimas, que catalizan reacciones que desarrollan, o cambian de color o provocan cambios en las propiedades eléctricas, por ejemplo. Pueden ser molecularmente excitables, de modo que las transiciones electrónicas entre los estados de energía dan como resultado absorciones y emisiones espectrales características. Pueden incluir entidades químicas usadas junto con biosensores. Se pueden emplear sistemas de detección de biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina.

Las señales generadas por conjugados individuales de miembro de unión-indicador se pueden usar para derivar datos absolutos o relativos cuantificables de la unión del miembro de unión relevante en muestras (normal y prueba).

También se divulga un kit que comprende un miembro de unión de acuerdo con cualquier aspecto o modo de realización de la presente invención. En el kit, el miembro de unión puede estar marcado para permitir que se determine su reactividad en una muestra, por ejemplo como se describe con más detalle a continuación. Además, el miembro de unión puede o no estar unido a un soporte sólido. Los componentes de un kit, en general, son estériles y están en viales sellados u otros recipientes. Se pueden emplear kits en el análisis de diagnóstico u otros métodos para los que son útiles los miembros de unión. Un kit puede contener instrucciones para el uso de los componentes en un método, por ejemplo un método de acuerdo con la presente invención. Dentro de un kit de la invención pueden estar incluidos materiales auxiliares para ayudar en o para permitir la realización de dicho método. Los materiales auxiliares incluyen un segundo miembro de unión diferente que se une al primer miembro de unión y se conjuga a un marcador detectable (por ejemplo, un marcador fluorescente, isótopo radioactivo o enzima). Los kits basados en anticuerpos también pueden comprender perlas para llevar a cabo una inmunoprecipitación. En general, cada componente de los kits está en su propio recipiente adecuado. Por tanto, en general, estos kits comprenden distintos recipientes adecuados para cada miembro de unión. Además, los kits pueden comprender instrucciones para realizar el ensayo y métodos para interpretar y analizar los datos que resultan de la realización del ensayo.

La presente invención también divulga el uso de un miembro de unión como antes para medir los niveles de antígeno en un ensayo de competición, es decir un método de medida del nivel de antígeno en una muestra empleando un miembro de unión como se proporciona por la presente invención en un ensayo de competición. Esto puede ser cuando no se requiere la separación física del antígeno unido del no unido. El enlace de una molécula indicadora al miembro de unión de modo que se produzca un cambio físico u óptico en la unión es una posibilidad. La molécula indicadora puede generar directa o indirectamente señales, que pueden ser cuantificables. El enlace de las moléculas indicadoras puede ser directa o indirectamente, covalentemente, por ejemplo por medio de un enlace peptídico o no covalentemente. La unión por medio de un enlace peptídico puede ser como resultado de la expresión recombinante de una fusión génica que codifica el anticuerpo y la molécula indicadora.

En varios aspectos y modos de realización, la presente divulgación se extiende a un miembro de unión que compite por la unión a IL-6:IL-6Ra, por ejemplo IL-6:sIL-6Ra, con cualquier miembro de unión definido en el presente documento, por ejemplo cualquiera de los anticuerpos 1 a 5, por ejemplo en el formato de IgG1. La competición entre los miembros de unión se puede someter a ensayo fácilmente *in vitro*, por ejemplo uniendo como marca a un miembro de unión una molécula indicadora específica que se puede detectar en presencia de otro(s) miembro(s) de unión no marcado(s), para permitir la identificación de miembros de unión que se unen al mismo epítipo o a un epítipo superpuesto. La competición se puede determinar, por ejemplo, usando el ELISA en el que se inmoviliza IL-6:sIL-6Ra a una placa y se una a la placa un primer miembro de unión marcado con marca o marcador junto con uno o más de otros miembros de unión no marcados. Como se describe en otra parte del presente documento, se puede usar hiper IL-6 para representar IL-6:IL-6Ra y/o IL-6:sIL-6Ra en ensayos tales como ELISA. Se observa la presencia de un miembro de unión no marcado que compite con el miembro de unión marcado por una disminución en la señal emitida por el miembro de unión marcado.

Por ejemplo, la presente divulgación incluye un método de identificación de un compuesto de unión a IL-6:IL-6Ra (por ejemplo un compuesto de unión a IL-6:sIL-6Ra), que comprende (i) inmovilizar IL-6:IL-6Ra, por ejemplo IL-6:sIL-6Ra, a un soporte, (ii) poner en contacto dicho IL-6:IL-6Ra inmovilizado, por ejemplo IL-6:sIL-6Ra, simultáneamente o en una manera por etapas con al menos un miembro de unión marcado con marca o marcador de acuerdo con la invención y uno o más compuestos de unión de prueba no marcados, y (iii) identificar un compuesto de unión IL-6:IL-6Ra nuevo, por ejemplo compuesto de unión IL-6:sIL-6Ra, observando una disminución en la cantidad de marca unida del miembro de unión marcado. Dichos métodos se pueden realizar en una manera de alto rendimiento usando un formato de matriz o multipocillo. Dichos ensayos también se pueden realizar en solución. Véase, por ejemplo, el documento US 5814468, el cual, como se describe anteriormente, la detección de la unión se puede

interpretar directamente por la persona que realiza el método, por ejemplo, observando visualmente un marcador detectable, o una disminución en la presencia del mismo. De forma alternativa, los métodos de unión de la invención pueden producir un informe en forma de una autorradiografía, una fotografía, una impresión de ordenador, un informe de citometría de flujo, una gráfica, un gráfico, un tubo de ensayo o recipiente o pocillo que contiene el resultado, o cualquier otra representación visual o física de un resultado del método.

Los ensayos de competición también se pueden usar en el mapeo de epítomos. En un caso, se puede usar el mapeo de epítomos para identificar el epítomo unido por el miembro de unión para IL-6:IL-6Ra (por ejemplo para IL-6:sIL-6Ra) que se puede haber optimizado opcionalmente neutralizando y/o modulando características. Dicho epítomo puede ser lineal o conformacional. Un epítomo conformacional puede comprender al menos dos fragmentos diferentes de IL-6:IL-6Ra (por ejemplo de IL-6:sIL-6Ra), en el que dichos fragmentos están posicionados en proximidad entre sí en el complejo para formar un epítomo conformacional que se reconoce por un inhibidor de IL-6:IL-6Ra (por ejemplo IL-6:sIL-6Ra), tal como un miembro de unión-IL-6:IL-6Ra (por ejemplo un miembro de unión - IL-6:sIL-6Ra). En la pruebas para determinar la competición, se puede emplear un fragmento peptídico del antígeno, en especial un péptido que incluye o que consiste esencialmente en un epítomo de interés. Se puede usar un péptido que tiene la secuencia peptídica más uno o más aminoácidos en cualquier extremo. Los miembros de unión de acuerdo con la presente divulgación pueden ser tales que su unión al antígeno se inhiba por un péptido con o que incluye la secuencia dada.

La presente invención divulga además un ácido nucleico aislado que codifica un miembro de unión de la presente invención. El ácido nucleico puede incluir ADN y/o ARN. En uno, la presente invención divulga un ácido nucleico que codifica una CDR o un conjunto de CDR o dominio VH o dominio VL o sitio de unión a antígeno de anticuerpo o molécula de anticuerpo, por ejemplo scFv o IgG1, de la invención como se define anteriormente.

La presente invención también divulga construcciones en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o expresión que comprenden al menos un polinucleótido como anteriormente.

La presente invención también divulga una célula huésped recombinante que comprende una o más construcciones como anteriormente. Un ácido nucleico que codifica cualquier CDR o conjunto de CDR o dominio VH o dominio VL o sitio de unión a antígeno de anticuerpo o molécula de anticuerpo, por ejemplo scFv o IgG1 como se proporciona, forma él mismo un aspecto de la presente invención, al igual que un método de producción del producto codificado, método que comprende la expresión del ácido nucleico que lo codifica. La expresión se puede lograr de forma conveniente cultivando en condiciones apropiadas células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión, un dominio VH o VL, o miembro de unión se puede aislar y/o purificar usando cualquier técnica adecuada, usada después según sea apropiada.

El ácido nucleico de acuerdo con la presente divulgación puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos como se describe en el presente documento engloba una molécula de ADN con la secuencia especificada y engloba una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que U se sustituye por T, a menos que el contexto requiera otra manera.

Otro aspecto más divulga un método de producción de un dominio variable VH de anticuerpo, incluyendo el método provocar la expresión del ácido nucleico codificante. Dicho método puede comprender cultivar células huésped en condiciones para la producción de dicho dominio variable VH de anticuerpo.

Se proporcionan métodos análogos para la producción de dominios variables VL y miembros de unión que comprenden un dominio VH y/o VL como otros aspectos de la presente divulgación.

Un método de producción puede comprender una etapa de aislamiento y/o purificación del producto. Un método de producción puede comprender formular el producto en una composición incluyendo al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células huésped diferentes son bien conocidos. Las células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células vegetales, hongos filamentosos, levaduras y sistemas de baculovirus y plantas y animales transgénicos. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en células procariotas está bien establecida en la técnica. Para una revisión, véase, por ejemplo, Plückerthun [62]. Un huésped bacteriano común es *E. coli*.

La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la técnica como opción para la producción de un miembro de unión [63, 64, 65]. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de cría de hámster, células de melanoma de ratón NS0, células de mieloma de rata YB2/0, células de riñón embrionario humano, células de retina embrionaria humana y muchas otras.

Los vectores adecuados se pueden elegir o construir para que contengan secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias

potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias, según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, por ejemplo, fagémido, o vírico por ejemplo 'fago, según sea apropiado [66]. Muchas técnicas conocidas y protocolos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en Ausubel *et al.* [67].

Otro aspecto de la presente invención divulga una célula huésped que contiene ácido nucleico como se divulga en el presente documento. Dicha célula huésped puede estar *in vitro* y puede estar en cultivo. Dicha célula huésped puede estar *in vivo*. La presencia *in vivo* de la célula huésped puede permitir la expresión intracelular de los miembros de unión de la presente invención como "intracuerpos" o anticuerpos intracelulares. Los Intracuerpos se pueden usar para tratamiento génico.

Otro aspecto adicional divulga un método que comprende introducir ácido nucleico de la invención en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección de fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección y transducción mediada por liposomas usando retrovirus u otro virus, por ejemplo vaccinia o, para células de insecto, baculovirus. La introducción de ácido nucleico en la célula huésped, en particular una célula eucariota puede usar un sistema basado en plásmido o vírico. El sistema plasmídico se puede mantener episomalmente o se puede incorporar en la célula huésped o en un cromosoma artificial. La incorporación puede ser por integración aleatoria o bien dirigida de una o más copias en un único locus o múltiples locus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección usando bacteriófagos.

La introducción se puede seguir provocando o permitiendo la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando células huésped en condiciones para la expresión del gen. La purificación del producto expresado se puede lograr por métodos conocidos para un experto en la técnica.

El ácido nucleico de la invención se puede integrar en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula huésped. La integración se puede promover por la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar.

La presente invención también divulga un método que comprende el uso de una construcción como se establece anteriormente en un sistema de expresión para expresar un miembro de unión o polipéptido como anteriormente.

Existen pruebas de la implicación de la IL-6 en una variedad de trastornos, como se analiza en otra parte del presente documento. Por lo tanto, los miembros de unión de la presente invención se pueden usar en un método de diagnóstico o tratamiento de un trastorno asociado con IL-6. Dicho trastorno puede ser, por ejemplo, un trastorno inflamatorio y/o autoinmunitario tal como por ejemplo, artritis reumatoide, artrosis, caquexia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, a idiopática juvenil, asma, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn o aterosclerosis. También se puede usar un miembro de unión de la presente invención para tratar un trastorno tal como a tumor y/o cáncer.

De este modo, se puede usar al menos un miembro de unión de la presente invención para modular o tratar al menos una enfermedad relacionada con IL-6, en un paciente, animal, órgano, tejido o célula, incluyendo, pero sin limitarse a:

(1) (el aparato respiratorio) enfermedades obstructivas de las vías incluyendo enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD); asma, tal como asma bronquial, alérgica, intrínseca, extrínseca y por alergia al polvo, en particular asma crónica o inveterada (por ejemplo asma tardía y hiperreactividad de las vías respiratorias); bronquitis; rinitis aguda, alérgica, atrófica y rinitis crónica incluyendo rinitis caseosa, rinitis hipertrófica, rinitis purulenta, rinitis seca y rinitis medicamentosa; rinitis membranosa incluyendo rinitis crupal, fibrinosa y pseudomembranosa y rinitis escrofulosa; rinitis estacional incluyendo rinitis nerviosa (fiebre del heno) y rinitis vasomotora, sinusitis, fibrosis pulmonar idiopática (IPF); sarcoidosis, pulmón de granjero y enfermedades relacionadas, síndrome de dificultad respiratoria en adultos, neumonitis por hipersensibilidad, neumonía intersticial idiopática y fibrosis pulmonar;

(2) (huesos y articulaciones) artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, artritis juvenil de aparición sistémica, espondiloartropatías seronegativas (incluyendo espondilitis anquilosante, artritis psoriásica y enfermedad de Reiter), enfermedad de Behcet, síndrome de Sjogren y esclerosis sistémica, gota, osteoporosis y artrosis;

(3) (piel) psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis de contacto y otras dermatosis eczematosas, dermatitis de contacto alérgica, dermatitis seborreica, liquen plano, escleroderma, pénfigo, penfigoide ampolloso, epidermólisis ampollosa, urticaria, angiodermas, vasculitis, eritemas, eosinofilia cutánea, uveítis, alopecia en áreas, conjuntivitis alérgica y conjuntivitis primaveral;

(4) (tubo gastrointestinal) úlcera gástrica, enfermedad celíaca, proctitis, gastroenteritis eosinofílica, mastocitosis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome antifosfolípido), alergias relacionadas con alimentos que tienen efectos lejos del intestino, por ejemplo, migraña, rinitis y eccema;

(5) (otros tejidos y enfermedad sistémica) caquexia, esclerosis múltiple, aterosclerosis, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida), glomerulonefritis proliferativa mesangial, síndrome nefrótico, nefritis, nefritis glomerular, insuficiencia renal aguda, hemodiálisis, uremia, lupus eritematoso localizado o discoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Castleman, tiroiditis de Hashimoto, miastenia grave, diabetes de tipo I, diabetes insulinoresistente de tipo B, anemia drepanocítica, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, síndrome nefrítico, fascitis eosinofílica, síndrome hiper-IgE, vasculitis sistémica/granulomatosis de Wegener, orquitis/procedimientos de reversión de vasectomía, lepra lepromatosa, hepatitis inducida por alcohol, síndrome de Sézary y púrpura idiopática trombocitopénica; adhesiones postoperatorias, nefrosis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, síndrome de sepsis, sepsis grampositiva, sepsis gramnegativa, sepsis negativa para cultivo, sepsis fúngica, fiebre neutropénica, pancreatitis aguda, urosepsis, enfermedad de Graves, enfermedad de Raynaud, citotoxicidad mediada por anticuerpo, reacciones de hipersensibilidad de tipo III, síndrome de POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammopatía monoclonal, y síndrome de cambios cutáneos), enfermedad mixta del tejido conjuntivo, enfermedad de Addison idiopática, diabetes mellitus, hepatitis activa crónica, cirrosis biliar primaria, vitiligo, síndrome post-MI (cardiotomía), hipersensibilidad de tipo IV, granulomas debidos a orgánulos intracelulares, enfermedad de Wilson, hemacromatosis, deficiencia de antitripsina alfa-1, retinopatía diabética, tiroiditis de Hashimoto, evaluación de del eje hipotalámico-pituitario-supradrenal, tiroiditis, encefalomiелitis, enfermedad de pulmón crónica neonatal, linfocitosis hematofagocítica familiar, alopecia, tratamiento por radiación (por ejemplo, incluyendo pero sin limitarse a astenia, anemia, caquexia, y similares), intoxicación por salicilato crónica, apnea del sueño, obesidad, insuficiencia cardíaca, y meningococemia;

(6) (rechazo de aloinjerto) agudo y crónico después de, por ejemplo, trasplante de riñón, corazón, hígado, pulmón, páncreas, médula ósea, hueso, intestino delgado, piel, cartílago y córnea; y enfermedad de injerto frente a huésped crónica;

(7) (neoplasias malignas) leucemia, leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia aguda, ALL de linfocitos T, linfocitos B1 o FAB, leucemia mielógena crónica (CML), leucemia mieloide aguda (AML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas, síndrome mielodisplásico (MDS), cualquier linfoma, enfermedad hodgkiniana, linfoma no hodgkiniano, cualquier linfoma maligno, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, carcinoma de células renales, carcinoma colorrectal, carcinoma prostático, carcinoma pancreático, carcinoma nasofaríngeo, histiocitosis maligna, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de neoplasia maligna, tumores sólidos, adenocarcinomas, sarcomas, melanoma maligno, hemangioma, enfermedad metastásica, resorción ósea relacionada con cáncer, dolor óseo relacionado con cáncer; la supresión de metástasis del cáncer; la mejora de caquexia de cáncer;

(8) Fibrosis cística, apoplejía, daño por reperfusión en el corazón, cerebro, miembros periféricos y otros órganos;

(9) Heridas por quemadura, traumatismo/hemorragia, exposición a radiación ionizante, úlceras cutáneas crónicas;

(10) Enfermedades reproductivas (por ejemplo trastornos de ovulación, menstruación e implantación, parto prematuro, preeclampsia, endometriosis);

(11) (Infecciones) infección bacteriana aguda o crónica, procesos infecciosos o parasitarios agudos y crónicos, incluyendo infecciones bacterianas, víricas y fúngicas, infección de VIH/neuropatía por VIH, meningitis, hepatitis (A,B o C, u otra hepatitis vírica similar), artritis séptica, peritonitis, neumonía, epiglotitis, E. coli 0157:h7, síndrome urémico hemolítico/púrpura idiopática trombocitopénica, malaria, fiebre hemorrágica por dengue, leishmaniasis, lepra, síndrome de choque tóxico, miositis estreptocócica, gangrena gaseosa, micobacteria tuberculosa, micobacteria de la tuberculosis aviar-intracelular, neumonía por *Pneumocystis jirovecii*, enfermedad inflamatoria pélvica, orquitis/epididimitis, legionela, enfermedad de Lyme, gripe a, virus Epstein-Barr, síndrome hemafagocítico asociado a infección vírica, encefalitis vírica/meningitis aséptica, y similares.

En consecuencia, la invención divulga un método de tratamiento de un trastorno relacionado con IL-6, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de uno o más miembros de unión de la presente invención sólo o en un régimen terapéutico combinado con otro medicamento apropiado conocido en la técnica o descrito en el presente documento.

Las pruebas de la implicación de la IL-6 en determinados trastornos se resumen en otra parte del presente documento. Además, los datos presentados en el presente documento indican además que los miembros de unión de la invención se pueden usar para tratar dichos trastornos, incluyendo tratamiento preventivo y reducción de la gravedad de los trastornos. En consecuencia, la invención divulga un método de tratamiento o reducción de la gravedad de al menos un síntoma de cualquiera de los trastornos mencionados en el presente documento, que comprende administrar a un paciente que lo necesita una cantidad eficaz de uno o más miembros de unión de la presente invención sólo o en un régimen terapéutico combinado con otro medicamento apropiado conocido en la técnica o descrito en el presente documento de modo que se reduce la gravedad de al menos un síntoma de cualquiera de los trastornos anteriores.

Por tanto, los miembros de unión de la presente invención son útiles como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades o trastornos que implican la IL-6, por ejemplo expresión y/o actividad de IL-6, en especial expresión/actividad anómala. Un método de tratamiento puede comprender administrar una cantidad eficaz de un miembro de unión de la invención a un paciente que lo necesita, en el que se disminuye la expresión y/o actividad anómala de IL-6. Un método de tratamiento puede comprender (i) identificar un paciente que demuestra niveles o actividad anómalos de IL-6, por ejemplo usando los métodos de diagnóstico descritos anteriormente, y (ii) administrar una cantidad eficaz de un miembro de unión de la invención al paciente, en el que se disminuye la expresión y/o actividad anómala de IL-6, IL-6Ra y/o IL-6:IL-6Ra (por ejemplo IL-6:sIL-6Ra). Una cantidad eficaz es una cantidad que disminuye la expresión y/o actividad anómala de IL-6 para disminuir o reducir la gravedad de al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno particular que se trata, pero que no cura necesariamente la enfermedad o el trastorno.

La invención también divulga un método de antagonización de al menos un efecto de IL-6 que comprende poner en contacto con o administrar una cantidad eficaz de uno o más miembros de unión de la presente invención de modo que se antagonice dicho al menos un efecto de IL-6. Los efectos de IL-6 que se pueden antagonizar por los métodos de la divulgación incluyen la unión de IL-6:IL-6Ra (por ejemplo IL-6:sIL-6Ra) a su receptor gp130, y cualquier efecto posterior que surja como consecuencia de esta unión.

En consecuencia, otros aspectos de la invención divulgan métodos de tratamiento que comprenden la administración de un miembro de unión como se proporciona, composiciones farmacéuticas que comprenden dicho miembro de unión, y el uso de dicho miembro de unión en la fabricación de un medicamento para la administración, por ejemplo en un método de preparación de un medicamento o composición farmacéutica que comprende la formulación del miembro de unión con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Un excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un compuesto o una combinación de compuestos que entran en una composición farmacéutica sin provocar reacciones secundarias y que permite, por ejemplo, facilitar la administración del/de los compuesto(s) activo(s), un incremento en su vida útil y/o en su eficacia en el cuerpo, un incremento en su solubilidad en solución o si no una mejora en su conservación. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y se adaptarán por un experto en la técnica como función de la naturaleza y del modo de administración del/de los compuesto(s) activo(s) elegidos.

Normalmente, los miembros de unión de la presente invención se administrarán en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del miembro de unión. Por tanto, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención, y para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del principio activo, un excipiente, vehículo, tampón, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos para los expertos en la técnica. Dichos materiales deben ser no tóxicos y no deben interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, inhalada, intratecal, tópica, intravesicular o por inyección, como se analiza a continuación.

Las composiciones farmacéuticas para la administración oral, tal como por ejemplo moléculas de anticuerpo con un único dominio (por ejemplo "nanocuerposTM") etc., también están previstas en la presente invención. Dichas formulaciones orales pueden ser en forma de comprimido, cápsula, polvo, líquida o semi-sólida. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido, tal como gelatina o un coadyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas, en general, comprenden un vehículo líquido, tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. También se puede incluir solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glucos, tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio de la dolencia, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que esté libre de pirógenos y tenga un pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Los expertos en la técnica son bien capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer con lactato. Se pueden emplear conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos según se requiera incluyendo tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; alcohol fenólico, butílico o bencilico, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3'-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparaginas, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones de formación de sal, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEENTM, PLURONICSTM o polietilenglicol (PEG).

Los miembros de unión de la presente invención se pueden formular en formas líquida, semisólida o sólida dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la molécula y de la vía de administración. Las formulaciones pueden incluir excipientes, o combinaciones de excipientes, por ejemplo: azúcares, aminoácidos y tensioactivos. Las formulaciones líquidas pueden incluir un amplio intervalo de concentraciones de anticuerpo y pH. Las formulaciones

sólidas se pueden producir por liofilización, secado por pulverización, o secado por tecnología de fluido supercrítico, por ejemplo. Las formulaciones de los miembros de unión dependerán de la vía de administración destinada: por ejemplo, las formulaciones para la administración por vía pulmonar pueden consistir en partículas con propiedades físicas que garanticen la penetración profunda en el pulmón tras la inhalación; las formulaciones por vía tópica (por ejemplo para el tratamiento de cicatrices, por ejemplo cicatrices dérmicas) pueden incluir agentes modificadores de la viscosidad, que prolongan el tiempo que el fármaco reside en el sitio de acción. Un miembro de unión se puede preparar con un vehículo que protegerá al miembro de unión contra la liberación rápida, tal como a una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes, parches transdérmicos, y sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones son conocidos por los expertos en la técnica [68].

El tratamiento se puede dar por vía oral (tal como por ejemplo moléculas de anticuerpo con un único dominio (por ejemplo "nanocuerpos™")) por inyección (por ejemplo, por vía subcutánea, intraarticular, intravenosa, intraperitoneal, intraarterial o intramuscular), por inhalación, intratraqueal, por la vía intravesicular (instilación en la vejiga urinaria), o por vía tópica (por ejemplo intraocular, intranasal, rectal, en heridas, sobre la piel). El tratamiento se puede administrar por infusión por pulso, en particular con dosis decrecientes del miembro de unión. La vía de administración se puede determinar por las características fisicoquímicas del tratamiento, por consideraciones especiales para la enfermedad o por el requisito de optimización de la eficacia o para minimizar efectos secundarios. Una vía de administración particular es la intravenosa. Otra vía de administración de composiciones farmacéuticas de la presente invención es por vía subcutánea. Está previsto que el tratamiento no se restrinja al uso clínico. Por lo tanto, la inyección subcutánea usando un dispositivo sin aguja también es ventajoso.

Una composición se puede administrar sola o en combinación con otros tratamientos, de forma simultánea o bien secuencial dependiendo de la afección que se trate.

Se puede usar un miembro de unión de la invención como parte de un tratamiento de combinación junto con un componente medicinal adicional. Los tratamientos de combinación se pueden usar para proporcionar efectos sinérgicos significativos, en particular la combinación de un miembro de unión de la invención con uno o más de otros fármacos. Un miembro de unión de la invención se puede administrar de forma simultánea o secuencial o como una preparación combinada con otro agente o agentes terapéuticos, para el tratamiento de una o más de las afecciones enumeradas en el presente documento.

Se puede usar un miembro de unión de la invención como un quimiosensibilizador por el que se puede incrementar la eficacia terapéutica de agentes citotóxicos, y por tanto se puede proporcionar para la administración en combinación con uno o más agentes citotóxicos, de forma simultánea o bien secuencial. El miembro de unión también se puede usar como un radio sensibilizador por el que se puede mejorar la eficacia de la radiación, y por tanto se puede proporcionar para la administración en combinación con radiación, de forma simultánea o bien secuencial.

Un miembro de unión de acuerdo con la presente invención se puede proporcionar en combinación o en adición con uno o más de los siguientes agentes:

- una citocina o agonista o antagonista de la función de citocina (por ejemplo un agente que actúa en la ruta de señalización de citocinas, tal como un modulador del sistema SOCS), tal como un interferón alfa-, beta- y/o gamma; factor de crecimiento insulinoide de tipo I (IGF-1), sus receptores y proteínas de unión asociadas; interleucinas (IL), por ejemplo una o más de IL-1 a -33, y/o un antagonista o inhibidor de interleucina, tal como Anakinra; inhibidores de receptores de los miembros de la familia de interleucina o inhibidores de subunidades específicas de dichos receptores, un inhibidor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), tal como anticuerpos monoclonales anti-TNF (por ejemplo infliximab, adalimumab y/o CDP-870) y/o un antagonista de receptor de TNF, por ejemplo una molécula de inmunoglobulina (tal como etanercept) y/o un agente de bajo peso molecular, tal como pentoxifilina;

- un modulador de linfocitos B, por ejemplo un anticuerpo monoclonal que se dirige a linfocitos B (tal como CD20 (rituximab) o MRA-aIL16R) o linfocitos T (por ejemplo CTLA4-Ig, HuMax Il-15 o Abatacept);

- un modulador que inhibe la actividad de osteoclastos, por ejemplo un anticuerpo para RANKL;

- un modulador de quimiocina o de la función del receptor de quimiocina, tal como un antagonista de CCR1, CCR2, CCR2A, CCR2B, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 y CCR11 (para la familia C-C); CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 y CXCR5 y CXCR6 (para la familia C-X-C) y CX₃CR1 para la familia C-X₃-C;

- un inhibidor de metaloproteasas de matriz (MMP), es decir una o más de las estromelinas, las colagenasas y las gelatinasas así como aggrecanasa, en especial colagenasa-1 (MMP-1), colagenasa-2 (MMP-8), colagenasa-3 (MMP-13), estromelina-1 (MMP-3), estromelina-2 (MMP-10) y/o estromelina-3 (MMP-11) y/o MMP-9 y/o MMP-12, por ejemplo un agente tal como doxiciclina;

- 5 - un inhibidor de la biosíntesis de leucotrienos, inhibidor de 5-lipoxigenasa (5-LO) o antagonista de la proteína activadora de 5-lipoxigenasa (FLAP), tal como zileuton; ABT-761; fenleuton; tepoxalina; Abbott-79175; Abbott-85761; N-(5-sustituido)-tiofen-2-alquilsulfonamidas; 2,6-di-terc-butilfenolhidrazonas; metoxitetrahidropiranos tales como Zeneca ZD-2138; el compuesto SB-210661; un compuesto de 2-cianoaftaleno sustituido con piridinilo, tal como L-739,010; un compuesto de 2-cianoquinolina, tal como L-746,530; indol y/o un compuesto de quinolina, tal como MK-591, MK-886 y/o BAY x 1005;
- 10 - un agonista del receptor para leucotrienos (LT) B4, LTC4, LTD4, y LTE4, seleccionado del grupo que consiste en las fenotiazina-3-1s, tal como L-651,392; compuestos amidino, tales como CGS-25019c; benzoxalaminas, tales como ontazolast; bencenocarboximidamidas, tales como BIIL 284/260; y compuestos, tales como zafirlukast, ablukast, montelukast, pranlukast, verlukast (MK-679), RG-12525, Ro-245913, iralukast (CGP 45715A) y BAY x 7195;
- 15 - un inhibidor de fosfodiesterasa (PDE), tal como una metilxantanina, por ejemplo teofilina y/o aminofilina; y/o un inhibidor de la isoenzima PDE selectiva, por ejemplo un inhibidor de PDE4 y/o inhibidor de la isoforma PDE4D y/o un inhibidor de PDE5;
- 20 - un antagonista del receptor de tipo 1 de histamina, tal como cetirizina, loratadina, desloratadina, fexofenadina, acrivastina, terfenadina, astemizol, azelastina, levocabastina, clorfeniramina, prometazina, ciclizina, y/o mizolastina (en general, aplicado por vía oral, tópica o parenteral);
- 25 - un inhibidor de la bomba de protones (tal como omeprazol) o antagonista del receptor de tipo 2 de histamina gastroprotectora;
- 30 - un antagonista del receptor de tipo 4 de histamina;
- 35 - un agente simpaticomimético vasoconstrictor agonista del adrenerreceptor alfa-1/alfa-2, tal como propilhexedrina, fenilefrina, fenilpropanolamina, efedrina, pseudoefedrina, clorhidrato de nafazolina, clorhidrato de oximetazolina, clorhidrato de tetrahidrozolina, clorhidrato de xilometazolina, clorhidrato de tramazolina y clorhidrato de etilnorepinefrina;
- 40 - un agente anticolinérgico, por ejemplo un antagonista del receptor muscarínico (M1, M2, y M3), tal como atropina, hioscina, glucopirrolato, bromuro de ipratropio, bromuro de tiotropio, bromuro de oxitropio, pirenzepina y telenzepina;
- 45 - un agonista del beta-adrenoceptor (incluyendo beta-receptor subtipos 1-4), tal como isoprenalina, salbutamol, formoterol, salmeterol, terbutalina, orciprenalina, mesilato de bitolterol y/o pirbuterol, por ejemplo un enantiómero quiral de los mismos;
- 50 - una cromona, por ejemplo cromoglicato de sodio y/o nedocromil sodio;
- 55 - un glucocorticoide, tal como flunisolida, acetónido de triamcinolona, dipropionato de beclometasona, budesonida, propionato de fluticasona, ciclesonida, y/o furoato de mometasona;
- 60 - un agente que modula los receptores de hormona nuclear, tal como a PPAR;
- 65 - una inmunoglobulina (Ig) o preparación de Ig o un antagonista o anticuerpo que modula la función de Ig, tal como anti-IgE (por ejemplo omalizumab);
- 70 - otro agente antiinflamatorio aplicado por vía tópica o sistémica, por ejemplo talidomida o un derivado del mismo, un retinoide, ditranol y/o calcipotriol;
- 75 - combinaciones de aminosalicilatos y sulfapiridina, tal como sulfasalazina, mesalazina, balsalazida, y olsalazina; y agentes inmunomoduladores, tales como las tiopurinas; y corticosteroides, tales como budesonida;
- 80 - un agentes antibacterianos, por ejemplo un derivado de penicilina, una tetraciclina, un macrólido, una beta-lactama, una fluoroquinolona, metronidazol y/o un aminoglucósido inhalado; y/o un agente antivírico, por ejemplo acyclovir, famciclovir, valaciclovir, ganciclovir, cidofovir; amantadina, rimantadina; ribavirina; zanamavir y/o oseltamavir; un inhibidor de proteasa, tal como indinavir, nelfinavir, ritonavir y/o saquinavir; un inhibidor nucleosídico de transcriptasa inversa, tal como didanosina, lamivudina, stavudina, zalcitabina, zidovudina; un inhibidor no nucleosídico de transcriptasa inversa, tal como nevirapina, efavirenz;
- 85 - un agente cardiovascular, tal como un bloqueante del canal de calcio, bloqueante de beta-adrenoceptor, inhibidor de una enzima convertora de angiotensina (ACE), antagonista del receptor de angiotensina-2; agente de disminución de lípidos, tal como una estatina y/o fibrato; un modulador de morfología de células sanguíneas, tal como pentoxifilina; un trombolítico y/o un anticoagulante, por ejemplo un inhibidor de agregación plaquetaria;

5 - un agente del CNS, tal como un antidepresivo (tal como sertralina), fármaco anti-Parkinsoniano (tal como deprenilo, L-dopa, ropinirol, pramipexol; inhibidor de MAOB, tal como selegina y rasagilina; inhibidor de comP, tal como tasmar; inhibidor de A-2, inhibidor de la recaptación de dopamina, antagonista de NMDA, agonista de nicotina, agonista de dopamina y/o inhibidor de la óxido nítrico sintasa neuronal) y un fármaco anti-Alzheimer', tal como donepezil, rivastigmina, tacrina, inhibidor de COX-2, propentofilina o metrifonato;

10 - un agente para el tratamiento del dolor agudo o crónico, por ejemplo un analgésico de acción central o periférica, tal como un análogo opioide o derivado, carbamazepina, fenitoína, valproato de sodio, amitriptilina u otro agente antidepresivo, paracetamol, o agente antiinflamatorio no esteroideo;

- un agente anestésico local aplicado por vía parenteral o tópica (incluyendo inhalado), tal como lignocaína o un análogo de la misma;

15 - un agente anti-osteoporosis, por ejemplo un agente hormonal, tal como raloxifeno, o un bifosfonato, tal como alendronato;

20 - (i) un inhibidor de triptasa; (ii) un antagonista del factor activador plaquetario (FAP) ; (iii) un inhibidor de la enzima convertidora de interleucina (ICE); (iv) un inhibidor de IMPDH; (v) un inhibidor de la molécula de adhesión incluyendo antagonista de VLA-4; (vi) una catepsina; (vii) un inhibidor de cinasa, por ejemplo un inhibidor de tirosina cinasas (tales como Btk, Itk, Jak3 MAP los ejemplos de inhibidores pueden incluir Gefitinib, Imatinib mesilato), una serina / treonina cinasa (por ejemplo un inhibidor de MAP cinasa, tal como p38, JNK, proteína cinasas A, B y C y IKK), o una cinasa implicada en la regulación del ciclo celular (por ejemplo, una cinasa dependiente de ciclina); (viii) un inhibidor de glucosa-6 fosfato deshidrogenasa; (ix) una quinina-B.sub1. - y/o B.sub2. -antagonista de receptores; (x) un agente anti-gota, por ejemplo colchicina; (xi) un inhibidor de xantina oxidasa, por ejemplo allopurinol; (xii) un agente uricosúrico, por ejemplo probenecid, sulfipirazona, y/o benzbromarona; (xiii) un secretagogo de la hormona del crecimiento; (xiv) factor de crecimiento transformante (TGFβ); (xv) factor de crecimiento derivado r de plaquetas (PDGF); (xvi) factor de crecimiento fibroblástico, por ejemplo factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF); (xvii) factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF); (xviii) crema capsaicina; (xix) un antagonista del receptor de tachicina NK.sub1. y/o NK.sub3., tal como NKP-608C, SB-233412 (talnetant) y/o D-4418; (xx) un inhibidor de elastasa, por ejemplo UT-77 y/o ZD-0892; (xxi) un inhibidor de la enzima convertidora de TNF-alfa (TACE); (xxii) inhibidor de óxido nítrico sintasa inducida (iNOS) o (xxiii) una molécula homóloga del receptor quimiotáctica expresada en linfocitos TH2 (tal como un antagonista de CRTH2); (xxiv) un inhibidor de un P38 (xxv) agente modulador de la función de receptores tipo Toll (TLR) y (xxvi) un agente modulador de la actividad de receptores purinérgicos, tal como P2X7; (xxvii) un inhibidor de la activación del factor de transcripción, tal como NFκB, API, y/o STATS.

40 Un inhibidor puede ser específico o puede ser un inhibidor mezclado, por ejemplo un inhibidor que dirige más de una de las moléculas (por ejemplo receptores) o clases moleculares mencionadas anteriormente.

45 El miembro de unión también se podría usar en asociación con un agente quimioterápico u otro inhibidor de tirosina cinasa en coadministración o en forma de un inmunoconjugado. Los fragmentos de dicho anticuerpo también se podrían usar en anticuerpos biespecíficos obtenidos por mecanismos recombinantes o acoplamiento bioquímico y asociando después la especificidad del anticuerpo descrito anteriormente con la especificidad de otros anticuerpos que pueden reconocer otras moléculas implicadas en la actividad para la que está asociada la IL-6.

50 Para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, un miembro de unión de la invención se puede combinar con uno o más agentes, tales como agentes antiinflamatorios no esteroideos (a continuación en el presente documento AINE) incluyendo inhibidores de ciclooxigenasa no selectivos (COX)-1 / COX-2 tanto si se aplican por vía tópica o sistémica, tales como piroxicam, diclofenac, ácidos propiónicos, tales como naproxeno, flurbiprofeno, fenoprofeno, cetoprofeno e ibuprofeno, fenamatos, tales como ácido mefenámico, indometacina, sulindac, azapropazona, pirazolonas, tales como fenilbutazona, salicilatos, tales como aspirina); inhibidores de COX-2 selectivos (tales como meloxicam, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, lumarocoxib, parecoxib y etoricoxib); dadores de óxido nítrico inhibidores de la ciclooxigenasa (CINOD); glucocorticosteroides (tanto si se administran por vías tópicas, oral, intramuscular, intravenosa o intraarticular); metotrexato, leflunomida; hidroxicloroquina, d-penicilamina, auranofina u otras preparaciones de oro parenterales o orales; analgésicos; diacereína; tratamientos intraarticulares, tales como derivados de ácido hialurónico; y complementos nutricionales, tales como glucosamina.

60 Un miembro de unión de la invención también se puede usar en combinación con un agente terapéutico existente para el tratamiento de cáncer. Los agentes adecuados que se van a usar en combinación incluyen:

65 (i) fármacos antiproliferativos/antineoplásicos y combinaciones de los mismos, como se usan en oncología médica, tales como Gleevec (mesilato de imatinib), agentes alquilantes (por ejemplo cis-platino, carboplatino, ciclofosfamida, mostaza nitrogenada, melfalano, clorambucilo, busulfano y nitrosoureas); antimetabolitos (por ejemplo antifolatos, tales como fluoropirimidinas como 5-fluorouracilo y tegafur, raltitrexed, metotrexato, arabinósido de citosina, hidroxiurea, gemcitabina y paclitaxel); antibióticos antitumorales (por ejemplo antraciclinas como adriamicina,

bleomicina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarubicina, mitomicina-C, dactinomicina y mitramicina); agentes antimetabólicos (por ejemplo alcaloides de la vinca como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina y taxoides como taxol y taxotero); e inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo epipodofilotoxinas como etopósido y tenipósido, amsacrina, topotecano y camptotecinas);

5 (ii) agentes citostáticos tales como antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno y yodoxifeno), reguladores por disminución del receptor de estrógenos (por ejemplo, Fulvestrant), antiandrógenos (por ejemplo, bicalutamida, flutamida, nilutamida y acetato de ciproxerona), antagonistas de la HLHL o agonistas de la HLHL (por ejemplo, goserelina, leuporelina y buserelina), progestágenos (por ejemplo, acetato de megestrol),
10 inhibidores de aromatasas (por ejemplo como anastrozol, letrozol, vorazol y exemestano) e inhibidores de 5 α -reductasa tales como finasterida;

(iii) agentes que inhiben la invasión de células cancerosas (por ejemplo, inhibidores de metaloproteinasas como marimastato e inhibidores de la función del receptor activador del plasminógeno de la urocinasa);

15 (iv) inhibidores de la función del factor de crecimiento por ejemplo dichos inhibidores incluyen anticuerpos del factor de crecimiento, anticuerpos del receptor del factor de crecimiento (por ejemplo, el anticuerpo anti-erbB2 trastuzumab y el anticuerpo anti-erbB1 cetuximab [C225]), inhibidores de farnesiltransferasa, inhibidores de tirosina cinasas e inhibidores de serina-treonina cinasas, por ejemplo, inhibidores de la familia de tirosina cinasas del factor de crecimiento epidérmico tales como N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolín-4-amina (gefitinib, AZD1839), N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolín-4-amina (erlotinib, OSI-774) y 6-acrilamido-N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3-morfolinopropoxi)quinazolín-4-amina (CI 1033)), por ejemplo inhibidores de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas y por ejemplo, inhibidores de la familia del factor de crecimiento de hepatocitos;

25 (v) agentes antiangiogénicos, tales como los que inhiben los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular (por ejemplo el anticuerpo anti-factor de crecimiento endotelial vascular bevacizumab, compuestos, tales como los divulgados en las solicitudes de patente internacional WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 y WO 98/13354, y compuestos que funcionan por otros mecanismos (por ejemplo linomida, inhibidores de la función de integrina $\alpha\beta 3$ y angiostatina);

(vi) agentes de daño vascular, tales como combretastatina A4 y compuestos divulgados en las solicitudes de patente internacional WO 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 y WO 02/08213;

35 (vii) tratamientos antisentido, por ejemplo, los se dirigen a los objetivos mencionados anteriormente, tales como ISIS 2503, un antisentido anti-ras;

(viii) enfoques de tratamiento génico, incluyendo, por ejemplo, enfoques para reemplazar genes anómalos tales como p53 anómalo o BRCA1 o BRCA2 anómalos, GDEPT (tratamiento de enzima-profármaco dirigido por genes),
40 enfoques tales como los que usan citosina desaminasa, timidina cinasa o enzima nitrorreductasa bacteriana y enfoques para aumentar la tolerancia del paciente a la quimioterapia o la radioterapia tales como tratamiento génico de resistencia a multifármaco; y

(ix) enfoques de inmunotratamiento, incluidos, por ejemplo, enfoques *ex vivo* e *in vivo* para aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales del paciente, tales como transfección con citocinas tales como interleucina 2, interleucina 4 o factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, enfoques para disminuir la anergia de los linfocitos T, enfoques de uso de células inmunitarias transfectadas tales como células dendríticas transfectadas con citocinas, enfoques de uso de líneas celulares tumorales transfectadas con citocinas y enfoques de uso de anticuerpos antiidiotípicos.

50 Un miembro de unión de la invención y uno o más de los componentes medicinales adicionales anteriores se pueden usar en la fabricación de un medicamento. El medicamento puede ser para una administración por separado o combinada para un individuo, y en consecuencia, puede comprender el miembro de unión y el componente adicional como una preparación combinada o como preparaciones por separado. Las preparaciones por separado
55 se pueden usar para facilitar la administración por separado y secuencial o simultánea, y permite la administración de los componentes por diferentes vías, por ejemplo administración oral y parenteral.

De acuerdo con la presente invención, las composiciones proporcionadas se pueden administrar a mamíferos. La administración, normalmente, es en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo esta suficiente para mostrar beneficio para un paciente. Dicho beneficio puede ser al menos una mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la tasa y el curso temporal de administración, dependerá de la naturaleza y la gravedad de lo que se está tratando, el mamífero particular que se está tratando, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración de la composición, el tipo de miembro de unión, el método de administración, la planificación de la administración y otros factores conocidos por los médicos. La prescripción del tratamiento, por
60 ejemplo decisiones sobre la dosificación, etc, está dentro de la responsabilidad de los médicos generalistas y otros médicos y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o la progresión de una enfermedad que se está

tratando. Las dosis apropiadas de anticuerpo son bien conocidas en la técnica [69, 70]. Se pueden usar dosificaciones específicas indicadas en el presente documento en el vademécum estadounidense (2003) según sea apropiado para el tipo de medicamento que se va a administrar. Una cantidad terapéuticamente eficaz o dosis adecuada de un miembro de unión de la invención se puede determinar comparando su actividad *in vitro* y su actividad *in vivo* en un modelo animal. Los métodos de extrapolación de las dosificaciones eficaces en ratones y otros animales de prueba con relación a seres humanos son conocidos. La dosis precisa dependerá de varios factores, incluyendo si el anticuerpo es para diagnóstico, prevención o para tratamiento, el tamaño y la localización del área que se va a tratar, la naturaleza precisa del anticuerpo (por ejemplo anticuerpo completo, fragmento o diacuerpo) y la naturaleza de cualquier marcador detectable u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis de anticuerpo típica estará en el intervalo de 100 µg a 1 g para aplicaciones sistémicas, y de 1 µg a 1 mg para aplicaciones tópicas. Se puede administrar una dosis de carga mayor inicial, seguida de una o más dosis menores. Típicamente, el anticuerpo será un anticuerpo completo, por ejemplo el isotipo IgG1. Esta es una dosis para un tratamiento individual de un paciente adulto, que se puede ajustar de forma proporcional para niños y lactantes, y se puede ajustar también para otros formatos de anticuerpos en proporción al peso molecular. Los tratamientos se pueden repetir en intervalos diario, dos veces por semana, semanal o mensual, según el criterio del médico. Los tratamientos pueden ser cada de dos a cuatro semanas para administración subcutánea y cada de cuatro a ocho semanas para administración intravenosa. El tratamiento puede ser periódico, y el periodo entre administraciones es de aproximadamente dos semanas o más, por ejemplo aproximadamente tres semanas o más, aproximadamente cuatro semanas o más, o aproximadamente una vez al mes. El tratamiento se puede dar antes, y/o después de una intervención quirúrgica, y/o se puede administrar o aplicar directamente en el sitio anatómico del tratamiento quirúrgico.

Ejemplos

25 Ejemplo 1 Aislamiento de anticuerpos para el complejo de IL-6/sIL-6R humana de colecciones de presentación en fagos indiferenciados

Se llevaron a cabo selecciones en solución usando el complejo marcado con FLAG, y se capturaron usando perlas de recubiertas de estreptavidina tratadas con un anticuerpo monoclonal anti-FLAG biotinilado. La formación del complejo IL-6/sIL-6R se realizó sólo con una de las dos proteínas (ligando o receptor) que estaba marcada con FLAG. Por lo tanto, todo el complejo formado se capturaría con la misma orientación sobre perlas paramagnéticas recubiertas anti-FLAG. Para formar el complejo, siempre se le añadió un exceso de 2 veces de proteína no marcada al material marcado, para minimizar la cantidad de proteína marcada no complejada presente en la selección. A continuación, se completaron ciclos de selección posteriores usando la misma proteína marcada con FLAG en todo o bien alternando la proteína que se marcó, que a su vez alternó la orientación en la que se capturó el complejo sobre las perlas. Para minimizar el potencial para el aislamiento de anticuerpos de fago específicos para cada estreptavidina o el anticuerpo monoclonal anti FLAG, en primer lugar se deseccionaron las colecciones contra las perlas tratadas para retirar dicho fago antes de la adición del complejo. Los ScFv que se podía unir al complejo IL-6/sIL-6R y que inhibe su unión a gp130 se identificaron de las salidas de selección usando un ensayo bioquímico que implicaba la unión de gp130 a IL-6/sIL-6R unido covalentemente por medio de un enlazador (Hiper IL-6). Estos scFv neutralizantes se sometieron a prueba a continuación por ELISA de fagos para determinar la especificidad para el complejo IL-6/sIL-6R. Para determinar la especificidad, se sometieron a prueba las muestras contra los siguientes reactivos marcados con FLAG inmovilizados sobre placas recubiertas de estreptavidina con anticuerpo monoclonal anti-FLAG biotinilado: complejo IL-6, sIL-6R, IL-6/sIL-6R que consistía en ligando marcado con FLAG y receptor no marcado, complejo IL-6/sIL-6R que consistía en ligando no marcado y receptor marcado con FLAG, hiper IL-6, y placas tratadas con anticuerpo anti FLAG solas. Los clones específicos del complejo se definieron como los que se unen a hiper IL-6 y ambas formas del complejo, y no se unieron al ligando o al receptor solo. Los clones específicos del complejo se reformatearon para IgG y se reevaluaron en el ensayo bioquímico de gp130-Hiper-IL-6. También se confirmó la especificidad para el complejo y no los componentes individuales por ELISA y en un ensayo de unión soluble.

50 Ejemplo 2 Ensayo HTRF® de unión de hiper IL-6/Fc gp130 (preparaciones periplásmicas en bruto)

Se cribaron los resultados de selección de un ensayo de unión de hiper IL-6/gp130 Fc HTRF® (fluorescencia de resolución temporal homogénea) para la inhibición de la unión de hiper IL-6 marcada con FLAG HIS (expresado de forma interna HEK-EBNA) para un FC de gp130 humano recombinante (R&D systems 671-GP). El método detallado se proporciona en la sección de Materiales y métodos.

60 Ejemplo 3 Ensayo HTRF® de unión de hiper IL-6/Fc GP130 (preparaciones de scFv purificado)

Los ScFv que demostraron un efecto inhibitorio significativo como preparaciones en bruto se secuenciaron y se produjeron como preparaciones purificadas. Se sometieron a prueba estas muestras en un ensayo HTRF® para determinar la inhibición de la unión de hiper IL-6 marcada con FLAG HIS a Fc de gp130 recombinante humano. Se usó una valoración de las concentraciones de scFv con el fin de establecer la potencia de los clones medida mediante valores de CI_{50} en el ensayo. El método detallado se proporciona en Materiales y métodos. Las potencias de las valoraciones de scFv purificado en el ensayo HTRF® de unión de hiper IL-6/Fc GP130 se dan en la tabla 2

con los datos de IgG correspondientes.

Ejemplo 4 Cribado ELISA en fagos para identificar el scFv específico de complejo

- 5 Se realizó un cribado ELISA en fagos como se describe en Materiales y métodos. El ELISA para clones específicos de complejo se muestra en la tabla 1.

Tabla 1: Datos de ELISA en fagos para la identificación de clones específicos de complejo IL-6/sIL-6R del panel de scFv identificado a partir de los resultados de selección usando el ensayo de unión gp130-hiper-IL-6

Clon	Absorbancia (450 nM)					
	FLAG-IL-6	FLAG-sIL-6R	Complejo 1	Complejo 2	HIPER-IL-6	Anti-FLAG
Anticuerpo 1	0,061	0,059	0,508	0,952	1,087	0,052
Anticuerpo 2	0,074	0,083	0,823	0,992	1,023	0,052
Anticuerpo 3	0,063	0,056	0,738	0,972	1,079	0,049
Anticuerpo 4	0,062	0,167	0,781	0,991	1,052	0,053
Anticuerpo 5	0,065	0,061	0,331	0,747	0,833	0,062

- 10 Complejo 1: HIS FLAG IL-6/sIL-6R
Complejo 2: IL-6/HIS FLAG sIL-6R

Ejemplo 5 Reformateado de scFv para IgG1

- 15 Se convirtieron los clones de scFv al formato IgG por subclonación de los dominios VH y VL en vectores que expresan las cadenas pesada y ligera de anticuerpo completo, respectivamente. Se clonó el dominio VH en un vector (pEU15,1) que contenía los dominios constantes de cadena pesada humanos y elementos reguladores para expresar la cadena pesada de IgG completa en células de mamífero. De forma similar, se clonó el dominio VL en un vector (pEU4,4) para la expresión de los dominios constantes de cadena ligera humanos (lambda) y elementos reguladores para expresar la cadena ligera de IgG completa en células de mamífero. Los vectores para la expresión de cadenas pesadas y cadenas ligeras se describieron originalmente en la ref. [71]. Los vectores de tecnología de anticuerpos de Cambridge se han modificado se forma sencilla introduciendo un elemento OriP. Para obtener IgG, los vectores de expresión de IgG de cadena ligera y pesada se transfectaron en células de mamífero EBNA-HEK293. Las IgG se expresaron y segregaron en el medio. Los cultivos se agruparon y se filtraron antes de la purificación. Se purificó la IgG usando cromatografía de Protein A. Se cargan los sobrenadantes de cultivo en una columna de tamaño apropiado de Ceramic Protein A (BioSeptra) y se lava con Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 250 mM. Se eluyó IgG unida de la columna usando citrato de sodio 0,1 M (pH 3,0) y se neutralizó por la adición de Tris-HCl (pH 9,0). El material eluido se intercambió con tampón en PBS usando columnas Nap10 (Amersham, n.º 17-0854-02) y se determinó la concentración de IgG espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción basado en la secuencia de aminoácidos de la IgG [72]. Las IgG purificadas se analizaron para determinar la agregación o degradación usando SEC-HPLC y por SDS-PAGE.
- 20
- 25
- 30

Ejemplo 6 Ensayo HTRF® de unión de hiper IL-6/Fc GP130 biotinilado

- 35 Las IgG purificadas de clones positivos identificados del cribado de scFv periplásmico en bruto y scFv purificado se sometieron a prueba en un ensayo HTRF® para determinar la inhibición de la unión de hiper IL-6 marcada con FLAG HIS a Fc gp130 recombinantes humano. Este ensayo se realizó como para el scFv purificado (ejemplo 3) con las siguientes modificaciones. Se usó Fc gp130 recombinantes humano biotinilado 6 nM (10 µl/pocillo) para dar una concentración final de 1 nM de Fc gp130. Para la detección de la unión, se usaron reactivos HTRF® combinados con IgG anti-flag 2,598 nM marcado con criptato y 10,8 nM o 12 nM de estreptavidina XL^{enti} (CIS Bio International 611SAXLB) (10 µl/pocillo).
- 40

- Se incluyeron como controles en todos los ensayos una IgG contra un antígeno no pertinente y anticuerpo monoclonal anti-IL-6 (R&D systems MAB206). Los valores de % de deltaF, % de unión específica y CI₅₀ se calcularon como se describe previamente. Los valores de CI₅₀ para los clones específicos de complejo se dan en la tabla 2.
- 45

Tabla 2: Datos de potencia para scFv purificado e IgG en el ensayo de unión gp130-hiper-IL-6

Clon	Inhibición máx. (%) / CI ₅₀ (nM)	
	scFv	IgG
Anticuerpo 1	máximo 42%	654,6
Anticuerpo 2	máximo 58%	1,1

Anticuerpo 3	máximo 66%	20,8
Anticuerpo 4	máximo 36%	26,7
Anticuerpo 5	máximo 83%	0,7

*Cuando se obtuvieron curvas incompletas, el resultado se da como el % de inhibición máximo observado en la concentración de competidor más alta usada.

Ejemplo 7 Prueba de especificidad de IgG anti-complejo usando un ensayo soluble HTRF®

5 Las IgG purificadas de clones positivos identificados del cribado de scFv periplásmico en bruto y scFv purificado se sometieron a prueba en un ensayo HTRF® para determinar la unión de la unión de hiper IL-6 marcada con FLAG HIS, IL-6 marcada con FLAG HIS y sIL-6R marcada con FLAG HIS.

10 Los datos del ejemplo para la unión de IgG de clones positivos se identificaron del cribado de scFv periplásmico en bruto. Los datos mostrados en la tabla 3 se expresan como % de delta F a una concentración de IgG de 1 nM (concentración de ensayo final) y 20 nM de proteína HIS FLAG (concentración de ensayo final).

Tabla 3: Unión del IgG específica de complejo a IL-6, sIL-6R y hiper IL-6 en un ensayo soluble HTRF®

Clon	Hiper IL-6 HIS FLAG	Ligando IL-6 HIS FLAG	Receptor IL-6 soluble HIS FLAG	Ligando irrelevante HIS FLAG	Receptor irrelevante HIS FLAG
Anticuerpo 1	329	4	4	8	11
Anticuerpo 2	316	2	10	11	5
Anticuerpo 3	290	4	6	10	11
Anticuerpo 4	273	1	18	13	7
Anticuerpo 5	331	4	9	1	3

Ejemplo 8 Prueba de especificidad de IgG anti-complejo por ELISA

Se sometieron a prueba las IgG para determinar la unión específica al complejo usando ELISA como se describe en la sección de Materiales y métodos.

Tabla 4: Datos de ELISA de especificidad de IgG para el complejo IL-6/sIL-6R complejo cuando se incubó con 50 nM de proteína

Clon	Cuentas de europio					
	Ligando	Receptor	Complejo 1	Complejo 2	HIPER	No pertinente
Anticuerpo 1	2620	1344	18722	68049	161823	1364
Anticuerpo 2	2647	2448	154957	450867	344773	1831
Anticuerpo 3	2090	1421	17297	40928	96027	1745
Anticuerpo 4	2054	2000	97315	387428	310693	1602
Anticuerpo 5	1726	1504	119647	417485	382951	1681

Materiales y métodos

Reactivos clave

- Se obtuvo la IL-6 de R&D Systems (206-IL/CF)

- Se obtuvo el receptor IL-6 soluble (sIL-6R) de Peprotech (200-06R)

- Se proporcionó la IL-6 HIS FLAG por AstraZeneca (derivada de E.coli)

- Se preparó sIL-6R HIS FLAG de forma interna en Cambridge Antibody Technology (derivado de HEK-EBNA)

- Se proporcionó hiper-IL-6 (IL-6 unida covalentemente y sIL-R por medio de un enlazador) por AstraZeneca (derivado de HEK-EBNA)

- Se obtuvo gp130-Fc recombinante de R&D systems (671-GP). Se produjo gp130-Fc a partir de una secuencia de

ADN que codifica el dominio extracelular de la secuencia de gp130 humana (Hibi *et al*; Cell 63:1149-1157) condensada con la región de Fc marcada con histidina 6X carboxi-terminal de IgG1 humana por medio de un enlazador polipeptídico. Se expresó la proteína quimérica en una línea celular de mieloma de ratón NS0.

5 *Aislamiento de anticuerpos para el complejo IL-6/sIL-6R humana de colecciones de presentación en fagos indiferenciados*

Se usaron colecciones de presentación en fagos de Fv monocatenario humano indiferenciado Fv (scFv) clonadas en un vector de fagémido en el M13 de fago filamentososo para las selecciones [73, 74]. Para cada selección, se capturaron 500 µl de perlas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina (Dynal M280, 602,10) sobre un imán, después se resuspendieron en 500 µl de anticuerpo monoclonal anti-FLAG biotinilado 50 µg/ml (Sigma F9291) en solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS) pH 7,4 durante 1 h para recubrir las perlas. Se lavaron 3 veces las perlas en PBS que contenía Tween 20 al 0,05% (PBST) después se incubó en 500 µl de polvo de leche desnatada al 3% (p/v) (Premier Brands) en PBS (MPBS) durante 1 h para bloquear cualquier sitios de unión no específico.

Se diluyó una alícuota de la colección de 50 µl que contenía aproximadamente 1×10^{12} partículas de fago hasta 400 µl y se usó para volver a suspender las perlas recubiertas con anti-FLAG recuperadas de 150 µl de la solución de bloqueo. A continuación, se incubaron los fagos con las perlas en un rotor durante 1 h. Además, para algunos de los procedimientos de selección, la desección contra un exceso de 10 veces de la proteína no marcada usando para formar el complejo se incorporó junto con la etapa de desección contra las perlas paramagnéticas tratadas. A continuación, se retiraron las perlas por captura en un imán. Se añadió un volumen de 100 µl de una solución de reserva de complejo concentrada 5 veces (proteína marcada con FLAG 500 nM y proteína no marcada 1 pM) a la colección deseleccionada y se incubó durante 2 h. Se capturaron los fagos unidos al complejo marcado con FLAG incubando con los 350 µl restantes de las perlas paramagnéticas tratadas durante 15 min en un rotor. Se lavaron las perlas 5 veces en 0,9 ml de PBST para retirar las partículas de fago no unidas. A continuación, se eluyeron los fagos unidos de las perlas por incubación en 500 µl de tripsina 10 µg/ml en fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,0 durante 30 min a 37 OC. La infección de células TG-1 de E. coli con el fago eluido y el rescate de fagos para ciclos de selección posteriores se realizó esencialmente como se describe por Marks *et al* 1991 [75] usando fago colaborador de escisión de tripsina [76].

Ensayo HTRF® de unión de hiper IL-6/Fc gp130 (preparaciones periplásmicas en bruto)

Ensayo de unión de hiper IL-6/gp130 Fc HTRF® (fluorescencia de resolución temporal homogénea) para la inhibición de la unión de hiper IL-6 marcada con FLAG HIS (expresado de forma interna HEK-EBNA) para un FC de gp130 humano recombinante (R&D systems 671-GP).

Se cribaron los resultados de selección como extractos periplásmicos que contenían scFv en bruto no diluido preparados en tampón MOPS 50 mM pH 7,4, EDTA 0,5 mM y sorbitol 0,5 M. Se añadieron 10 µl de muestra de scFv en bruto a una placa de ensayo Optiplate de 384 pocillos negra Perkin Elmer 6007279). Esto se siguió por adición de Fc gp130 4 nM (10 µl/pocillo), hiper IL-6 4 nM (10 µl/pocillo) y reactivos HTRF combinados IgG anti-flag 1,732 nM marcada con criptato (CIS Bio International 61FG2KLB) y anticuerpos anti-Fc humano 20 nM marcado con XL665 (CIS Bio International 61HFCXLA). Se realizaron todas las diluciones en PBS que contenía fluoruro de potasio 0,4 M y BSA al 0,1% (tampón de ensayo). Se incubaron las placas durante 3 h a temperatura ambiente, antes de la lectura de la fluorescencia de resolución temporal a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placas EnVision (Perkin Elmer). Se analizaron los datos calculando el % de delta F y % de unión específica como se describe en la ecuación 1 y la ecuación 2.

Ecuación 1:

$$\% \text{ Delta F} = \frac{(\text{valor de proporción muestra } 665\text{nM} / 620\text{nM}) - (\text{valor de proporción control no específico } 665\text{nM}/620\text{nM})}{(\text{valor de proporción control no específico } 665\text{nM}/620\text{nM})} \times 100$$

50 Ecuación 2:

$$\% \text{ unión específica} = \frac{\% \text{ Delta F de muestra}}{\% \text{ Delta F de control de unión total}} \times 100$$

Ensayo HTRF® de unión de hiper IL-6/Fc GP130 (preparaciones de scFv purificado)

55 Ensayo HTRF® para determinar la inhibición de la unión de hiper IL-6 marcada con FLAG HIS a Fc de gp130 recombinante humano.

Se diluyeron scFv purificados 1:3 transfiriendo 15 µl de scFv purificado a 30 µl de tampón de ensayo y mezclando por pipeteo en una placa de 96 pocillos (Greiner 650201). Se llevaron a cabo diluciones secuencialmente por

duplicado 9 veces más. Se añadieron Fc GP130 3 nM (10 µl/pocillo) para dar una concentración final de 0,5nM, hiper IL-6 6 nM (10 µl/pocillo) para dar una concentración final de 1nM y reactivos HTRF combinados de IgG anti-flag 2,598 nM marcada con criptato y anticuerpo anti-Fc humano 30 nM marcado con XL665 (10 µl/pocillo) a 30 µl de valoración de scFv purificado en una placa de 96 pocillos. A continuación se transfirieron 40 µl a una Optiplate de 384 pocillos negra. Todas las diluciones se realizaron en un tampón de ensayo. Como control positivo, para la inhibición de la unión, en todos los ensayos se incluyó el complejo de ligando IL-6 humano/receptor IL-6 soluble, (IL-6 500 nM y sIL-6 R500 nM).

Se incubaron las placas durante 3 h a temperatura ambiente, antes de la lectura de la fluorescencia de resolución temporal a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placas EnVision. Se analizaron los datos calculando el % de delta F y % de unión específica como se describe en la ecuación 1 y la ecuación 2. Se determinaron los valores CI_{50} usando el programa informático GraphPad Prism por ajuste de curvas usando una ecuación logística de cuatro parámetros (ecuación 3).

Ecuación 3:

$$Y = \text{Inferior} + (\text{Superior} - \text{Inferior}) / (1 + 10^{((\text{Log}CE50 - X) * \text{ladera})})$$

X es el logaritmo de la concentración. Y es la unión específica

Y comienza en la parte inferior y va hasta la parte superior con una forma sigmoide.

Cribado ELISA en fagos para identificar el scFv específico de complejo

La producción de fagos de cultivos individuales en volúmenes de 400 µl se realizó esencialmente como se describe por Marks *et al* 1991 [75]. Los cultivos de fagos durante la noche se bloquearon por adición de 400 µl de MPBS y se incubaron durante 1 h. Los cultivos se centrifugaron en una centrífuga de Sorval RT6000D Benchtop a 3000 rpm durante 10 min. A continuación se retiraron los sobrenadantes para la prueba.

Se trató un número suficiente de placas de inmunoensayo recubiertas con estreptavidina (Abgene AB1226) con 50 µl/pocillo de anticuerpo monoclonal anti FLAG biotinilado 1 µg/ml en PBS y se incubó durante la noche (ca.16 h) a 4°C. A continuación, las placas de inmunoensayo se lavaron 3 veces con PBST. A continuación, todos los pocillos se bloquearon por adición de 300 µl de MPBS y se incubó durante 1 h. Cada placa se lavó como se describe previamente, después se trató con 50 µl/pocillo de uno de los siguientes reactivos de prueba; 0,5 µg/ml de IL-6 HIS FLAG, 1 µg/ml de sIL-6R marcado con HIS FLAG, 1,5 µg/ml de complejo de IL-6 que consiste en IL-6 HIS FLAG (0,5 µg/ml) y sIL-6R (1 µg/ml), 1,5 µg/ml de complejo de IL-6 que consiste en sIL-6R HIS FLAG (1 µg/ml) y IL-6 (0,5 µg/ml), 1,5 µg/ml de hiper IL-6, o MPBS. Se formaron complejos preincubando los reactivos juntos durante 10 min antes de la adición a las placas. A continuación, se incubaron las placas durante 1 h. Después de una etapa de lavado adicional, se añadieron 50 µl de cada sobrenadante de cultivo bloqueado a cada una de las placas tratadas de forma diferente y se incubó durante 1 h. Las placas se lavaron de nuevo antes de añadir 50 µl de anti M13 conjugado con peroxidasa de rábano picante (Amersham 27-9421-01) diluido 1 en 5000 en MPBS a todos los pocillos y se incubó durante una hora adicional. Después de la etapa de lavado final, se añadieron 50 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Sigma T0440) a todos los pocillos y se incubó durante aproximadamente 3 min. A continuación, las reacciones en todos los pocillos se detuvieron por la adición de 50 µl de H₂SO₄ 0,5 M, y se determinaron las densidades ópticas a 450 nm usando un lector de placas EnVision.

Prueba de especificidad de IgG anti-complejo usando un ensayo soluble HTRF®

Se usó una valoración de hiper IL-6 FLAG HIS, IL-6 FLAG HIS y sIL-6R FLAG HIS para establecer si la IgG se unió a cada una de estas proteínas. Se realizaron las valoraciones en tampón de ensayo (diluciones 1:3) de 160 nM. Se incluyeron ligando FLAG HIS no pertinente y receptor FLAG HIS como controles.

Se transfirieron 5 µl de cada valoración a una placa de ensayo de volumen bajo de 384 pocillos (Costar 3676). A continuación se añadió IgG 4 nM preparada de forma interna (5 µl/pocillo), seguido de 3,2 nM de IgG anti-flag marcada con XL665 (CIS Bio 61FG2XLB) y anticuerpo de anti-Fc humano 60nM marcado con criptato de europio (CIS Bio 61HFCKLB) (5 µl/pocillo). Todas las diluciones se realizaron en un tampón de ensayo.

A continuación se centrifugaron las placas de ensayo a 1000 rpm a temperatura ambiente durante 1 min y se incubaron durante 3 h a temperatura ambiente, antes de la lectura de la fluorescencia de resolución temporal a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placas EnVision.

Los datos se analizaron calculando los valores de % de Delta F para cada muestra como se describe previamente.

Prueba de especificidad de IgG anti-complejo por ELISA

Para cada anticuerpo sometido a prueba, se recubrieron placas de inmunoensayo de 96 pocillos (Nunc Maxisorp) con 50 µl/pocillo de 2 µg/ml de anticuerpo monoclonal anti-Fc humano (Jackson immunoresearch 109-005-098) en PBS durante la noche (ca.16h) a 4°C. Se lavaron las placas de inmunoensayo 3 veces usando PBST, después se bloquearon por adición de 300 µl/pocillo MPBS durante 1 h a temperatura ambiente. Después de una segunda etapa de lavado, se añadieron 2 µg/ml del anticuerpo anti-complejo en PBS a la placa a 50 µl/pocillo. Las placas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente antes de volver a lavarse como se describe previamente. Los reactivos marcados con FLAG (complejos IL-6, sIL-6R, hiper) se diluyeron hasta 50 nM en MPBS. Los complejos se prepararon usando 50 nM del componente marcado con FLAG y un exceso molar de 2 veces del componente no marcado. Se prepararon diluciones en serie de 4 veces de cada uno de los reactivos, que a continuación se añadieron a los pocillos duplicados de las placas de inmunoensayo a 50 µl/pocillo. También se prepararon los pocillos de control que contenían proteína no pertinente 50 nM (en este caso GMCSF-R murina marcada con FLAG), o MPBS solo. A continuación se incubaron las placas de inmunoensayo durante 1 h a temperatura ambiente. Después de una etapa de lavado adicional, se añadió anticuerpo monoclonal anti-FLAG biotinilado (Sigma) diluido hasta µg/ml en MPBS a todos los pocillos a 50 µl/pocillo. Se incubaron las placas durante 1 h a temperatura ambiente antes de que se volvieran a lavar las placas como antes. Se diluyó estreptavidina marcada con europio (Perkin Elmer 1244-360) hasta 100 ng/ml en tampón de ensayo Delfia (Perkin Elmer 4002-0010), se añadió a todos los pocillos a 50µl/pocillo y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. A continuación, las placas de inmunoensayo se lavaron 7 veces en tampón de lavado Delfia, que consistía en solución salina tamponada con Tris 0,05 M (NaCl - 0,138 M, KCl - 0,0027 M) Tween 20 (0,05%), pH 8,0 (a 25°C). A continuación, se añadió un volumen de 50 µl solución potenciada de Delfia (Perkin Elmer 4001-0010) a todos los pocillos. Se incubaron las placas durante 10 min antes de que se midiera la fluorescencia de resolución temporal a 620 nm usando un lector de placas EnVision.

Secuencias

Las secuencias de miembros de unión de la invención se muestran en el listado de secuencias adjunto, en el que los SEQ ID NOS corresponden como sigue:

PRT = secuencia de aminoácidos

1	Anticuerpo 1 VH nucleótido
2	Anticuerpo 1 VH aminoácido
3	Anticuerpo 1 VH CDR 1 aa
4	Anticuerpo 1 VH CDR 2 aa
5	Anticuerpo 1 VH CDR 3 aa
6	Anticuerpo 1 VL nucleótido
7	Anticuerpo 1 VL aminoácido
8	Anticuerpo 1 VL CDR 1 aa
9	Anticuerpo 1 VL CDR 2 aa
10	Anticuerpo 1 VL CDR 3 aa
11	Anticuerpo 2 VH nucleótido
12	Ab 2 VH aminoácido
13	Ab 2 VH CDR 1 aminoácido
14	Ab 2 VH CDR 2 aminoácido
15	Ab 2 VH CDR 3 aminoácido
16	Ab 2 VL nucleótido
17	Ab 2 VL aminoácido
18	Ab 2 VL CDR 1 aminoácido
19	Ab 2 VL CDR 2 aminoácido
20	Ab 2 VL CDR 3 aminoácido
21	Anticuerpo 3 VH nucleótido
22	Ab 3 VH aminoácido

ES 2 433 380 T3

23	Ab 3 VH CDR 1 aminoácido
24	Ab 3 VH CDR 2 aminoácido
25	Ab 3 VH CDR 3 aminoácido
26	Ab 3 VL nucleótido
27	Ab 3 VL aminoácido
28	Ab 3 VL CDR 1 aminoácido
29	Ab 3 VL CDR 2 aminoácido
30	Ab 3 VL CDR 3 aminoácido
31	Anticuerpo 4 VH nucleótido
32	Ab 4 VH aminoácido
33	Ab 4 VH CDR 1 aminoácido
34	Ab 4 VH CDR 2 aminoácido
35	Ab 4 VH CDR 3 aminoácido
36	Ab 4 VL nucleótido
37	Ab 4 VL aminoácido
38	Ab 4 VL CDR 1 aminoácido
39	Ab 4 VL CDR 2 aminoácido
40	Ab 4 VL CDR 3 aminoácido
41	Anticuerpo 5 VH nucleótido
42	Ab 5 VH aminoácido
43	Ab 5 VH CDR 1 aminoácido
44	Ab 5 VH CDR 2 aminoácido
45	Ab 5 VH CDR 3 aminoácido
46	Ab 5 VL nucleótido
47	Ab 5 VL aminoácido
48	Ab 5 VL CDR 1 aminoácido
49	Ab 5 VL CDR 2 aminoácido
50	Ab 5 VL CDR 3 aminoácido
51	aminoácido IL-6 humana longitud completa
52	IL-6 humana marcada HIS FLAG
53	IL-6Ra soluble (humana)
54	IL-6Ra soluble marcada FLAG HIS
55	Hiper IL-6
56	Hiper IL-6 marcada FLAG HIS
57	IL-6Ra transmembrana longitud completa (humana)
58	Aminoácido gp130 humana
59	Aminoácido IL-6 humana madura

Referencias

1 Haan y Maggos (2004) *BioCentury*, 12(5): A1-A6

5

2 Koide *et al.* (1998) *Journal of Molecular Biology*, 284: 1141-1151.

- 3 Nygren *et al.* (1997) *Current Opinion in Structural Biology*, 7: 463-469
- 4 Wess, L. In: *BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness*, 12(42), A1-A7, 2004
- 5 5 Kabat, E.A. *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 4ª Edición. US Department of Health and Human Services. 1987
- 6 Martin, A.C.R. *Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer* *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, 25 (1996), 130-133
- 10 7 Kabat, E.A. *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª edición. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington
- 15 8 Segal *et al.*, *PNAS*, 71:4298-4302, 1974
- 9 Amit *et al.*, *Science*, 233:747-753, 1986
- 10 Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917, 1987
- 20 11 Chothia *et al.*, *Nature*, 342:877- 883, 1989
- 12 Caton *et al.*, *J. Immunol.*, 144:1965-1968, 1990
- 25 13 Sharon *et al.*, *PNAS*, 87:4814-4817, 1990
- 14 Sharon *et al.*; *J. Immunol.*, 144:4863-4869, 1990
- 15 Kabat *et al.*, *J. Immunol.*, 147:1709-1719, 1991
- 30 16 Holliger y Hudson, *Nature Biotechnology* 23(9):1126-1136 2005
- 17 Kontermann, R y Dubel, S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag New York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545
- 35 18 Mendez, M. *et al.* (1997) *Nature Genet*, 15(2): 146-156
- 19 Knappik *et al.* *J. Mol. Biol.* (2000) 296, 57-86
- 20 Krebs *et al.* *Journal of Immunological Methods* 254 2001 67-84
- 40 21 Ward, E.S. *et al.*, *Nature* 341, 544-546 (1989)
- 22 McCafferty *et al.* (1990) *Nature*, 348, 552-554
- 45 23 Holt *et al.* (2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490
- 24 Bird *et al.*, *Science*, 242, 423-426, 1988
- 25 Huston *et al.*, *PNAS USA*, 85, 5879-5883, 1988
- 50 26 Holliger, P. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 6444-6448, 1993
- 27 Reiter, Y. *et al.*, *Nature Biotech*, 14, 1239-1245, 1996
- 55 28 Hu, S. *et al.*, *Cancer Res.*, 56, 3055-3061, 1996
- 29 Qui *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 25:921-929 2007
- 30 Holliger y Bohlen 1999 *Cancer and metastasis rev.* 18: 411-419
- 60 31 Holliger, P. y Winter G. *Current Opinion Biotechnol* 4, 446-949 1993
- 32 Glennie M J *et al.*, 1987 *J. Immunol.* 139, 2367-2375
- 65 33 Repp R. *et al.*, 1995 *J. Hemat.* 377-382

- 34 Staerz U. D. y Bevan M. J. 1986 PNAS 83
- 35 Suresh M. R. *et al.*, 1986 Method Enzymol. 121: 210-228
- 5 36 Merchand *et al.*, 1998 Nature Biotech. 16:677-681
- 37 Ridgeway, J. B. B. *et al.*, Protein Eng., 9, 616-621, 1996
- 10 38 Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., p. 726, 1988
- 39 Köhler and Milstein, Nature, 256:495-497, 1975
- 15 40 Wold, *et al.* Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics -Mathematics and Statistics in Chemistry (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984 (ISBN 90-277-1846-6)
- 41 Norman *et al.* Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3rd edition (abril 1998) ISBN: 0471170828
- 20 42 Kandel, Abraham & Backer, Eric. Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (mayo 11, 1995), ISBN: 0133418847
- 43 Krzanowski, Wojtek. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, N.º 22 (Paper)). Oxford University Press; (diciembre 2000), ISBN: 0198507089
- 25 44 Witten, Ian H. & Frank, Eibe. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (11 de octubre de 1999), ISBN: 1558605525
- 30 45 Denison David G. T. (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian F. M. Smith. Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (julio 2002), ISBN: 0471490369
- 46 Ghose, Arup K. y Viswanadhan, Vellarkad N.. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery. ISBN: 0-8247-0487-8
- 35 47 Chothia C. *et al.* Journal Molecular Biology (1992) 227, 799-817
- 48 Al-Lazikani, *et al.* Journal Molecular Biology (1997) 273(4), 927-948
- 40 49 Chothia, *et al.* Science, 223,755-758 (1986)
- 50 50 Whitelegg, N.R.u. y Rees, A.R (2000). Prot. Eng., 12, 815-824
- 51 Guex, N. y Peitsch, M.C. Electrophoresis (1997) 18, 2714-2723
- 45 52 Altschul *et al.* (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410
- 53 Pearson y Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448
- 50 54 Smith y Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197
- 55 55 Voet & Voet, Biochemistry, 2nd Edition, (Wiley) 1995.
- 56 Gram *et al.*, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 89:3576-3580
- 55 57 Barbas *et al.*, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 91:3809-3813
- 58 Schier *et al.*, 1996, J. Mol. Biol. 263:551-567
- 60 59 Marks *et al* Bio/Technology, 1992, 10:779-783
- 60 60 Kay, B.K., Winter, J., y McCafferty, J. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press
- 65 61 Hunter W. M. y Greenwood F. C. (1962) Nature 194:495
- 62 Pluckthun, A. Bio/Technology 9: 545-551 (1991)

- 63 Chadd HE y Chamow SM (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12: 188-194
- 5 64 Andersen DC y Krummen L (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13: 117
- 65 Larrick JW y Thomas DW (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12:411-418
- 66 Sambrook y Russell, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3ª edición*, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 10 67 Ausubel *et al.* eds., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 4ª edición 1999
- 15 68 Robinson, J. R. ed., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, Marcel Dekker, Inc., New York, 1978
- 69 Ledermann J.A. *et al.* (1991) *Int. J. Cancer* 47: 659-664
- 70 Bagshawe K.D. *et al.* (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915-922
- 20 71 Persic, L., *et al.* (1997) *Gene* 187, 9-18.
- 72 Mach *et al* *Anal. Biochem.* 200(1): 20-26, 1992
- 25 73 Vaughan, T. J., *et al.* (1996). *Nature Biotechnology* 14, 309-314.
- 74 Hutchings, C. Generation of Naive Human Antibody Libraries, in *Antibody Engineering*, R. Kontermann and S. Dubel, Editors. 2001, Springer Laboratory Manuals, Berlin. p. 93
- 30 75 Marks, J. D., *et al.* (1991). *Journal of Molecular Biology* 222, 581-597.
- 76 Kristensen, P., Winter G. (1998). *Folding and Design* 3 (5), 321-328.

Listado de secuencias

- 35 <110> AstraZeneca AB MedImmune Limited
- <120> Compuestos
- <130> 102484-1 CAT081 Complejo IL-6
- <150> US60/861,705
- 40 <151> 30/11/2006
- <160> 59
- <170> CAT versión 1.0
- <210> 1
- <211> 357
- 45 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <223> Anticuerpo 1
- <400> 1
- gagggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggggtc cctgagactc 60**
- tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct 120**
- ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtg gtggtggtag cacatactac 180**
- gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cgcgctgtat 240**
- ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc ggcagcaacg 300**
- 50 **gggtgggtctg agcctattga ctattggggc caaggggacaa tggtcaccgt ctcgagt 357**
- <210> 2
- <211> 119
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 55 <220>
- <223> Anticuerpo 1
- <400> 2


```

gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacctttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct      120
ccaggaaggg ggctggagtg ggtctcagct attagtggtta gtggtggttag cacatactac      180
gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc tagagctggg      300
agcagtggct ggtatcttga ctggttcgac ccctggggcc aggggacaat ggtcacccgc      360
tcgagt                                             366
<210> 12
<211> 122
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 2
<400> 12
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20      25      30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50      55      60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65      70      75      80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95

Ala Arg Ala Gly Ser Ser Gly Trp Tyr Leu Asp Trp Phe Asp Pro Trp
      100      105      110

10 Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
      115      120
<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Homo sapiens
15 <220>
<223> Anticuerpo 2
<400> 13
Ser Tyr Ala Met Ser
      5

<210> 14
20 <211> 17
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 2
25 <400> 14
Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
      5      10      15

Gly
<210> 15
<211> 13
<212> PRT
30 <213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 2
<400> 15
Ala Gly Ser Ser Gly Trp Tyr Leu Asp Trp Phe Asp Pro
      5      10

```

<210> 16
 <211> 342
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 5 <220>
 <223> Anticuerpo 2
 <400> 16
 caggctgtgc tgaactcagcc gtcctcagtg tctggggccc caggacagag ggtcaccatc 60
 tcctgcgctg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtatcagcaa 120
 gttctctggaa cagcccccaa actcctcatt tatggtgaca ccaatcggcc ctcaggggctc 180
 cctgaccgat tctctggctc caagtttggc acctcagcct ccttgacat cactgggctc 240
 caagetgagg atgaggetga ttattactgc cagtcctatg acaacagcct gagtacgtca 300
 gattgggtct tcggcggggg gaccaaggtc accgtcctag gt 342
 <210> 17
 10 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 2
 15 <400> 17
 Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Ser Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln
 5 10 15
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ala Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30
 Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Asp Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Ser Lys Phe Gly Thr Ser Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Leu
 65 70 75 80
 Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Asn Ser
 85 90 95
 Leu Ser Thr Ser Asp Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val
 100 105 110
 Leu Gly
 <210> 18
 <211> 14
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> Anticuerpo 2
 <400> 18
 Ala Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
 5 10
 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 30 <223> Anticuerpo 2
 <400> 19
 Gly Asp Thr Asn Arg Pro Ser
 5
 <210> 20
 <211> 13
 35 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>

```

<223> Anticuerpo 2
<400> 20
Gln Ser Tyr Asp Asn Ser Leu Ser Thr Ser Asp Trp Val
      5                               10
<210> 21
5 <211> 366
  <212> ADN
  <213> Homo sapiens
  <220>
  <223> Anticuerpo 3
10 <400> 21
    gaggtgcagc tggttgagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc      60
    tcctgtgcag cctctggatt caccttagc agctatgccca tgagctgggt ccgccaggct      120
    ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtag cacatactac      180
    gcagactccg tgaaggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat      240
    ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtgt attactgtgc gaaagatgcc      300
    gactacgaat ttggagtggt ttatttagac ttctggggcc agggaaccct ggtcacctc      360
    tcgagt                                             366
<210> 22
<211> 122
<212> PRT
15 <213> Homo sapiens
  <220>
  <223> Anticuerpo 3
  <400> 22
  Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
      5                               10                15
  Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
      20                25                30
  Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35                40                45
  Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50                55                60
  Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
      65                70                75                80
  Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85                90                95
  Ala Lys Asp Ala Asp Tyr Glu Phe Trp Ser Gly Tyr Leu Asp Phe Trp
      100               105               110
  Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115                120
20 <210> 23
  <211> 5
  <212> PRT
  <213> Homo sapiens
  <220>
25 <223> Anticuerpo 3
  <400> 23
  Ser Tyr Ala Met Ser 5
  <210> 24
  <211> 17
30 <212> PRT
  <213> Homo sapiens
  <220>
  <223> Anticuerpo 3
  <400> 24

```

ES 2 433 380 T3

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
5 5 10 15

Gly
<210> 25
<211> 13
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 3
<400> 25

Asp	Ala	Asp	Tyr	Glu	Phe	Trp	Ser	Gly	Tyr	Leu	Asp	Phe
				5					10			

10 <210> 26
<211> 336
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<220>
15 <223> Anticuerpo 3
<400> 26

cagtctgtgt tgacgcagcc gccctcagtg tctggggccc cagggcagag ggtcaacatc 60
tctctgactg ggagcagctc caacatcggg gcaggttatg atgtacactg gtaccagcag 120
cttccaggaa cagcccccaa actcctcacc tatggtaaca acaatcggcc ctcaggggtc 180
cctgaccgat tctctggctc caagtctgga acctcagcct ccctggccat cactgggctc 240
caggctgagg atgaggetga ttattactgc cagtcctatg acagcagcct gagtggttat 300
gtcttcggga ctgggaccaa ggtcacctgc ctaggt 336

<210> 27
20 <211> 112
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 3
<400> 27

Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Gly	Ala	Pro	Gly	Gln
			5						10					15	

Arg Val Asn Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

25 Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu	Ser	Gly	Tyr	Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly
			100					105					110		

<210> 28
<211> 14
<212> PRT
30 <213> Homo sapiens
<220>
<223> Anticuerpo 3
<400> 28

Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ala	Gly	Tyr	Asp	Val	His
			5						10				

35 <210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<220>

ES 2 433 380 T3

Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu
 1 5 10 15

Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro
 20 25 30

Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr
 35 40 45

Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile
 50 55 60

Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser
 65 70 75 80

Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala
 85 90 95

Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu
 100 105 110

Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr
 115 120 125

Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln
 130 135 140

Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn
 145 150 155 160

Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu
 165 170 175

Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His
 180 185 190

Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala
 195 200 205

Leu Arg Gln Met
 210

<210> 52
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <220>
 <223> IL-6 humana marcada HIS FLAG
 <400> 52

5

ES 2 433 380 T3

Met Gly Ser Ser His His His His His His Asp Tyr Lys Asp Asp Asp
 1 5 10 15

Asp Lys His Met Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala
 20 25 30

Pro His Arg Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile
 35 40 45

Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn
 50 55 60

Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn
 65 70 75 80

Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly
 85 90 95

Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu
 100 105 110

Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu
 115 120 125

Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe
 130 135 140

Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro
 145 150 155 160

Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp
 165 170 175

Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe
 180 185 190

Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met
 195 200

- <210> 53
- <211> 358
- 5 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <220>
- <223> IL-6Ra soluble
- <400> 53

ES 2 433 380 T3

Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg
 20 25 30

Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro
 35 40 45

Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys
 50 55 60

Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg
 65 70 75 80

Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys
 85 90 95

Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val
 100 105 110

Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser
 115 120 125

Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr
 130 135 140

Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp
 145 150 155 160

Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys
 165 170 175

ES 2 433 380 T3

Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met
 180 185 190

Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe
 195 200 205

Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val
 210 215 220

Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp
 225 230 235 240

Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg
 245 250 255

Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp
 260 265 270

Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His
 275 280 285

Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser
 290 295 300

Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser
 305 310 315 320

Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr
 325 330 335

Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr
 340 345 350

Ser Leu Pro Val Gln Asp
 355

<210> 54

<211> 395

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<223> sIL-6Ra marcada FLAG HIS

<400> 54

Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10 15

ES 2 433 380 T3

Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg
 20 25 30

Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro
 35 40 45

Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys
 50 55 60

Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg
 65 70 75 80

Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys
 85 90 95

Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val
 100 105 110

Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser
 115 120 125

Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr
 130 135 140

Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp
 145 150 155 160

Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys
 165 170 175

Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met
 180 185 190

Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe
 195 200 205

Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val
 210 215 220

Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp
 225 230 235 240

Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg
 245 250 255

ES 2 433 380 T3

Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp
 260 265 270

Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His
 275 280 285

Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser
 290 295 300

Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser
 305 310 315 320

Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr
 325 330 335

Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr
 340 345 350

Ser Leu Pro Val Gln Asp Lys Gly Gly Arg Ala Asp Pro Ala Phe Leu
 355 360 365

Tyr Lys Val Val Gly Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala
 370 375 380

Ala His
 385 390 395

<210> 55
 <211> 561
 <212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>
 <223> Hiper IL-6
 <400> 55

Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg
 20 25 30

Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro
 35 40 45

Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys
 50 55 60

ES 2 433 380 T3

Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg
 65 70 75 80
 Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys
 85 90 95
 Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val
 100 105 110
 Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser
 115 120 125
 Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr
 130 135 140
 Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp
 145 150 155 160
 Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys
 165 170 175
 Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met
 180 185 190
 Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe
 195 200 205
 Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val
 210 215 220
 Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp
 225 230 235 240
 Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg
 245 250 255
 Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp
 260 265 270
 Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His
 275 280 285
 Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser
 290 295 300
 Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser

ES 2 433 380 T3

Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro
1 5 10 15

Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg
20 25 30

Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro
35 40 45

Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys
50 55 60

Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg
65 70 75 80

Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys
85 90 95

Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val
100 105 110

Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser
115 120 125

Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr
130 135 140

Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp
145 150 155 160

Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys
165 170 175

Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met
180 185 190

ES 2 433 380 T3

Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe
 195 200 205

Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val
 210 215 220

Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp
 225 230 235 240

Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg
 245 250 255

Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp
 260 265 270

Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His
 275 280 285

Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser
 290 295 300

Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser
 305 310 315 320

Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr
 325 330 335

Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr
 340 345 350

Ser Leu Pro Gly Ser Arg Arg Arg Gly Ser Cys Gly Leu Gly Gly Gly
 355 360 365

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Thr Pro Val Pro Pro Gly Glu Asp
 370 375 380

Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr Ser Ser Glu
 385 390 395 400

Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile Ser Ala Leu
 405 410 415

Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser Ser Lys Glu
 420 425 430

ES 2 433 380 T3

Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala Glu Lys Asp
 435 440 445

Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu Val Lys Ile
 450 455 460

Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr Leu Gln Asn
 465 470 475 480

Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln Met Ser Thr
 485 490 495

Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn Leu Asp Ala
 500 505 510

Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu Thr Lys Leu
 515 520 525

Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His Leu Ile Leu
 530 535 540

Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala Leu Arg Gln
 545 550 555 560

Met Lys Gly Gly Arg Ala Asp Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Gly
 565 570 575

Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ala His His His His
 580 585 590

His His His His His His
 595

<210> 57

<211> 468

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<223> IL-6Ra transmembrana longitud completa

<400> 57

Met Leu Ala Val Gly Cys Ala Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ala Ala Pro
 1 5 10 15

Gly Ala Ala Leu Ala Pro Arg Arg Cys Pro Ala Gln Glu Val Ala Arg
 20 25 30

ES 2 433 380 T3

Gly Val Leu Thr Ser Leu Pro Gly Asp Ser Val Thr Leu Thr Cys Pro
 35 40 45

Gly Val Glu Pro Glu Asp Asn Ala Thr Val His Trp Val Leu Arg Lys
 50 55 60

Pro Ala Ala Gly Ser His Pro Ser Arg Trp Ala Gly Met Gly Arg Arg
 65 70 75 80

Leu Leu Leu Arg Ser Val Gln Leu His Asp Ser Gly Asn Tyr Ser Cys
 85 90 95

Tyr Arg Ala Gly Arg Pro Ala Gly Thr Val His Leu Leu Val Asp Val
 100 105 110

Pro Pro Glu Glu Pro Gln Leu Ser Cys Phe Arg Lys Ser Pro Leu Ser
 115 120 125

Asn Val Val Cys Glu Trp Gly Pro Arg Ser Thr Pro Ser Leu Thr Thr
 130 135 140

Lys Ala Val Leu Leu Val Arg Lys Phe Gln Asn Ser Pro Ala Glu Asp
 145 150 155 160

Phe Gln Glu Pro Cys Gln Tyr Ser Gln Glu Ser Gln Lys Phe Ser Cys
 165 170 175

Gln Leu Ala Val Pro Glu Gly Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Val Ser Met
 180 185 190

Cys Val Ala Ser Ser Val Gly Ser Lys Phe Ser Lys Thr Gln Thr Phe
 195 200 205

Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val
 210 215 220

Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp
 225 230 235 240

Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg
 245 250 255

Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp
 260 265 270

ES 2 433 380 T3

Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His
 275 280 285

Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser
 290 295 300

Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser
 305 310 315 320

Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr
 325 330 335

Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn Ala Thr
 340 345 350

Ser Leu Pro Val Gln Asp Ser Ser Ser Val Pro Leu Pro Thr Phe Leu
 355 360 365

Val Ala Gly Gly Ser Leu Ala Phe Gly Thr Leu Leu Cys Ile Ala Ile
 370 375 380

Val Leu Arg Phe Lys Lys Thr Trp Lys Leu Arg Ala Leu Lys Glu Gly
 385 390 395 400

Lys Thr Ser Met His Pro Pro Tyr Ser Leu Gly Gln Leu Val Pro Glu
 405 410 415

Arg Pro Arg Pro Thr Pro Val Leu Val Pro Leu Ile Ser Pro Pro Val
 420 425 430

Ser Pro Ser Ser Leu Gly Ser Asp Asn Thr Ser Ser His Asn Arg Pro
 435 440 445

Asp Ala Arg Asp Pro Arg Ser Pro Tyr Asp Ile Ser Asn Thr Asp Tyr
 450 455 460

Phe Phe Pro Arg
 465

<210> 58

<211> 918

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<223> gp130 humano

<400> 58

ES 2 433 380 T3

Met Leu Thr Leu Gln Thr Trp Leu Val Gln Ala Leu Phe Ile Phe Leu
1 5 10 15

Thr Thr Glu Ser Thr Gly Glu Leu Leu Asp Pro Cys Gly Tyr Ile Ser
20 25 30

Pro Glu Ser Pro Val Val Gln Leu His Ser Asn Phe Thr Ala Val Cys
35 40 45

Val Leu Lys Glu Lys Cys Met Asp Tyr Phe His Val Asn Ala Asn Tyr
50 55 60

Ile Val Trp Lys Thr Asn His Phe Thr Ile Pro Lys Glu Gln Tyr Thr
65 70 75 80

Ile Ile Asn Arg Thr Ala Ser Ser Val Thr Phe Thr Asp Ile Ala Ser
85 90 95

Leu Asn Ile Gln Leu Thr Cys Asn Ile Leu Thr Phe Gly Gln Leu Glu
100 105 110

Gln Asn Val Tyr Gly Ile Thr Ile Ile Ser Gly Leu Pro Pro Glu Lys
115 120 125

Pro Lys Asn Leu Ser Cys Ile Val Asn Glu Gly Lys Lys Met Arg Cys
130 135 140

Glu Trp Asp Gly Gly Arg Glu Thr His Leu Glu Thr Asn Phe Thr Leu
145 150 155 160

Lys Ser Glu Trp Ala Thr His Lys Phe Ala Asp Cys Lys Ala Lys Arg
165 170 175

Asp Thr Pro Thr Ser Cys Thr Val Asp Tyr Ser Thr Val Tyr Phe Val
180 185 190

Asn Ile Glu Val Trp Val Glu Ala Glu Asn Ala Leu Gly Lys Val Thr
195 200 205

Ser Asp His Ile Asn Phe Asp Pro Val Tyr Lys Val Lys Pro Asn Pro
210 215 220

Pro His Asn Leu Ser Val Ile Asn Ser Glu Glu Leu Ser Ser Ile Leu
225 230 235 240

Lys Leu Thr Trp Thr Asn Pro Ser Ile Lys Ser Val Ile Ile Leu Lys

ES 2 433 380 T3

	245		250		255
Tyr Asn Ile Gln Tyr Arg Thr Lys Asp Ala Ser Thr Trp Ser Gln Ile	260		265		270
Pro Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp	275		280		285
Leu Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys Glu	290		295		300
Asp Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly Ile	305		310		315
Thr Tyr Glu Asp Arg Pro Ser Lys Ala Pro Ser Phe Trp Tyr Lys Ile	325		330		335
Asp Pro Ser His Thr Gln Gly Tyr Arg Thr Val Gln Leu Val Trp Lys	340		345		350
Thr Leu Pro Pro Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ile Leu Asp Tyr Glu Val	355		360		365
Thr Leu Thr Arg Trp Lys Ser His Leu Gln Asn Tyr Thr Val Asn Ala	370		375		380
Thr Lys Leu Thr Val Asn Leu Thr Asn Asp Arg Tyr Leu Ala Thr Leu	385		390		395
Thr Val Arg Asn Leu Val Gly Lys Ser Asp Ala Ala Val Leu Thr Ile	405		410		415
Pro Ala Cys Asp Phe Gln Ala Thr His Pro Val Met Asp Leu Lys Ala	420		425		430
Phe Pro Lys Asp Asn Met Leu Trp Val Glu Trp Thr Thr Pro Arg Glu	435		440		445
Ser Val Lys Lys Tyr Ile Leu Glu Trp Cys Val Leu Ser Asp Lys Ala	450		455		460
Pro Cys Ile Thr Asp Trp Gln Gln Glu Asp Gly Thr Val His Arg Thr	465		470		475
Tyr Leu Arg Gly Asn Leu Ala Glu Ser Lys Cys Tyr Leu Ile Thr Val	485		490		495

ES 2 433 380 T3

Thr Pro Val Tyr Ala Asp Gly Pro Gly Ser Pro Glu Ser Ile Lys Ala
 500 505 510

Tyr Leu Lys Gln Ala Pro Pro Ser Lys Gly Pro Thr Val Arg Thr Lys
 515 520 525

Lys Val Gly Lys Asn Glu Ala Val Leu Glu Trp Asp Gln Leu Pro Val
 530 535 540

Asp Val Gln Asn Gly Phe Ile Arg Asn Tyr Thr Ile Phe Tyr Arg Thr
 545 550 555 560

Ile Ile Gly Asn Glu Thr Ala Val Asn Val Asp Ser Ser His Thr Glu
 565 570 575

Tyr Thr Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Thr Leu Tyr Met Val Arg Met
 580 585 590

Ala Ala Tyr Thr Asp Glu Gly Gly Lys Asp Gly Pro Glu Phe Thr Phe
 595 600 605

Thr Thr Pro Lys Phe Ala Gln Gly Glu Ile Glu Ala Ile Val Val Pro
 610 615 620

Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu Gly Val Leu Phe Cys
 625 630 635 640

Phe Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn Val Pro
 645 650 655

Asp Pro Ser Lys Ser His Ile Ala Gln Trp Ser Pro His Thr Pro Pro
 660 665 670

Arg His Asn Phe Asn Ser Lys Asp Gln Met Tyr Ser Asp Gly Asn Phe
 675 680 685

Thr Asp Val Ser Val Val Glu Ile Glu Ala Asn Asp Lys Lys Pro Phe
 690 695 700

Pro Glu Asp Leu Lys Ser Leu Asp Leu Phe Lys Lys Glu Lys Ile Asn
 705 710 715 720

Thr Glu Gly His Ser Ser Gly Ile Gly Gly Ser Ser Cys Met Ser Ser
 725 730 735

ES 2 433 380 T3

Ser Arg Pro Ser Ile Ser Ser Ser Asp Glu Asn Glu Ser Ser Gln Asn
 740 745 750

Thr Ser Ser Thr Val Gln Tyr Ser Thr Val Val His Ser Gly Tyr Arg
 755 760 765

His Gln Val Pro Ser Val Gln Val Phe Ser Arg Ser Glu Ser Thr Gln
 770 775 780

Pro Leu Leu Asp Ser Glu Glu Arg Pro Glu Asp Leu Gln Leu Val Asp
 785 790 795 800

His Val Asp Gly Gly Asp Gly Ile Leu Pro Arg Gln Gln Tyr Phe Lys
 805 810 815

Gln Asn Cys Ser Gln His Glu Ser Ser Pro Asp Ile Ser His Phe Glu
 820 825 830

Arg Ser Lys Gln Val Ser Ser Val Asn Glu Glu Asp Phe Val Arg Leu
 835 840 845

Lys Gln Gln Ile Ser Asp His Ile Ser Gln Ser Cys Gly Ser Gly Gln
 850 855 860

Met Lys Met Phe Gln Glu Val Ser Ala Ala Asp Ala Phe Gly Pro Gly
 865 870 875 880

Thr Glu Gly Gln Val Glu Arg Phe Glu Thr Val Gly Met Glu Ala Ala
 885 890 895

Thr Asp Glu Gly Met Pro Lys Ser Tyr Leu Pro Gln Thr Val Arg Gln
 900 905 910

Gly Gly Tyr Met Pro Gln
 915

<210> 59

<211> 183

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<220>

<223> IL-6 madura

<400> 59

Val Pro Pro Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln
 1 5 10 15

ES 2 433 380 T3

Pro Leu Thr Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu
 20 25 30

Asp Gly Ile Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met
 35 40 45

Cys Glu Ser Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro
 50 55 60

Lys Met Ala Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu
 65 70 75 80

Thr Cys Leu Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr
 85 90 95

Leu Glu Tyr Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg
 100 105 110

Ala Val Gln Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys
 115 120 125

Ala Lys Asn Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala
 130 135 140

Ser Leu Leu Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met
 145 150 155 160

Thr Thr His Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Leu Arg Ala Leu Arg Gln Met
 180

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado, que se une al complejo IL-6 : IL-6Ra formado por la IL-6 y el IL-6Ra, y que no se une ni a IL-6 ni a IL-6Ra solos y que inhibe la unión del complejo IL-6:IL-6Ra a gp130, en el que el anticuerpo comprende un dominio VH de anticuerpo y un dominio VL de anticuerpo, en el que la molécula de anticuerpo comprende un conjunto de CDR, en el que el dominio VH comprende HCDR1, HCDR2, HCDR3 y una región estructural y el dominio VL comprende LCDR1, LCDR2, LCDR3 y una región estructural, en el que el conjunto de CDR se selecciona del grupo que consiste en:
- 5
- 10 a. HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3 , HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5, LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8, LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9 y LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 10;
- 15 b. HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 13, HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 14, HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 15, LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 18, LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 19 y LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 20;
- 20 c. HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 23, HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 24, HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 25, LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 28, LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 29 y LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 30;
- 25 d. HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 33, HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 34, HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 35, LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 38, LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 39 y LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 40; y
- 30 e. HCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 43, HCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 44, HCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 45, LCDR1 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 48, LCDR2 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 49 y LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 50.
- 35 2. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la molécula de anticuerpo comprende:
- un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2 y un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7; o
- 40 un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 12 y un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 17; o
- un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 22 y un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 27; o
- 45 un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 32 y un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 37; o
- un dominio VH que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 42 y un dominio VL que tiene una secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 47.
- 50
3. Un anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2 que inhibe la unión del complejo IL-6:IL-6Ra a gp130 y tiene una CI_{50} de no más de 700 nM en un ensayo de fluorescencia de resolución temporal homogénea para la inhibición de la unión del complejo IL-6:IL-6Ra a gp130, con una concentración final de 1 nM de complejo de y 1 nM de gp130.
- 55
4. Una composición que comprende un anticuerpo aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un excipiente farmacéuticamente aceptable para su uso en un método de tratamiento del cuerpo humano o de animal por intervención quirúrgica o tratamiento.
- 60
5. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en el tratamiento de un trastorno asociado con la IL-6 en un individuo, en el que el trastorno asociado con la IL-6 se selecciona de entre: una enfermedad inflamatoria y/o autoinmunitaria, un tumor y/o un cáncer, un trastorno linfoproliferativo, rechazo de aloinjerto, caquexia, osteoporosis, traumatismo cerebral, edema cerebral, depresión, insuficiencia cardíaca congestiva o dolor óseo.
- 65
6. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo,

de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

7. Una célula huésped transformada *in vitro* con ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6.

5 8. Un método de producción de un anticuerpo, que comprende cultivar células huésped de acuerdo con la reivindicación 7 en condiciones para la producción del anticuerpo.

9. Un método de acuerdo con la reivindicación 8, que comprende además aislar y/o purificar el anticuerpo.

10 10. Un método de acuerdo con la reivindicación 8 o 9, que comprende además formular el anticuerpo en una composición que comprende al menos un componente adicional.