

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 525 325**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2006 E 06820403 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.09.2014 EP 1960430**

54 Título: **Moléculas de anticuerpo que tienen especificidad por la IL-6 humana**

30 Prioridad:

09.12.2005 US 748926 P

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

22.12.2014

73 Titular/es:

**UCB PHARMA S.A. (100.0%)
Allée de la Recherche 60
1070 Bruxelles , BE**

72 Inventor/es:

**GELINAS, RICHARD, EVAN;
SINGHAL, MITRA, CHOUDHURY;
ZHANG, YI;
POPPLEWELL, ANDREW, GEORGE y
ADAMS, RALPH**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 525 325 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

Moléculas de anticuerpo que tienen especificidad por la IL-6 humana

La presente invención se refiere a moléculas de anticuerpo que tienen especificidad por determinantes antigénicos de la IL-6. La presente invención se refiere también a los usos terapéuticos de las moléculas de anticuerpo y a métodos para producir las moléculas de anticuerpo.

La IL-6 es una citoquina multifuncional pleiotrópica producida por una variedad de tipos de células. Originalmente se identificó como un factor de diferenciación de linfocitos B (BSF-2) que inducía la mutación final de linfocitos B en células que producían anticuerpos (Hirano et al., 1986 *Nature* 324, 73-76). Se ha mostrado que la IL-6 tiene una función central en la regulación inmunitaria, inflamación, hematopoyesis y oncogénesis. Dentro del sistema inmunitario, la IL-6 induce la producción de anticuerpos de linfocitos B aumentando la cantidad de inmunoglobulina policlonal. También induce la expresión del receptor de interleuquina-2 (IL-2) en linfocitos T (Nomo et al., 1987, *Immunol. letters*, 15, 3, 249-253) y promueve la producción de IL-2 en linfocitos T activados induciendo así tanto el crecimiento como la diferenciación de linfocitos T citotóxicos (Okada et al., 1988 *J. Immunol.*, 141, 5, 1543-1549). También se sabe que la IL-6 determina la diferenciación de monocitos en macrófagos (Chomarat P et al., 2000 *Nature Immunol.*, 6, 510-514).

La función de la IL-6 no está restringida a la respuesta inmunitaria ya que actúa en la hematopoyesis, trombopoyesis, formación de osteoclastos, producción de respuesta hepática en fase aguda que da como resultado el aumento de la proteína C reactiva (CRP) y proteína amiloide sérica (SAA). Se sabe que es un factor de crecimiento para queratinocitos epidérmicos, células mesangiales renales, mieloma y células plasmacitoides (Grossman et al., 1989 *Prot. Natl. Acad. Sci.*, 86, (16) 6367-6371; Horii et al., 1989, *J. Immunol.*, 143, 12, 3949-3955; Kawano et al., 1988, *Nature* 332, 6159, 83-85). La IL-6 es producida por una amplia variedad de tipos de células incluyendo monocitos/macrófagos, fibroblastos, queratinocitos epidérmicos, células endoteliales vasculares, células mensajales renales, células gliales, condrocitos, linfocitos T y B y algunas células tumorales (Akira et al., 1990, *FASEB J.*, 4, 11, 2860-2867). Excepto por las células tumorales que producen de forma constitutiva IL-6, las células normales no expresan IL-6 salvo que se estimulen de forma adecuada.

La IL-6 es una glicoproteína, una molécula de 184 aminoácidos con un peso molecular de 21 a 28 kD dependiendo de las modificaciones postraduccionales. Las variantes de corte y empalme alternativas se encuentran en algunos tipos de células (Kishimoto et al., 1995, *Blood*, 86, 4, 1243-1254). El complejo del receptor de IL-6 (IL-6R) está compuesto de dos proteínas de membrana de diferente funcionalidad, una cadena de unión específica a IL-6 de 80 kD (gp80) y una cadena de transducción de señal de 130 kD (gp130). Aunque la IL-6 no puede unirse directamente a gp130, se puede unir al IL-6R para generar un complejo ternario de alta afinidad de IL-6/IL-6R/gp130. El IL-6R se une a la IL-6 con baja afinidad, sin embargo el IL-6R no tiene un dominio de transducción de señal intracelular, por consiguiente, esta unión sola no conduce a la activación celular. De forma similar, la expresión de superficie celular del IL-6R no significa que la célula responda a la estimulación por la IL-6. La escisión proteolítica conduce a la liberación de IL-6R soluble (sIL-6R; sgp80) que se puede unir a la IL-6 en la circulación y aumentar la semivida de la IL-6. Para la activación celular, la IL-6 primero se une a la célula unida al IL-6R o sIL-6R; el complejo heterodímero IL-6/IL-6R se asocia entonces con la glicoproteína de superficie celular gp130. El heterocomplejo tripartito resultante se une a otro IL-6/IL-6R/gp130 y resulta la transducción de señales (Bravo y Heath 2000, *EMBO J.*, 19, (11), 2399-2411; Boulanger et al., 2003, *Science*, 300, 5628, 2101-2104), de modo que tanto el IL-6R unido a célula como el soluble contribuyen a la activación celular. La señalización de IL-6 a través del IL-6R unido a célula se ha denominado señalización cis, mientras que la activación celular a través de IL-6R soluble se ha descrito como señalización trans. Las células que expresan gp130 pero no IL-6R pueden ser estimuladas por la IL-6 a través del sIL-6R.

Los anticuerpos murinos neutralizantes contra IL-6 humana se sabe que pueden interferir con la unión de la IL-6 humana al IL-6R (sitio 1) o a gp130 (sitios 2 y 3) (Kalai et al., 1997, *Eur. J. Biochem.* 249, 690-700; Brakenhoff et al., 1990, *Journal of Immunology*, 145, 561-568; Wendling et al., 1993, *Journal of Rheumatology*, 29, 259-262).

La patente de EE.UU. n° 5.856.135 describen anticuerpos humanos remodelados contra IL-6 humana que bloquean la unión de la IL-6 al IL-6R. Estos anticuerpos se obtuvieron de un anticuerpo monoclonal de ratón SK2 en el que se trasplantan regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la región variable del anticuerpo de ratón SK2 a las regiones variables de un anticuerpo humano.

También son conocidos auto-anticuerpos humanos neutralizantes contra IL-6 (Hansen et al, *Eur. J. Immunol.*, 1995, 25, 348-354).

Se ha descrito un anticuerpo quimérico murino/humano anti-IL6 del sitio I en el documento WO2004039826 para usar en terapia.

Un anticuerpo monoclonal humanizado anti-receptor de IL-6 humana está en ensayos clínicos en fase III para el tratamiento de la artritis reumatoide (Kishimoto, 2005, *Annu. Rev. Immunol.* 23:1-21). También se ha informado que el mismo anticuerpo es eficaz en el estudio en fase II de la enfermedad de Crohn. La eficacia también se ha demostrado tanto con los anticuerpos anti-IL-6 como los anti-IL-6R en la enfermedad similar a lupus en ratones

- 5 NZB/W F₁ (Fink et al., 1994 *J. Clin. Invest.* 94, 585; Mihara et al., 1998, *Clin. Exp. Immunol.* 112,397). Un anticuerpo neutralizante contra el receptor de IL-6 murino suprimía la colitis en un modelo de transferencia adoptiva de enfermedad (Yamamoto et al., 2000 *Journal of Immunology*, 164, 4878; Atreya et al., 2000 *Nature Med* 6, 583). El último estudio también demostraba eficacia con un anticuerpo anti-receptor en el modelo de ratón con genes de IL-10 inactivados y en el modelo de TNBS de inflamación del intestino.
- 10 Los autores de la invención ahora han identificado un anticuerpo anti-IL-6 neutralizante de alta afinidad que es particularmente eficaz in vivo, por ejemplo, en el modelo in vivo descrito en la presente memoria, en particular un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad para la IL-6 humana, que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia gH13 dada en la SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera que comprende la secuencia gL10 dada en la SEQ ID NO: 13.
- 15 Los restos de los dominios variables de anticuerpo se numeran convencionalmente según un sistema creado por Kabat et al. Este sistema está descrito por Kabat et al., 1987, en *Sequences of proteins of Immunological Interest*, US Department of Health and Human Services, NIH, USA (de aquí en adelante "Kabat et al. (cita anterior)"). Este sistema de numeración se usa en la presente memoria descriptiva excepto cuando se indica otra cosa.
- 20 Las designaciones de los residuos de Kabat no siempre se corresponden directamente con la numeración lineal de los residuos de aminoácidos. La secuencia lineal real de aminoácidos puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales que los de la numeración estricta de Kabat que corresponde a un acortamiento de un componente estructural o a una inserción en un componente estructural, ya sea región armazón o región determinante de la complementariedad (CDR), de la estructura del dominio variable básico. La numeración correcta de Kabat de los restos se puede determinar para un anticuerpo dado por alineamiento de los restos de homología en la secuencia del anticuerpo con una secuencia "estándar" numerada según Kabat.
- 25 Las CDR del dominio variable de cadena pesada están localizadas en los restos 31-35 (CDR-H1), restos 50-65 (CDR-H2) y restos 95-102 (CDR-H3) según la numeración de Kabat. Sin embargo, según Chothia (Chothia, C. y Lesk, A.M. *J. Mol. Biol.*, 196, 901-917 (1987)), el bucle equivalente a la CDR-H1 se extiende del resto 26 al resto 32. Por lo tanto, "CDR-H1", como se usa en la presente memoria, comprende los restos 26 a 35, descrito por una combinación del sistema de numeración de Kabat y la definición de bucle topológico de Chothia.
- Las CDR del dominio variable de cadena ligera están localizadas en los restos 24-34 (CDR-L1), restos 50-56 (CDR-L2) y restos 89-97 (CDR-L3) según el sistema de numeración de Kabat.
- 30 Como se usa en la presente memoria, la expresión "anticuerpo neutralizante" describe un anticuerpo que es capaz de neutralizar la actividad de señalización biológica de la IL-6, por ejemplo, bloqueando la unión de la IL-6 al receptor gp130.
- 35 Los anticuerpos para usar en la presente invención se pueden obtener usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. El polipéptido de IL-6 o las células que expresan el polipéptido, se pueden usar para producir anticuerpos que reconocen específicamente la IL-6. El polipéptido de IL-6 puede ser el polipéptido "maduro" o un fragmento biológicamente activo o derivados del mismo. Preferiblemente, el polipéptido de IL-6 es el polipéptido maduro. Los polipéptidos de IL-6 pueden prepararse mediante procedimientos muy conocidos en la técnica a partir de células huésped modificadas genéticamente que comprendan sistemas de expresión, o pueden recuperarse a partir de fuentes biológicas naturales. En la presente solicitud, el término "polipéptidos" incluye péptidos, polipéptidos y proteínas. Estos términos se utilizan de modo intercambiable, a menos que se indique lo contrario. El polipéptido de IL-6 en algunos casos, puede ser parte de una proteína mayor tal como una proteína de fusión, por ejemplo, fusionada con un marcador de afinidad. Los anticuerpos generados contra el polipéptido de IL-6 se pueden obtener, cuando es necesaria la inmunización de un animal, por administración de los polipéptidos a un animal, preferiblemente un animal no humano, usando protocolos bien conocidos y rutinarios, véase, por ejemplo, *Handbook of Experimental Immunology*, D. M. Weir (ed.), Vol 4, Blackwell Scientific Publishers, Oxford, England, 1986).
- 40 Pueden inmunizarse muchos animales de sangre caliente, tales como conejos, ratones, ratas, ovejas, vacas o cerdos. Sin embargo, en general se prefieren los ratones, conejos, cerdos y ratas.
- 45 Los anticuerpos para usar en la presente invención incluyen anticuerpos enteros y fragmentos o derivados de los mismos funcionalmente activos, y pueden ser, pero no se limitan a anticuerpos monoclonales, humanizados, totalmente humanos o quiméricos.
- 50 Pueden prepararse anticuerpos monoclonales por cualquier método conocido en la técnica, tal como la técnica de hibridoma (Kohler y Milstein, 1975, *Nature*, 256:495-497), la técnica de trioma, la técnica de hibridoma de linfocito B humano (Kozbor et al., 1983, *Immunology Today*, 4:72), y la técnica de hibridoma-EBV (Cole et al., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, p. 77-96, Alan R. Liss, Inc., 1985).
- 55 Los anticuerpos para usar en la invención también se pueden generar usando métodos de anticuerpos de un solo linfocito por clonación y expresión de los ADNc de la región variable de inmunoglobulina a partir de linfocitos individuales seleccionados para la producción de anticuerpos específicos, por ejemplo, por métodos descritos por Babcook, J. et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93(15):7843-78481; documentos WO92/02551; WO2004/051268 y solicitud de patente internacional n° WO2004/106377.

Los anticuerpos humanizados (que incluyen anticuerpos injertados con CDR) son moléculas de anticuerpos de una especie no humana que tienen una o más regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de la especie no humana y una región armazón de una molécula de inmunoglobulina humana (véase, p. ej., documentos US 5.585.089; WO91/09967). Se apreciará que puede ser necesario solo transferir restos determinantes de la especificidad de las CDR en lugar de la CDR entera (véase, por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, *Methods*, 36, 25-34). Los anticuerpos humanizados pueden comprender además opcionalmente uno o más restos armazón derivados de la especie no humana de la cual derivan las CDR.

Los anticuerpos quiméricos son aquellos anticuerpos codificados por genes de inmunoglobulinas que se han modificado genéticamente de forma que los genes de la cadena ligera y pesada están compuestos por segmentos de genes de inmunoglobulina que pertenecen a diferentes especies.

Los anticuerpos para usar en la presente invención también pueden generarse usando varios métodos de presentación en fagos conocidos en la técnica e incluyen los descritos por Brinkman et al. (en *J. Immunol. Methods*, 1995, 182: 41-50), Ames et al. (*J. Immunol. Methods*, 1995, 184:177-186), Kettleborough et al. (*Eur. J. Immunol.* 1994, 24:952-958), Persic et al. (*Gene*, 1997 187 9-18), Burton et al. (*Advances in Immunology*, 1994, 57:191-280) y documentos WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; y US 5.698.426; 5.223.409; 5.403.484; 5.580.717; 5.427.908; 5.750.753; 5.821.047; 5.571.698; 5.427.908; 5.516.637; 5.780.225; 5.658.727; 5.733.743 y 5.969.108.

Los anticuerpos totalmente humanos son aquellos anticuerpos en los que las regiones variables y las regiones constantes (cuando están presentes) tanto de las cadenas pesada como ligera, son todas de origen humano, o sustancialmente idénticas a secuencias de origen humano, no necesariamente del mismo anticuerpo. Los ejemplos de anticuerpos totalmente humanos pueden incluir anticuerpos producidos, por ejemplo, por los métodos de presentación en fagos anteriores y anticuerpos producidos por ratones, en los que los genes de la parte variable y constante de inmunoglobulina murina se han sustituido por sus homólogos humanos, p. ej., como se describe en términos generales en los documentos EP0546073 B1, US 5.545.806, US 5.569.825, US 5.625.126, US 5.633.425, US 5.661.016, US5.770.429, EP 0438474 B1 y EP0463151 B1.

Un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por la IL-6 humana, puede comprender una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende al menos una de una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-H1, una CDR que tiene una secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-H2 y una CDR que tiene una SEQ ID NO: 7 para CDR-H3.

Un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por la IL-6 humana puede comprender una cadena pesada, en donde al menos dos de CDR-H1, CDR-H2 y CDR-H3 del dominio variable de la cadena pesada se seleccionan de los siguientes: la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para CDR-H2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7 para CDR-H3. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en donde la CDR-H1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 y la CDR-H2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6. Alternativamente, el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en donde la CDR-H1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 y la CDR-H3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7, o el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en donde la CDR-H2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 y la CDR-H3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7. Con el fin de evitar dudas, se entiende que están incluidas todas las permutaciones.

Se proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por la IL-6 humana, que comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para la CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para la CDR-H2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7 para la CDR-H3.

Un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por la IL-6 humana, puede comprender una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende al menos una de una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 8 para CDR-L1, una CDR que tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9 para CDR-L2 y una CDR que tiene una SEQ ID NO: 10 para CDR-L3.

Un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por la IL-6 humana puede comprender una cadena ligera, en donde al menos dos de CDR-L1, CDR-L2 y CDR-L3 del dominio variable de la cadena ligera se seleccionan de los siguientes: la secuencia dada en la SEQ ID NO: 8 para CDR-L1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9 para CDR-L2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 10 para CDR-L3. Por ejemplo, el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en donde la CDR-L1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 8 y la CDR-L2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9. Alternativamente, el anticuerpo puede comprender una cadena ligera en donde la CDR-L1 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 8 y la CDR-L3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 10, o el anticuerpo puede comprender una cadena pesada en donde la CDR-L2 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9 y la CDR-L3 tiene la secuencia dada en la SEQ ID NO: 10. Con el fin de evitar dudas, se entiende que están incluidas todas las permutaciones.

Se proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por la IL-6 humana que comprende una cadena

ligera, en donde el dominio variable comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 8 para la CDR-L1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9 para la CDR-L2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 10 para la CDR-L3.

5 Se apreciará que se pueden hacer una o más sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos en las CDR proporcionadas por la presente invención sin alterar significativamente la capacidad del anticuerpo para unirse a la IL-6 y neutralizar la actividad de la IL-6. El efecto de cualesquiera sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos lo puede analizar fácilmente el experto en la técnica, por ejemplo usando los métodos descritos en los ejemplos para determinar la unión y neutralización de la IL-6. Por consiguiente, en un ejemplo, un anticuerpo que tiene especificidad por la IL-6 humana comprende una o más CDR seleccionadas de CDRH-1 (SEQ ID NO: 5), CDRH-2 (SEQ ID NO: 6), CDRH-3 (SEQ ID NO: 7), CDRL-1 (SEQ ID NO: 8), CDRL-2 (SEQ ID NO: 9) y CDRL-3 (SEQ ID NO: 10) en las que uno o más aminoácidos en una o más de las CDR se han sustituido por otro aminoácido.

Las moléculas de anticuerpo pueden comprender una cadena ligera complementaria o una cadena pesada complementaria, respectivamente.

15 El anticuerpo según la presente invención comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para la CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para la CDR-H2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7 para la CDR-H3, y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 8 para la CDR-L1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9 para la CDR-L2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 10 para la CDR-L3.

20 El anticuerpo que tiene especificidad por la IL-6 humana puede comprender una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 5 para la CDR-H1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 6 para la CDRH-2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 7 para la CDRH-3, y una cadena ligera en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 8 para la CDR-L1, la secuencia dada en la SEQ ID NO: 9 para la CDR-L2 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 10 para la CDR-L3, en las que uno o más aminoácidos en una o más de las CDR se han sustituido por otro aminoácido.

25 El anticuerpo puede comprender una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 o una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% con la misma.

30 "Identidad" como se usa en la presente memoria, indica que en cualquier posición particular de las secuencias alineadas, el resto de aminoácido es idéntico entre las secuencias. "Similitud", como se usa en la presente memoria, indica que en cualquier posición particular en las secuencias alineadas, el resto de aminoácido es de un tipo similar entre las secuencias. Por ejemplo, la leucina se puede sustituir por isoleucina o valina. Otros aminoácidos que pueden sustituirse a menudo uno por otro incluyen pero no se limitan a:

- fenilalanina, tirosina y triptófano (aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas);
- lisina, arginina e histidina (aminoácidos que tienen cadenas laterales básicas);
- 35 • aspartato y glutamato (aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas);
- asparagina y glutamina (aminoácidos que tienen cadenas laterales amida); y
- cisteína y metionina (aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre). Los grados de identidad y similitud se pueden calcular fácilmente (Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing. Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M., y Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, New York, 1991).

45 El anticuerpo puede comprender una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4 o una secuencia que tiene una identidad o similitud de al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% con la misma.

Un anticuerpo puede comprender una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4.

50 El anticuerpo puede comprender una cadena pesada y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 y el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%,

95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2 y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4.

5 Se describe un anticuerpo de rata, en el que el dominio variable de la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 2, y el dominio variable de la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 4. El anticuerpo de rata se denomina en la presente memoria '132E09' o el anticuerpo del "donante". La secuencia completa de nucleótidos y aminoácidos del dominio variable de la cadena pesada del anticuerpo de rata 132E09 se proporcionan en las SEQ ID NO: 1 y 2 respectivamente. La secuencia completa de nucleótidos y aminoácidos del dominio variable de la cadena ligera del anticuerpo de rata 132E09 se proporcionan en las SEQ ID NO: 3 y 4
10 respectivamente. Las CDR dadas en las SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 y 10 se obtienen del anticuerpo de rata 132E09.

Además, el anticuerpo puede ser un anticuerpo injertado con CDR. Como se usa en la presente memoria, la expresión "un anticuerpo injertado con CDR" se refiere a un anticuerpo en donde la cadena pesada y/o la cadena ligera contiene una o más CDR (incluyendo, si se desea, una o más CDR modificadas) procedentes de un anticuerpo del donante (por ejemplo, un anticuerpo de rata) injertadas en la región armazón de la región variable de una cadena pesada y/o ligera de un anticuerpo del aceptor (por ejemplo, un anticuerpo humano). Para una revisión, véase Vaughan et al, *Nature Biotechnology*, 16, 535-539, 1998. Preferiblemente, una o más de las CDR se han obtenido del anticuerpo de rata 132E09 (SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9 y 10). En una realización, en lugar de transferir la CDR entera, solo se transfieren uno o más restos determinantes de la especificidad de una cualquiera de las CDR descritas en la presente memoria antes, a la región armazón del anticuerpo humano (véase, por ejemplo, Kashmiri et al., 2005, *Methods*, 36, 25-34). En una realización, solo se transfieren los restos determinantes de la especificidad de una o más de las CDR descritas en la presente memoria antes, a la región armazón del anticuerpo humano. En otra realización, solo se transfieren los restos determinantes de la especificidad de cada una de las CDR descritas en la presente memoria antes, a la región armazón del anticuerpo humano.
15
20

Cuando se injertan las CDR o restos determinantes de la especificidad, se puede usar cualquier secuencia de la región armazón de la región variable del aceptor adecuada, teniendo en cuenta la clase/tipo del anticuerpo del donantedel cual se obtienen las CDR, incluyendo regiones armazón de rata, ratón, primate y humana. Dicho anticuerpo con CDR injertada tiene al menos un dominio variable que comprende regiones armazón del aceptor humano así como una o más de las CDR obtenidas del anticuerpos del donante como se ha referido antes. Por lo tanto, se proporciona un anticuerpo con CDR injertada neutralizante, en donde el dominio variable comprende regiones armazón de aceptor humano y CDR de donante no humano, preferiblemente de rata.
25
30

Son ejemplos de regiones armazón humanas que se pueden usar en la presente invención KOL, NEWM, REI, EU, TUR, TEI, LAY y POM (Kabat et al., véase antes). Por ejemplo, KOL y NEWM se pueden usar para la cadena pesada, REI se puede usar para la cadena ligera y EU, LAY y POM se pueden usar tanto para la cadena pesada como para la cadena ligera. Alternativamente, se pueden usar secuencias de línea germinal humana; las secuencias de esta están disponibles en: <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>
35

En un anticuerpo injertado con CDR, las cadenas pesadas y ligeras del aceptor no tienen que derivar necesariamente del mismo anticuerpo y, si se desea, pueden comprender cadenas compuestas que tienen regiones armazón derivadas de diferentes cadenas.

La región armazón preferida para la cadena pesada del anticuerpo injertado con CDR deriva de la secuencia del subgrupo humano VH3 1-4 3-72 junto con JH4 (mostrado en la figura 2; SEQ ID NO: 19 y 20). Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo injertado con CDR neutralizante que comprende al menos una CDR de donante no humano, en donde la región armazón de la cadena pesada deriva de la secuencia del subgrupo humano 1-4 3-72 junto con JH4. La secuencia de JH4 humana es como sigue: (YFDY)WGQGTLVTVSS SEQ ID NO: 20). El motivo YFDY es parte de la CDR-H3 y no es parte de la región armazón 4 (Ravetch, JV. et al., 1981, *Cell*, 27, 583-591). La secuencia del donante es la secuencia de VH 132E09 (SEQ ID NO: 2) mostrada en la figura 2 y las CDR del donante (SEQ ID NOs: 5, 6 y 7) están subrayadas.
40
45

La región armazón preferida para la cadena ligera del anticuerpo injertado con CDR deriva de la secuencia del subgrupo de la línea germinal humana VK1 2-1-(1) 012 junto con JK2 mostrada en la figura 2 (SEQ ID NO: 21 y 22). Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo injertado con CDR neutralizante que comprende al menos una CDR de donante no humano, en donde la región armazón de la cadena ligera deriva de la secuencia del subgrupo humano VK1 2-1-(1) 012 junto con JK2. La secuencia de JK2 es la siguiente: (YT)FGQGKLEIKR (SEQ ID NO: 22). El motivo YT es parte de la CDR-L3 y no es parte de la región armazón 4 (Hieter, PA., et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257, 1516-1522). La secuencia del donante es la secuencia de VL 132E09 (SEQ ID NO: 4) mostrada en la figura 2 y las CDR del donante (SEQ ID NO: 8, 9 y 10) están subrayadas.
50

También, en un anticuerpo injertado con CDR, las regiones armazón no tienen que tener necesariamente exactamente la misma secuencia que las del anticuerpo del aceptor. Por ejemplo, los restos inusuales se pueden cambiar por restos que se presentan más frecuentemente para esa clase o tipo de cadena del aceptor. Alternativamente, restos seleccionados en las regiones armazón del aceptor se pueden cambiar de modo que correspondan al resto encontrado en la misma posición en el anticuerpo del donante (véase, Reichmann et al.,
55

1998, *Nature*, 332, 323-324). Dichos cambios se deben mantener al mínimo necesario para recuperar la afinidad del anticuerpo del donante. En el documento WO 91/09967 se expone un protocolo para seleccionar restos en las regiones armazón del aceptor que puede ser necesario cambiar.

5 En una molécula de anticuerpo injertado con CDR de la presente invención, si la cadena pesada del aceptor tiene la secuencia de VH3 humana 1-4 3-72 junto con JH4, entonces, las regiones armazón del aceptor de la cadena pesada comprenden, además de una o más CDR del donante, un resto del donador en al menos la posición 49 (de acuerdo con Kabat et al., (véase antes)). Por consiguiente, se proporciona un anticuerpo injertado con CDR, en donde al menos el resto en la posición 49 del dominio variable de la cadena pesada es un resto del donante.

10 En una molécula de anticuerpo injertado con CDR según la presente invención, si la cadena ligera del aceptor tiene la secuencia del subgrupo humano VK1 2-1-(1) 012 junto con JK2, entonces no se usan restos de donante en las regiones armazón del aceptor de la cadena ligera y solo se transfieren una o más CDR del donante.

Los restos del donante son restos del anticuerpo del donante, es decir, el anticuerpo del cual se obtuvieron originalmente las CDR, que en el caso de la presente invención es el anticuerpo de rata 132E09.

15 Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo, en el que la región variable de la cadena pesada comprende la secuencia de gH13 (figura 2; SEQ ID NO: 11).

20 En una realización de la presente invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11.

Además, la presente invención proporciona un anticuerpo en el que la región variable de la cadena ligera comprende la secuencia de gL10 (figura 2; SEQ ID NO: 13).

25 En una realización de la presente invención, el anticuerpo comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 13. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 13.

30 Preferiblemente, un anticuerpo injertado con CDR según la presente invención, comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de gH13 (SEQ ID NO: 11) y una cadena ligera que comprende la secuencia de gL10 (SEQ ID NO: 13).

35 En una realización de la presente invención, anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11 y el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 13. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera, en donde el dominio variable de la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 13.

40 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención pueden comprender una molécula de anticuerpo completa que tiene las cadenas pesadas y ligeras de longitud completa o un fragmento de las mismas, y puede ser, pero no se limita a Fab, Fab modificado, Fab', F(ab')₂, Fv, anticuerpos de un solo dominio, scFv, anticuerpos bi, tri o tetra-valentes, Bis-scFv, fragmentos biespecíficos, trispecíficos, tetraespecíficos y de unión al epítipo de cualquiera de los anteriores (véase, por ejemplo, Holliger y Hudson, 2005, *Nature Biotech.* 23(9):1126-1136; Adair y Lawson, 2005, *Drug Design Reviews - Online* 2(3), 209-217). Los métodos para crear y fabricar estos fragmentos de anticuerpo son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Verma et al., 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181). Otros fragmentos de anticuerpos para usar en la presente invención incluyen los fragmentos Fab y Fab' descritos en las solicitudes de patente internacional WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171. Los anticuerpos multivalentes pueden comprender múltiples especificidades o pueden ser monoespecíficos (véase, por ejemplo, los documentos WO 92/22853 y WO05/113605).

45 Los dominios de la región constante de la molécula de anticuerpo de la presente invención, si están presentes, se pueden seleccionar considerando la función propuesta de la molécula de anticuerpo, y en particular las funciones efectoras que se pueden requerir. Por ejemplo, los dominios de la región constante pueden ser dominios de IgA, IgD, IgE, IgG o IgM humanas. En particular, se pueden utilizar los dominios de las regiones constantes de IgG humanas, especialmente los isotipos IgG1 e IgG3 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a usos terapéuticos y se requieren funciones efectoras de anticuerpos. Alternativamente, se pueden usar los isotipos IgG2 y IgG4 cuando la molécula de anticuerpo está destinada a usos terapéuticos y no se requieren funciones efectoras de

anticuerpos, p. ej. simplemente para bloquear la actividad de la IL-6. Se apreciará que también se pueden usar secuencias variantes de estos dominios de la región constante. Por ejemplo, se pueden usar moléculas de IgG en las que la serina de la posición 241 se ha cambiado por prolina, como describen Angal et al., *Molecular Immunology*, 1993, 30 (1), 105-108. Se prefiere en particular, el dominio constante de IgG4 que comprende este cambio. El experto en la técnica también entenderá que los anticuerpos pueden experimentar una variedad de modificaciones postraduccionales. El tipo y la extensión de estas modificaciones a menudo dependen de la línea celular del hospedante usada para expresar el anticuerpo, así como de las condiciones de cultivo. Dichas modificaciones pueden incluir variaciones en glicosilación, oxidación de metionina, formación de dicetopiperizina, isomerización de aspartato y desamidación de asparagina. Una modificación frecuente es la pérdida del resto básico carboxi terminal (tal como lisina o arginina) debido a la acción de carboxipeptidasas (como se describe en Harris, R.J. *Journal of Chromatography* 705:129-134, 1995). Por consiguiente, la lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo de SEQ ID NO: 16 puede estar ausente.

En una realización preferida, el anticuerpo proporcionado por la presente invención es un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por la IL-6, en el que la región constante de la cadena pesada comprende la región constante de la IgG4 humana en la que en la serina de la posición 241 se ha sustituido por prolina, como se describe en Angal et al., véase antes. Por consiguiente, la presente invención proporciona un anticuerpo en el que la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia dada en la SEQ ID NO: 16. Preferiblemente, la región constante de la cadena ligera es cKappa.

En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo en el que la cadena pesada comprende o consiste en la secuencia dada en la SEQ ID NO: 16 y la cadena ligera comprende o consiste en la secuencia dada en la SEQ ID NO: 18.

En una realización de la invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en la que la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 16. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en donde la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 16.

En una realización de la invención, el anticuerpo comprende una cadena ligera, en la que la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 18. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 18.

En una realización de la invención, el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, en donde la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 16 y la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 60% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 18. Preferiblemente, el anticuerpo comprende una cadena pesada, en donde la cadena pesada comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera, en donde la cadena ligera comprende una secuencia que tiene al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 98% de identidad o similitud con la secuencia dada en la SEQ ID NO: 18.

También se proporciona una región específica o epítipo de la IL-6 humana a la que se une un anticuerpo según la presente invención, en particular un anticuerpo que comprende una cualquiera de CDR-H1 (SEQ ID NO: 5), CDR-H2 (SEQ ID NO: 6), CDR-H3 (SEQ ID NO: 7), CDR-L1 (SEQ ID NO: 8), CDR-L2 (SEQ ID NO: 9) o CDR-L3 (SEQ ID NO: 10), por ejemplo, el anticuerpo 132E09 o anticuerpos que comprenden la secuencia de la región variable de la cadena pesada de gH13 (SEQ ID NO: 11) y/o la secuencia de la región variable de la cadena ligera de gL10 (SEQ ID NO: 13).

Esta región específica o epítipo del polipéptido de IL-6 humana se puede identificar mediante cualquier método de cartografía de epítopos adecuado conocido en la técnica, en combinación con cualquiera de los anticuerpos proporcionados por la presente invención. Los ejemplos de dichos métodos incluyen la selección de péptidos de diferentes longitudes derivados de la IL-6 según la unión al anticuerpo de la presente invención con el fragmento más pequeño que se puede unir específicamente al anticuerpo que contiene la secuencia del epítipo reconocida por el anticuerpo. Los péptidos de IL-6 se pueden producir de forma sintética o por digestión proteolítica del polipéptido de IL-6. Los péptidos que se unen al anticuerpo se pueden identificar, por ejemplo, por análisis de espectrometría de masas. En otro ejemplo, se puede usar la espectroscopía de RMN para identificar el epítipo unido por un anticuerpo de la presente invención, como se describe en los ejemplos de la presente memoria. Una vez identificado, se puede usar el fragmento epitópico al que se une el anticuerpo de la presente invención, si es necesario, como un inmunógeno para obtener anticuerpos neutralizantes adicionales que se unen al mismo epítipo.

En un ejemplo, el epítipo de la IL-6 humana unido por un anticuerpo de la presente invención, comprende al menos los restos de aminoácidos S47, C50, E93, R104, F105, E106, T149, K150, A153, Q156, Q159 y S169 de la IL-6 humana (numeración de los restos según Boulanger et al., *Science*, 300, 2101-2104). En un ejemplo, el epítipo de

la IL-6 humana unido por un anticuerpo de la presente invención, comprende los restos de aminoácidos S47, C50, E93, R104, F105, E106, T149, K150, A153, Q156, Q159 y S169 y uno más restos seleccionados de C44, S53, A58, V96, Q152, Q154, N155, W157, T163, L165, y E172.

5 En un ejemplo, el epítipo de la IL-6 humana unido por un anticuerpo de la presente invención, comprende los restos de aminoácidos C44, S47, C50, S53, A58, E93, V96, R104, F105, E106, T149, K150, Q152, A153, Q154, N155, Q156, W157, Q159, T163, L165, S169 y E172.

Un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por la IL-6 humana se puede unir a un epítipo de la IL-6 humana madura que comprende los restos de aminoácidos S47, C50, E93, R104, F105, E106, T149, K150, A153, Q156, Q159 y S169.

10 Un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por la IL-6 humana se puede unir a un epítipo de la IL-6 humana madura que comprende los restos de aminoácidos S47, C50, E93, R104, F105, E106, T149, K150, A153, Q156, Q159 y S169 y uno o más restos seleccionados de C44, S53, A58, V96, Q152, Q154, N155, W157, T163, L165, y E172

15 Un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por la IL-6 humana se puede unir a un epítipo de la IL-6 humana madura que comprende los restos de aminoácidos C44, S47, C50, S53, A58, E93, V96, R104, F105, E106, T149, K150, Q152, A153, Q154, N155, Q156, W157, Q159, T163, L165, S169 y E172.

20 Se apreciará que los restos nombrados antes también se pueden numerar basándose en la numeración de aminoácidos del precursor no procesado de la IL-6 (número de acceso en Swiss Prot P05231). Usando esta numeración, los restos numerados antes según Boulanger et al., véase antes, como C44, S47, C50, S53, A58, E93, V96, R104, F105, E106, T149, K150, Q152, A153, Q154, N155, Q156, W157, Q159, T163, L165, S169 y E172 se convierten en C72, S75, C78, S81, A86, E121, V124, R132, F133, E134, T177, K178, Q180, A181, Q182, N183, Q184, W185, Q187, T191, L193, S197 y E200 respectivamente.

Preferiblemente, un anticuerpo de la presente invención bloquea la unión del receptor gp130 al sitio 3 de la IL-6 humana.

25 Los anticuerpos que bloquean de forma cruzada la unión de los anticuerpos de la presente invención a la IL-6 pueden ser igualmente útiles en la neutralización de la actividad de la IL-6.

30 Las moléculas de anticuerpo de la presente invención, preferiblemente tienen una alta afinidad de unión por la IL-6 humana, preferiblemente picomolar. La afinidad se puede medir usando cualquier método adecuado conocido en la técnica, incluyendo BIAcore como se describe en los ejemplos de la presente memoria. Preferiblemente, la afinidad se mide usando la IL-6 humana recombinante descrita en los ejemplos de la presente memoria. Preferiblemente, una molécula de anticuerpo según la presente invención, tiene una afinidad de unión por la IL-6 humana menor de 500 pM. Preferiblemente, una molécula de anticuerpo según la presente invención, tiene una afinidad de unión por la IL-6 humana menor de 50 pM. Por consiguiente, en una realización, una molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 500 pM. En una realización, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión de entre aproximadamente 1 y aproximadamente 50 pM. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión por la IL-6 humana de entre aproximadamente 1 y 20 pM. En una realización, el anticuerpo de la presente invención tiene una afinidad de unión por la IL-6 humana de entre 8 y 12 pM. Se apreciará que la afinidad de los anticuerpos proporcionados por la presente invención se puede alterar usando cualquier método adecuado conocido en la técnica. Por lo tanto, la presente invención también se refiere a variantes de las moléculas de anticuerpo de la presente invención, que tienen una afinidad mejorada por la IL-6 humana. Dichas variantes se pueden obtener por una serie de protocolos de maduración de afinidad incluyendo la mutación de las CDR (Yang et al., *J. Mol. Biol.*, 254, 392-403, 1995), barajado de cadenas (Marks et al., *Bio/Technology*, 10, 779-783, 1992), el uso de cepas mutantes de *E. coli* (Low et al., *J. Mol. Biol.*, 250, 359-368, 1996), barajado de ADN (Patten et al., *Curr. Opin. Biotechnol.*, 8, 724-733, 1997), la presentación en fagos (Thompson et al., *J. Mol. Biol.*, 256, 77-88, 1996) y la PCR sexual (Cramer et al., *Nature*, 391, 288-291, 1998). Vaughan et al. (véase antes) expone estos métodos de maduración de afinidad.

Las moléculas de anticuerpo de la presente invención preferiblemente neutralizan la actividad de la IL-6, por ejemplo en los ensayos in vitro e in vivo descritos en los ejemplos. En una realización, estos anticuerpos se unen al sitio 3 de la IL-6 humana.

50 En una realización, la presente invención proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por la IL-6 humana que es capaz de inhibir la actividad de la IL-6 humana 0,038 nM en 50% con una concentración menor que 100 pM, midiéndose dicha actividad inhibidora en la proliferación inducida por la IL-6 de células T1165. En una realización, la concentración de anticuerpo que inhibe la IL-6 en 50% es menor que 50 pM, más preferiblemente menor que 20 pM. Preferiblemente, la IL-6 humana usada en el ensayo es la IL-6 humana recombinante. En una realización, el anticuerpo neutralizante es un anticuerpo humanizado o totalmente humano.

En otra realización, la presente invención proporciona un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por la IL-6 humana que es capaz de inhibir la actividad de la IL-6 humana 3,84 nM en 50% con una concentración menor que 1

nM, midiéndose dicha actividad inhibidora en la producción de MCP-1 por HUVECS en respuesta a la IL-6 y sIL-6R humanas. Preferiblemente, la IL-6 humana usada en el ensayo es la IL-6 humana recombinante. En una realización, el anticuerpo neutralizante es un anticuerpo humanizado o totalmente humano.

5 Si se desea, se puede conjugar un anticuerpo según la presente invención a una o más moléculas efectoras. Se apreciará que, en una realización, la molécula efectora puede comprender una sola molécula efectora o dos o más de dichas moléculas, unidas de tal modo que forman un resto aislado que se puede unir a los anticuerpos de la presente invención. Cuando se desea obtener un fragmento de anticuerpo unido a una molécula efectora, este se puede preparar por procedimientos de química convencionales o ADN recombinante, en los que el fragmento de anticuerpo se une directamente o por un agente de acoplamiento a la molécula efectora. Las técnicas para conjugar 10 dichas moléculas efectoras a anticuerpos son muy conocidas en la técnica (véase, Hellstrom et al., *Controlled Drug Delivery*, 2ª ed., Robinson et al., eds., 1987, pp. 623-53; Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 y Dubowchik et al., 1999, *Pharmacology and Therapeutics*, 83, 67-123). Los procedimientos químicos particulares, incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 93/06231, WO 92/22583, WO 89/00195, WO 89/01476 y WO03031581. Alternativamente, cuando la molécula efectora es una proteína o polipéptido, la unión se puede lograr usando procedimientos de ADN recombinantes, por ejemplo, como se describe en los documentos WO 86/01533 y EP0392745.

La expresión molécula efectora, tal como se usa en la presente memoria, incluye, por ejemplo, agentes antineoplásicos, fármacos, toxinas, proteínas biológicamente activas, por ejemplo enzimas, otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, polímeros sintéticos o que aparecen en la naturaleza, ácidos nucleicos y sus fragmentos, 20 por ejemplo ADN, ARN y sus fragmentos, radionucleidos, en particular radioyodo, radioisótopos, metales quelados, nanopartículas y grupos indicadores, tales como compuestos fluorescentes o compuestos que pueden detectarse mediante RMN o espectroscopía ESR.

Los ejemplos de moléculas efectoras pueden incluir citotoxinas o agentes citotóxicos incluyendo cualquier agente que sea perjudicial (p. ej., que mate) las células. Los ejemplos incluyen combrestatinas, dolastatinas, epotilonas, estaurosporina, maytansinoides, espongistatinas, rizoxina, halicondrinas, roridinas, hemiasterlinas, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxiantracina, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puomicina y análogos u homólogos de los mismos.

30 Las moléculas efectoras también incluyen, pero no se limitan a antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil-descarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa cloranbucilo, melfalano, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina-platino (II) (DDP), cisplatina, antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (antes denominada daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (antes denominada actinomicina), bleomicina, mitramicina, antramicina (AMC), caliqueamicinas o duocarmicinas), y 35 agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

Otras moléculas efectoras pueden incluir radionucleidos quelados tales como ^{111}In y ^{90}Y , Lu^{177} , Bismuto 213 , Californio 252 , Iridio 192 y Tungsteno 188 /Renio 188 , o fármacos, tales como, pero sin limitarse a alquilfosfolinas, inhibidores de la topoisomerasa I, taxoides y suramina.

40 Otras moléculas efectoras incluyen proteínas, péptidos y enzimas. Las enzimas de interés incluyen, pero no se limitan a enzimas proteolíticas, hidrolasas, liasas, isomerasas, transferasas. Las proteínas, los polipéptidos y los péptidos de interés incluyen, pero no se limitan a inmunoglobulinas, toxinas, tales como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas o toxina diftérica, una proteína tal como insulina, factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento obtenido a partir de plaquetas o activador de plasminógeno tisular, un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, p. ej., angiostatina o endostatina, o un agente 45 modificador de la respuesta biológica, tal como linfocina, interleuquina-1 (IL-1), interleuquina-2 (IL-2), interleuquina-6 (IL-6), factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de crecimiento nervioso (NGF) u otros factores de crecimiento e inmunoglobulinas.

Otras moléculas efectoras pueden incluir sustancias detectables útiles, por ejemplo, en diagnóstico. Ejemplos de 50 sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, nucleidos radiactivos, metales emisores de positrones (para uso en la tomografía de emisión de positrones) e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. Véase en general el documento de patente de EE.UU. nº 4.741.900 para iones metálicos que se pueden conjugar con anticuerpos para uso como agentes de diagnóstico. Las enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o acetilcolinesterasa; los grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina, avidina y biotina; los materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina-fluoresceína, cloruro de dansilo y ficoeritrina; los materiales luminiscentes adecuados incluyen luminol; los materiales bioluminiscentes adecuados incluyen luciferasa, luciferina y aecuorina; y los 55 nucleidos radiactivos incluyen ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In y ^{99}Tc .

- 5 En otro ejemplo, la o las moléculas efectoras pueden aumentar la semivida del anticuerpo in vivo, y/o reducir la inmunogenicidad del anticuerpo y/o potenciar el suministro de un anticuerpo a través de una barrera epitelial al sistema inmunitario. Los ejemplos de moléculas efectoras adecuadas de este tipo incluyen polímeros, albúmina, proteínas que se unen a albúmina o compuestos que se unen a albúmina tales como los descritos en el documento WO05/117984 (publicado el 15.12.05).
- 10 Cuando la molécula efectora es un polímero, puede ser, en general, un polímero sintético o natural, por ejemplo una cadena opcionalmente sustituida lineal o ramificada de polialquileno, polialquenileno o polioialquileno o un polisacárido ramificado o no ramificado, p. ej. un homo o heteropolisacárido.
- 10 Los sustituyentes opcionales particulares que pueden estar presentes en los polímeros sintéticos mencionados anteriormente, incluyen uno o varios grupos hidroxilo, metilo o metoxi.
- Los ejemplos concretos de polímeros sintéticos incluyen polietilenglicol, polipropilenglicol y poli(alcohol vinílico) de cadena lineal o ramificada opcionalmente sustituidos, o derivados de estos, en especial polietilenglicol opcionalmente sustituido, tal como metoxipolietilenglicol o derivados de éste.
- Los polímeros naturales particulares incluyen lactosa, amilosa, dextrano, glucógeno o derivados de estos.
- 15 "Derivados" tal y como se usa en la presente memoria se pretende que incluya derivados reactivos, por ejemplo grupos reactivos selectivos tiol tales como maleimidados y semejantes. El grupo reactivo puede unirse directamente o a través de un segmento conector al polímero. Se apreciará que el resto de dicho grupo será parte en algunos casos del producto como grupo conector entre el fragmento de anticuerpo y el polímero.
- 20 El tamaño del polímero puede variarse según se desee, pero estará generalmente en un intervalo de peso molecular medio de 500 Da a 50000 Da, preferiblemente de 5000 a 40000 Da y más preferiblemente de 20000 a 40000 Da. El tamaño del polímero en particular, se puede seleccionar basándose en el uso previsto del producto, por ejemplo, la capacidad para dirigirse a ciertos tejidos, tales como tumores, o aumentar la semivida en la circulación (para una revisión, véase Chapman, 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54, 531-545). Así, por ejemplo, cuando se pretende que el producto deje la circulación y penetre en un tejido, por ejemplo para uso en el tratamiento de un
- 25 tumor, puede ser ventajoso usar un polímero de bajo peso molecular, por ejemplo con un peso molecular de aproximadamente 5.000Da. Para las aplicaciones en las que el producto permanece en la circulación, puede ser ventajoso usar un polímero de alto peso molecular, por ejemplo que tenga un peso molecular en el intervalo de 20000 Da a 40000 Da.
- 30 Los polímeros particularmente preferidos incluyen un polímero polialquileno, tal como polietilenglicol o, en especial, un metoxipolietilenglicol o un derivado del mismo, y en especial con un peso molecular en el intervalo de aproximadamente 15000 Da a aproximadamente 40000 Da.
- 35 En un ejemplo, los anticuerpos para su uso en la presente invención están unidos a restos polietilenglicol (PEG). En un ejemplo concreto, el anticuerpo es un fragmento de anticuerpo y las moléculas de PEG pueden unirse a través de cualquier grupo funcional aminoácido de la cadena lateral o terminal disponible localizado en el fragmento de anticuerpo, por ejemplo, cualquier grupo amino, imino, tiol, hidroxilo o carboxilo libre. Dichos aminoácidos pueden ser naturales en el fragmento de anticuerpo o se pueden modificar genéticamente en el fragmento usando métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, los documentos US 5.219.996; US 5.667.425; WO98/25971). En un ejemplo, la molécula de anticuerpo de la presente invención es un fragmento Fab modificado, en donde la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada, de uno o más aminoácidos que permiten la
- 40 unión de una molécula efectora. Preferiblemente, los aminoácidos adicionales forman una región bisagra modificada que contiene uno o más restos de cisteína a los cuales puede ser anclada la molécula efectora. Pueden emplearse múltiples sitios para unir dos o más moléculas de PEG.
- 45 Preferiblemente, las moléculas de PEG están unidas covalentemente a un grupo tiol de al menos un resto cisteína localizado en el fragmento de anticuerpo. Cada molécula de polímero unida al fragmento de anticuerpo modificado puede unirse covalentemente al átomo de azufre de un resto de cisteína localizado en el fragmento. La unión covalente será generalmente un enlace disulfuro o, en particular, un enlace azufre-carbono. Cuando se emplea un grupo tiol como punto de unión, pueden utilizarse moléculas efectoras activadas de forma apropiada, por ejemplo, derivados selectivos de tiol, tales como maleimidados, y derivados de cisteína. Un polímero activado puede usarse como material de partida en la preparación de polímero-fragmentos de anticuerpo modificados como se ha descrito
- 50 anteriormente. El polímero activado puede ser cualquier polímero que contenga un grupo reactivo tiol tal como un ácido o éster α -halogenocarboxílico, p. ej. yodoacetamida, una imida, p. ej. maleimida, una vinilsulfona o un disulfuro. Dichos materiales de partida pueden obtenerse en el comercio (por ejemplo de Nektar, anteriormente Shearwater Polymers Inc., Huntsville, AL, EE.UU.), o pueden prepararse a partir de materiales de partida disponibles en el comercio usando procedimientos químicos convencionales. Las moléculas de PEG particulares incluyen
- 55 metoxi-PEG-amina 20K (que se puede obtener de Nektar, anteriormente Shearwater; Rapp Polymere; y SunBio) y M-PEG-SPA (que se puede obtener de Nektar, anteriormente Shearwater).
- En una realización, el anticuerpo es un fragmento Fab modificado o diFab que está PEGilado, es decir, tiene PEG (polietilenglicol) unido covalentemente al mismo, p. ej., según los métodos descritos en los documentos EP 0948544

o EP1090037 [véase también "Poly(ethyleneglycol) Chemistry, Biotechnical and Biomedical Applications", 1992, J. Milton Harris (ed), Plenum Press, New York, "Poly(ethyleneglycol) Chemistry and Biological Applications", 1997, J. Milton Harris and S. Zalipsky (eds), American Chemical Society, Washington DC y "Bioconjugation Protein Coupling Techniques for the Biomedical Sciences", 1998, M. Aslam y A. Dent, Grove Publishers, New York; Chapman, A., 2002, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2002, 54:531-545]. En un ejemplo, el PEG está unido a una cisteína en la región bisagra. En un ejemplo, un fragmento Fab modificado con PEG tiene un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en una región bisagra modificada. Un resto lisina puede unirse covalentemente al grupo maleimida, y a cada uno de los grupos amina sobre el resto lisina puede unirse un polímero de metoxipolietilenglicol que tenga un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. Por tanto, el peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede ser de aproximadamente 40.000 Da.

En una realización, la presente invención proporciona una molécula de anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por la IL-6 humana, que es un fragmento Fab modificado que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 13 y que tiene en el extremo C-terminal de su cadena pesada una región bisagra modificada que contiene al menos un resto de cisteína al que se une una molécula efectora. Preferiblemente, la molécula efectora es PEG y se une usando métodos descritos en los documentos (WO98/25971 y WO2004072116) de modo que un grupo lisil-maleimida se une al resto de cisteína en el extremo C-terminal de la cadena pesada y cada grupo amino del resto lisilo tiene covalentemente unido al mismo un resto de metoxipolietilenglicol que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. Por tanto, el peso molecular total del PEG unido al anticuerpo es de aproximadamente 40.000 Da.

En otro ejemplo, se pueden unir moléculas efectoras a fragmentos de anticuerpo usando los métodos descritos en las solicitudes de patente internacional WO2005/003169, WO2005/003170 y WO2005/003171.

La presente invención proporciona también una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena o cadenas pesadas y/o ligeras de una molécula de anticuerpo de la presente invención. Preferiblemente, la secuencia de ADN codifica la cadena pesada o la cadena ligera de una molécula de anticuerpo de la presente invención. La secuencia de ADN de la presente invención puede comprender ADN sintético, por ejemplo producido por un proceso químico, ADNc, ADN genómico o cualquier combinación de los mismos.

Las secuencias de ADN que codifican una molécula de anticuerpo de la presente invención se pueden obtener por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias de ADN que codifican la totalidad o parte de las cadenas pesadas y ligeras del anticuerpo se pueden sintetizar como se desee a partir de las secuencias de ADN determinadas o basándose en las correspondientes secuencias de aminoácidos.

El ADN que codifica las secuencias armazón del aceptor está ampliamente disponible para los expertos en la técnica y se puede sintetizar fácilmente sobre la base de sus secuencias conocidas de aminoácidos.

Se pueden usar técnicas convencionales de biología molecular para preparar las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. Las secuencias de DNA deseadas se pueden sintetizar completamente o en parte utilizando técnicas de síntesis de oligonucleótidos. Se pueden utilizar la mutagénesis dirigida al sitio y las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según sea apropiado.

Los ejemplos de secuencias de ADN adecuadas se proporcionan en la SEQ ID NO: 1; SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 12; SEQ ID NO: 14; SEQ ID NO: 15 y SEQ ID NO: 17. Los nucleótidos 1-57 en la SEQ ID NO: 15 y 1-60 en la SEQ ID NO: 17 codifican la secuencia del péptido señal del anticuerpo de ratón B72.3 (Whittle et al., 1987, *Protein Eng.* 1(6) 499-505.) que es escindida para dar una molécula de anticuerpo neutralizante de la presente invención. Por consiguiente, la presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena pesada de un anticuerpo de la presente invención que comprende los nucleótidos 58-2008 de la SEQ ID NO: 15. La presente invención también proporciona una secuencia de ADN aislada que codifica la cadena ligera de un anticuerpo de la presente invención que comprende los nucleótidos 61-705 de la SEQ ID NO: 17.

La presente invención se refiere también a un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN de la presente invención. Por consiguiente, se proporciona un vector de clonación o expresión que comprende una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Preferiblemente, el vector de clonación o de expresión comprende dos secuencias de ADN, que codifican la cadena ligera y la cadena pesada de la molécula de anticuerpo de la presente invención, respectivamente. Preferiblemente, un vector según la presente invención comprende las secuencias dadas en las SEQ ID NO: 15 y 17. Los nucleótidos 1-57 en la SEQ ID NO: 15 y 1-60 en la SEQ ID NO: 17 codifican la secuencia del péptido señal del anticuerpo de ratón B72.3 que, lo más preferiblemente, es escindida para dar una molécula de anticuerpo neutralizante de la presente invención.

Los métodos generales por los que los vectores se pueden construir, los métodos de transfección y los métodos de cultivo son bien conocidos por los expertos en la técnica. A este respecto, se hace referencia a "Current Protocols in Molecular Biology", 1999, F. M. Ausubel (ed), Wiley Interscience, Nueva York y el Maniatis Manual producido por Cold Spring Harbor Publishing.

- También se proporciona una célula hospedante que comprende uno o más vectores de clonación o expresión, que comprende una o más secuencias de ADN que codifican un anticuerpo de la presente invención. Se puede utilizar cualquier sistema adecuado de célula hospedante/vector para la expresión de las secuencias de ADN que codifican la molécula de anticuerpo de la presente invención. También se pueden usar bacterias, por ejemplo, *E. coli*, y otros sistemas microbianos, o sistemas de expresión de células hospedantes eucariotas, por ejemplo, de mamífero, véase Verma et al., 1998, *Journal of Immunological Methods*, 216, 165-181. Las células hospedantes de mamífero adecuadas incluyen células de CHO, NS0, de mieloma o hibridoma. Los ejemplos de sistemas de expresión adecuados incluyen el sistema de expresión de la glutamina sintasa descrito en el documento WO87/04462.
- La presente invención proporciona también un procedimiento para la producción de una molécula de anticuerpo según la presente invención, que comprende el cultivo de una célula hospedante que contiene un vector de la presente invención en condiciones adecuadas para llevar a la expresión de una proteína a partir de ADN que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y al aislamiento de la molécula de anticuerpo.
- La molécula de anticuerpo puede comprender solamente un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso solo es necesario utilizar una secuencia codificante del polipéptido de cadena pesada o ligera para transfectar las células hospedantes. Para la producción de productos que comprenden tanto cadenas pesadas como cadenas ligeras, la línea de células se puede transfectar con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada. Alternativamente, se puede utilizar un solo vector, y el vector incluye secuencias que codifican polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada.
- Puesto que los anticuerpos de la presente invención son útiles en el tratamiento y/o profilaxis de una afección patológica, la presente invención también proporciona una composición farmacéutica o de diagnóstico que comprende una molécula de anticuerpo de la presente invención en combinación con uno o más de un excipiente diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. Por consiguiente se proporciona el uso de un anticuerpo de la invención para la fabricación de un medicamento. La composición se suministra habitualmente como parte de una composición farmacéutica estéril que normalmente incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una composición farmacéutica de la presente invención puede comprender además un adyuvante farmacéuticamente aceptable.
- La presente invención también proporciona un procedimiento para preparar una composición farmacéutica o de diagnóstico, que comprende añadir y mezclar la molécula de anticuerpo de la presente invención junto con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
- La molécula de anticuerpo puede ser el único principio activo de la composición farmacéutica o de diagnóstico o puede estar acompañada de otros principios activos incluyendo otros ingredientes anticuerpos, por ejemplo anticuerpos anti-TNF, anti-IL-1 β , anti-linfocitos T, anti-IFN γ o anti-LPS, o ingredientes no anticuerpos tales como xantinas.
- Las composiciones farmacéuticas preferiblemente comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo de la invención. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" como se usa en la presente memoria, se refiere a una cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección determinada, o para poner de manifiesto un efecto terapéutico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente eficaz se puede estimar inicialmente o en ensayos de cultivo celular o en modelos animales, usualmente en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El modelo animal se puede usar también para determinar el intervalo de concentración apropiado y la vía de administración. Dicha información se puede usar entonces para determinar las dosis útiles y las vías de administración en los seres humanos.
- La cantidad terapéuticamente eficaz precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad de la enfermedad, de la salud general del sujeto, de la edad, peso y sexo del sujeto, de la dieta, tiempo y frecuencia de la administración, combinación o combinaciones de fármacos, reacciones de sensibilidad y tolerancia/respuesta a la terapia. Esta cantidad se puede determinar por experimentación rutinaria y depende de la opinión del clínico. En general, una cantidad terapéuticamente eficaz será de 0,01 mg/kg a 50 mg/kg, preferiblemente de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg. Las composiciones farmacéuticas pueden presentarse, de modo conveniente, en formas de dosificación unitarias que contengan una cantidad predeterminada de un agente activo de la invención por dosis.
- Las composiciones se pueden administrar individualmente a un paciente, o se pueden administrar en combinación (p. ej., de forma simultánea, secuencial o separada) con otros agentes, fármacos u hormonas.
- La dosis a la que se administra la molécula de anticuerpo de la presente invención depende de la naturaleza de la afección a tratar, de la extensión de la inflamación presente y de si la molécula de anticuerpo se usa profilácticamente o para tratar una afección existente.
- La frecuencia de la dosis dependerá de la semivida de la molécula de anticuerpo y de la duración de su efecto. Si la molécula de anticuerpo tiene una semivida corta (por ejemplo, 2 a 10 horas) puede ser necesario administrar una o más dosis al día. Alternativamente, si la molécula de anticuerpo tiene una semivida larga (por ejemplo, de 2 a 15 días o de 2 a 30 días) puede ser necesario administrar solamente una dosis una vez al día, una vez por semana o incluso una vez cada 1 ó 2 meses.

- 5 El vehículo farmacéuticamente aceptable no debe inducir por sí mismo la producción de anticuerpos nocivos para el individuo que recibe la composición y no debe ser tóxico. Pueden ser vehículos adecuados las macromoléculas grandes, metabolizadas lentamente, tales como las proteínas, polipéptidos, liposomas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, copolímeros de aminoácidos y partículas de virus inactivas.
- Se pueden usar sales farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sales de un ácido mineral, tales como hidrocloruros, hidrobromuros, fosfatos y sulfatos, o sales de ácidos orgánicos, tales como acetatos, propionatos, malonatos y benzoatos.
- 10 Los vehículos farmacéuticamente aceptables de las composiciones terapéuticas pueden contener adicionalmente líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente pueden estar presentes en dichas composiciones, sustancias auxiliares, tales como agentes humectantes o emulsionantes o sustancias tamponantes del pH. Tales vehículos hacen posible que las composiciones farmacéuticas sean formuladas como comprimidos, píldoras, grageas, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, mezclas y suspensiones, para su ingestión por el paciente.
- 15 Las formas preferidas para administración incluyen formas adecuadas para administración parenteral, por ejemplo, mediante inyección o perfusión, por ejemplo por inyección rápida o por perfusión continua. Cuando el producto es para inyección o para perfusión, puede tomar la forma de una suspensión, disolución o emulsión en un vehículo acuoso u oleoso y puede contener agentes de formulación, tales como agentes de suspensión, conservantes, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, la molécula de anticuerpo puede estar en forma seca, para reconstitución antes de su uso con un líquido estéril apropiado.
- 20 Una vez formuladas, las composiciones de la invención se pueden administrar directamente al sujeto. Los sujetos a ser tratados pueden ser animales. Sin embargo, es preferible que las composiciones se adapten para administración a sujetos humanos.
- 25 Las composiciones farmacéuticas de esta invención se pueden administrar por varias rutas incluyendo, pero sin limitarse a, las rutas oral, intravenosa, intramuscular, intraarterial, intramedular, intratecal, intraventricular, transdérmica, transcutánea (por ejemplo, véase el documento WO 98/20734), subcutánea, intraperitoneal, intranasal, enteral, tópica, sublingual, intravaginal o rectal. Los *hyposprays* se pueden usar también para administrar las composiciones farmacéuticas de la invención. Típicamente, las composiciones terapéuticas se pueden preparar como inyectables, ya sea como soluciones líquidas o como suspensiones. Se pueden preparar también formas sólidas adecuadas para solución, o suspensión, en vehículos líquidos previamente a la inyección.
- 30 La administración directa de las composiciones generalmente se realizará por inyección, subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, o se pueden administrar en el espacio intersticial de un tejido. Las composiciones se pueden administrar también en una lesión. La posología de tratamiento puede ser un programa de dosis única o un programa de dosis múltiples.
- 35 Se apreciará que el principio activo de la composición será una molécula de anticuerpo. Como tal, será susceptible de degradación en el tracto gastrointestinal. Por tanto, si la composición es para ser administrada por una vía que usa el tracto gastrointestinal, la composición necesitará contener agentes que protejan al anticuerpo de la degradación pero que liberen el anticuerpo una vez que ha sido absorbido del tracto gastrointestinal.
- Una exposición concienzuda de vehículos farmacéuticamente aceptables está disponible en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).
- 40 También se contempla que el anticuerpo de la presente invención pueda ser administrado mediante el uso de terapia génica. Con el fin de conseguir esto, las secuencias de ADN que codifican las cadenas pesadas y ligeras de la molécula de anticuerpo bajo el control de componentes apropiados de ADN se introducen en un paciente, de tal modo que las cadenas de anticuerpo se expresen a partir de las secuencias de ADN y sean ensambladas in situ.
- 45 La presente invención también proporciona una molécula de anticuerpo para usar en el control de enfermedades inflamatorias. Preferiblemente, la molécula de anticuerpo se puede usar para reducir el proceso inflamatorio o para prevenir el proceso inflamatorio.
- 50 También se proporciona una molécula de anticuerpo según la presente invención, para usar en el tratamiento y/o profilaxis de un trastorno patológico que es mediado por la IL-6 o asociado con un nivel aumentado de IL-6. La presente invención proporciona además el uso de una molécula de anticuerpo según la presente invención, en la fabricación de un medicamento para el tratamiento y/o profilaxis de un trastorno patológico que es mediado por la IL-6 o está asociado con un nivel aumentado de la IL-6. Preferiblemente, la afección patológica se selecciona del grupo que consiste en infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias), choque endotóxico asociado con infección, artritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil (AIJ) de inicio sistémico, lupus eritematoso sistémico (SLE), asma, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Castleman, espondilitis anquilosante, dermatomiositis, uveítis, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, psoriasis, vasculitis, adherencias quirúrgicas, accidente cerebrovascular, diabetes de tipo I,
- 55

- artritis de Lyme, meningoencefalitis, trastornos inflamatorios inmunomediados del sistema nervioso central y periférico, tales como la esclerosis múltiple y síndrome de Guillain-Barré, otros trastornos autoinmunitarios, pancreatitis, traumatismo (cirugía), enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplantes, cáncer (tanto tumores sólidos tales como melanomas, hepatoblastomas, sarcomas, carcinomas de células escamosas, cánceres de células transicionales, cánceres de ovario, como tumores malignos hematológicos y, en particular, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, cáncer gástrico y cáncer de colon), enfermedades del corazón, incluyendo enfermedades isquémicas tales como el infarto de miocardio, así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, pacientes con quemaduras, osteoporosis, periodontitis e hipoclorhidria.
- 5
- Preferiblemente, el trastorno patológico es la artritis reumatoide o lupus eritematosos sistémico (SLE).
- 10 La presente invención también proporciona una molécula de anticuerpo según la presente invención, para usar en el tratamiento o profilaxis del dolor.
- La presente invención proporciona además el uso de una molécula de anticuerpo según la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o profilaxis del dolor.
- 15 Una molécula de anticuerpo de la presente invención se puede usar en cualquier terapia donde se desee reducir los efectos de la IL-6 en el cuerpo humano o animal. La IL-6 puede estar circulando en el cuerpo o puede estar presente en un nivel indeseablemente alto localizada en un sitio particular el cuerpo, por ejemplo, un sitio de inflamación.
- Una molécula de anticuerpo de la presente invención se usa preferiblemente para el control de la enfermedad inflamatoria.
- 20 La presente invención también proporciona un método de tratamiento de sujetos humanos o animales que padecen o con riesgo de padecer un trastorno mediado por la IL-6, comprendiendo el método administrar al sujeto una cantidad eficaz de la molécula de anticuerpo de la presente invención.
- La molécula de anticuerpo de la presente invención también se puede usar en el diagnóstico, por ejemplo, en el diagnóstico in vivo y en la generación de imágenes de estados patológicos que implican IL-6.
- 25 La presente invención se describe adicionalmente sólo a modo de ilustración en los siguientes ejemplos, que hacen referencia a las figuras adjuntas, en las cuales:
- La figura 1 muestra el diseño del injerto para las secuencias de 240.g1 de la cadena pesada (figura 2a; SEQ ID NO: 11) y la cadena ligera (figura 2b; SEQ ID NO: 13). El símbolo (|) destaca las diferencias entre las secuencias armazón de donador:aceptor:injertado. Las CDR tienen un subrayado. Estas son como las define Kabat, excepto para la CDR-H1 que abarca tanto las definiciones de Kabat como de Chothia. Las secuencias con doble subrayado son restos de la región armazón del donante retenidas en los injertos.
- 30 La figura 2a muestra la secuencia traducida de la cadena pesada de IgG4 de 240.g1, mostrando los límites intrón/exón.
- La figura 2b muestra la secuencia traducida de la cadena ligera de 240.g1, mostrando los límites intrón/exón.
- 35 La figura 3a muestra la inhibición de la proliferación de células T1165 inducida por IL-6 humana recombinante, derivada de mamífero humana, macaco rhesus, macaco cangrejero y ratón por el anticuerpo 240.g1.
- La figura 3b muestra la inhibición de la producción de MCP-1 inducida por IL-6 recombinante humana y sIL-6R en HUVEC por el anticuerpo 240.g1.
- La figura 3c muestra la inhibición de la producción de MCP-1 inducida por IL-6 y sIL-6R endógena inducida por IL-17 en HUVEC por el anticuerpo 240.g1.
- 40 Figura 4. Neutralización in vivo de SAA inducido por hIL-6 en ratones por administración de CA030_240.g1 (anticuerpo para sitio 3) n=7-8/grupo, excepto PBS n=6. Análisis estadístico por ANOVA con prueba posterior de Bonferroni, ** P<0,01 comparado con IL-6 sola.
- Manipulaciones del ADN y métodos generales
- 45 Se usó la cepa de E. coli INVαF' (Invitrogen) para la transformación y desarrollo en cultivo rutinario. Las enzimas de restricción y modificación del ADN se obtuvieron de Roche Diagnostics Ltd. y New England Biolabs. Las preparaciones de plásmidos se realizaron usando los kits de purificación Maxi Plasmid (QIAGEN, n° de catálogo 12165). Las reacciones de secuenciación de ADN se llevaron a cabo usando el kit de secuenciación ABI Prism Big Dye Terminator (n° de catálogo 4304149) y se hicieron en un secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Los datos se analizaron usando el programa AutoAssembler (Applied Biosystems).
- 50 Los oligonucleótidos se obtuvieron de INVITROGEN. Los genes sintéticos se construyeron en Entelechon. La concentración de Fab e IgG se determinaron usando el montaje de ELISA.

Ejemplo 1: Aislamiento de 132E09

- Se inmunizaron ratas por inyección subcutánea de IL-6 humana recombinante (Peprotech) en intervalos de 3 semanas, inicialmente con adyuvante completo de Freund y posteriormente con adyuvante incompleto de Freund. Se recogieron los bazos 1-2 semanas después de la última inmunización, y se prepararon suspensiones de una célula. Se cultivaron linfocitos de ratas inmunes en presencia de células de timoma de ratón EL4 irradiadas y medio condicionado de linfocitos T de conejo durante 1 semana en placas de microvaloración de 96 pocillos. Los líquidos sobrenadantes se seleccionaron según la presencia de anticuerpos específicos para la IL-6 humana en ELISA. Los positivos se volvieron a seleccionar según la capacidad para neutralizar los efectos biológicos de la IL-6 humana en un ensayo de la línea celular DS1 (Bock et al., 1993, *Cytokine*, 5, 480-489).
- Se aislaron linfocitos B individuales que segregaban anticuerpo con características de unión adecuadas, de los pocillos de microvaloración positivos, según el método de anticuerpos de linfocitos seleccionados (Babcock et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7843-7848; documento WO92/02551), y los genes de la región variable de la cadena pesada y ligera se clonaron por PCR de transcripción inversa de linfocitos B de rata solos. Las regiones variables se expresaron en formato de IgG recombinante para confirmar la unión, y se seleccionó el anticuerpo 132E09 para la humanización y posterior estudio. La secuencia de la región variable de rata se registró como CA030_00240.

Las secuencias de las regiones V se muestran en las SEQ ID NO: 1 a 4.

Ejemplo 2: injerto de CDR de 132E09

- Se diseñaron una serie de regiones VL y VH humanizadas en las que las regiones hipervariables de las CDR más un número variable de restos de la región armazón de 132E09 se injertaron en las regiones armazón del aceptor de la región V humana.

- Se diseñaron 10 regiones VL injertadas (gLI-10) y se construyeron genes por ensamblaje de oligonucleótidos y mutagénesis por PCR. También se construyeron un total de 13 regiones VH injertadas (gHI-13) usando dos regiones armazón diferentes, VH3 1-4 3-72 y VH3 1-3 3-21. Las secuencias injertadas de la cadena ligera se subclonaron en el vector de expresión de la cadena ligera humana pKH10.1 que contiene el ADN que codifica la región constante C-Kappa humana (alotipo Km3). Las secuencias injertadas de la cadena pesada se subclonaron en el vector de expresión gamma-4 humano pVhg4P FL, que contiene el ADN que codifica la región constante gamma-4 humana que contiene la mutación S241P que estabiliza la región bisagra (Angal et al., véase antes). Se cotransfectaron plásmidos en células CHO y los anticuerpos producidos se seleccionaron por la actividad de unión a IL-6 en ensayos in vivo. Las transfecciones de las células CHO se llevaron a cabo usando el procedimiento de Lipofectamine™ 2000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen, n° de catálogo 11668).

- De los 13 injertos de cadena pesada producidos, dos contenían solo un solo resto de la región armazón del donante (Ala) en la posición 49 y estos se produjeron usando ambas de las dos regiones armazón diferentes de la cadena pesada. El injerto VH3 1-3 3-21 se expresaba poco en células CHO y mostró una afinidad reducida por la IL-6. En cambio, el injerto que usa la región armazón VH3 1-4 3-72 se expresaba bien y retenía la afinidad del anticuerpo del donante. Este injerto de cadena pesada, que comprendía solo un solo resto de la región armazón del donante, se seleccionó en combinación con el injerto de la cadena ligera de gL10 en los que solo se transfirieron las CDR.

- La figura 1 muestra un alineamiento entre la secuencia de rata donante 132E09 y las regiones armazón humanas del aceptor. La región armazón de la cadena pesada del aceptor es la secuencia de la línea germinal humana VH3 1-3 3-72, con la región armazón 4 procedente de esta parte de la región JH de la línea germinal humana JH4. La región armazón de la cadena ligera del aceptor es la secuencia de la línea germinal humana VK1 2-1-(1) 012, con la región armazón 4 procedente de esta parte de la región JK de la línea germinal humana JK2. Las secuencias de injerto para gH13 y gL10 se muestran en la figura 1 (SEQ ID NO: 11, 12, 13 y 14).

- Este anticuerpo injertado se denominó CA030_00240.g1. Este se produjo como una IgG4 entera que comprende la sustitución de serina por prolina en la posición 241 como se ha descrito antes. Las secuencias de las cadenas pesadas y ligeras completas traducidas se muestran en las figura 2a y 2b respectivamente. La secuencia de aminoácidos completa de la cadena pesada se proporciona en la SEQ ID NO: 16 y la cadena ligera en la SEQ ID NO: 18. La secuencia de ADN que codifica la cadena pesada y ligera se proporciona en las SEQ ID NO: 15 y 17 respectivamente. Los nucleótidos 1-57 en la SEQ ID NO: 15 y en la figura 2a codifican las secuencias del péptido señal del anticuerpo de ratón B72.3 VH y los nucleótidos 1-60 en la SEQ ID NO: 17 y en la figura 2b codifican las secuencias del péptido señal del anticuerpo de ratón B72.3 VL.

El anticuerpo de ratón B72.3 se describe en Whittle et al., 1987, *Protein Eng.* 1(6) 499-505.

Ejemplo 3: Afinidad de unión

Mediciones de la afinidad de unión de CA030_00240.g1

- La tecnología BIAcore controla la unión entre biomoléculas en tiempo real y sin el requisito de marcaje. Uno de los

- interaccionantes, denominado ligando, se inmoviliza directamente o se captura sobre la superficie inmovilizada, mientras que el otro, denominado analito, fluye en la solución sobre la superficie capturada. El sensor detecta el cambio en la masa en la superficie del sensor cuando el analito se une al ligando para formar un complejo sobre la superficie. Esto corresponde al proceso de asociación. El proceso de disociación se controla cuando el analito es sustituido por tampón. En el ensayo de afinidad de BIAcore, el ligando es IgG4 entera CA030_00240.g1 y el analito es la IL-6 humana.
- 5
- Instrumento
- Biacore® 3000, Biacore AB, Uppsala, Suecia
- Chip del sensor
- 10 CM5 (calidad investigación) número de catálogo: BR-1001-14, Biacore AB, Uppsala, Suecia. Los chips se almacenaron a 4°C.
- Solución de normalización BIAnormalising
- Glicerol al 70% (p/p). Parte del kit BIAmaintenance, número de catálogo: BR-1002-51, Biacore AB, Uppsala, Suecia. El kit BIAmaintenance se almacenó a 4°C.
- 15 Kit de acoplamiento de amina
- Número de catálogo: BR-1000-50, Biacore AB, Uppsala, Suecia.
- Hidrocioruro de etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). Compuesto de 75 mg/ml en agua destilada y almacenado en partes alícuotas de 200 µl a -70°C.
- 20 N-Hidroxisuccinimida (NHS). Compuesto de 11,5 mg/ml en agua destilada y almacenado en partes alícuotas de 200 µl a -70°C.
- Hidrocioruro de etanolamina-NaOH 1 M pH 8,5. Almacenado en partes alícuotas de 200 µl a -70 °C. Tampones
- Tampón de ejecución: HBS-EP (que es HEPES 0,01 M a pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005%). Número de catálogo: BR-1001-88, Biacore AB, Uppsala, Suecia. Tampón almacenado a 4°C.
- 25 Tampón de inmovilización: Acetato 5,0 (que es acetato sódico 10 mM a pH 5,0). Número de catálogo: BR-1003-51, Biacore AB, Uppsala, Suecia. Tampón almacenado a 4°C.
- Captura de ligando
- Fragmento Affinipure F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana, fragmento Fc específico. Jackson ImmunoResearch Inc (Pennsylvania, EE.UU.), número de catálogo: 109-006-098. Reactivo almacenado a 4°C.
- Analito
- 30 IL-6 humana recombinante (R&D Systems Europe Ltd, Abingdon, Oxon. Número de catálogo 206-IL-050, número de lote A131402A) almacenada a -70°C y descongelada una vez para cada ensayo.
- IL-6 de macaco cangrejero recombinante e IL-6 de macaco rhesus recombinantes producidas por transfección transitoria de células CHO. El material se usó como líquido sobrenadante del cultivo celular no purificado y no cuantificado.
- 35 Solución de regeneración
- HCl 40 mM preparado por dilución con agua destilada a partir de una solución madre 11,6 M (BDH, Poole, Inglaterra. Número de catálogo: 101254H).
- NaOH 5 mM NaOH preparado por dilución con agua destilada a partir de una solución madre 50 mM. Número de catálogo: BR-1003-58, Biacore AB, Uppsala, Suecia.
- 40 Método de ensayo
- 45 Se llevó a cabo el análisis BIA (Biomolecular Interaction Analysis) usando un BIAcore 3000 (BIAcore AB). El fragmento Affinipure F(ab')₂ de cabra anti-IgG humana, fragmento Fc específico (Jackson ImmunoResearch) se inmovilizó sobre un chip de sensor CM5 mediante química de acoplamiento de amina a un nivel de captura de ~5000 unidades de respuesta (RU). Se usó el tampón HBS-EP (HEPES 10mM a pH 7,4, NaCl 0,15 M, EDTA 3 mM, tensioactivo P20 al 0,005%, BIAcore AB) como el tampón de ejecución con un caudal de 10 µl/min. Se usó una inyección de 10 µl de CA030_240.g1 4 µg/mL para la captura por el anticuerpo anti-IgG humana-Fc inmovilizado. La IL-6 humana se valoró frente a CA030_240.g1 capturado con diferentes concentraciones con un caudal de 30 µl/min.

La superficie se regeneró mediante una inyección de 10 µl de HCl 40 mM, seguido de una inyección de 5 µl de NaOH 5 mM con un caudal de 10 µl/min.

Se analizaron las curvas de unión con sustracción de referencia usando el software BIAevaluation (versión 3.2) siguiendo procedimientos convencionales. Los parámetros cinéticos se determinaron a partir del algoritmo de ajuste.

5 En este estudio se usó un lote de CA030_240.g1. La afinidad se midió con concentraciones de IL-6 humanas de o menores de 20 nM. El valor de afinidad determinado para CA030_240.g1 estaba en el intervalo de 9,02-10,50 pM con una media ± s.e.m. de 9,76 ± 0,74 pM (tabla 1.1). No era posible medir la afinidad con la IL-6 humana inmovilizada sobre el chip BIAcore, ya que la inmovilización de la IL-6 produjo la pérdida de la conformación nativa.

10 Debido a que no era posible cuantificar la IL-6 del macaco cangrejero o el macaco rhesus, tampoco era posible determinar los parámetros cinéticos verdaderos para su interacción con CA030_00240.g1. Sin embargo, la inspección visual de los sensogramas de unión indica que CA030_00240.g1 se une a estas IL-6 de primate no humano con una afinidad similar a la de la IL-6 humana.

TABLA 1.1 Afinidad de CA030_240.g1 por la IL-6 humana.

Referencia	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	K_d (M)	K_d pM
10017474/39-51	7,31E+05	7,68E-06	1,05E-11	10,5
10017474/39-51	8,52E+05	7,68E-06	9,02E-12	9,02

15 Ejemplo 5: Ensayos de neutralización in vitro

La potencia del anticuerpo CA030 00240.g1, de aquí en adelante abreviado 240.g1, se determinó usando dos ensayos diferentes. El primer ensayo usaba una línea celular de ratón dependiente de IL-6, llamada T1165, que prolifera en respuesta a IL-6 de ratón, macaco rhesus, macaco cangrejero y humana. Esta señalización directa de IL-6 al receptor de IL-6 de superficie celular, junto con una subunidad del receptor de señalización llamada gp130, se denomina señalización cis. El segundo ensayo usaba células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) estimuladas con IL-6 más receptor de IL-6 soluble (IL-6R) siendo la lectura la producción de la proteína quimioattractora de monocitos-1 (MCP-1). En este ensayo la IL-6 se añadió de forma exógena o se podía producir estimulando HUVEC con la citoquina interleuquina-17 (IL-17). Estas dos variantes de ensayo se denominan señalización trans, ya que las HUVEC no expresan el IL-6R y solo pueden responder, es decir, producir MCP-1 cuando se añaden de forma exógena tanto la IL-6 como el IL-6R soluble.

Usando estos diferentes ensayos, se podían generar valores de ND50 (dosis de neutralización de 50%) para 240.g1 contra IL-6 humana (recombinante y natural), macaco rhesus, macaco cangrejero y ratón.

Materiales

Medio de cultivo

30 Medio de cultivo de T1165 - RPMI1640, complementado con suero de ternero fetal al 10%, penicilina (100 unidades/ml), estreptomycin (50 µg/ml), glutamina (2 mM) y 10 ng/ml de IL-6 humana recombinante, R&D systems, Reino Unido.

35 Medio de cultivo de HUVEC - Medio basal de células endoteliales de vasos grandes (LVECBM) TCS Cellworks, Reino Unido, complementado con medio de crecimiento de células endoteliales de vasos grandes TCS Cellworks, Reino Unido, y complementado con antibióticos TCS Cellworks, Reino Unido.

CA 030 00240.g1 se produjo en el laboratorio en una concentración de 6,83 mg/ml en PBS.

40 IL-6 humana R&D systems, Reino Unido, IL-6 derivada de mamífero humano (obtenida en el laboratorio a partir de transfección de CHO con IL-6 humana 10017108/67), IL-6 de macaco rhesus (obtenida en el laboratorio a partir de transfección de CHO con IL-6 de macaco rhesus 10017108/67), IL-6 de macaco cangrejero (obtenida en el laboratorio a partir de transfección de CHO con IL-6 de macaco cangrejero 10017108/67), IL-6 de ratón R&D systems, Reino Unido. Anticuerpo de captura anti-MCP-1 humana (555055) y anticuerpo de detección anti-MCP-1 humana (554664) y MCP-1 recombinante humana (890225), BD Biosciences, CA. Estreptavidina-HRP (AMDEX) Amersham bioscience, Reino Unido. Trombina Merck Biosciences, Darmstadt, Alemania, sIL-6R R&D systems, Reino Unido. IL-17 humana R&D systems, Reino Unido.

45 Ensayo de T1165 - CellTiter 96® AQueous Promega, CA.

Azul TM (Serologicals, GA).

Medición de la actividad de 240.g1 usando la proliferación de células T1165 dependiente de IL-6.

5 Las células T1165 se descongelaron 4 días antes de usar y se cultivaron en RPMI1640 complementado con FCS al 10%, antibióticos, glutamina y IL-6 humana 10 ng/ml. La viabilidad celular se controló usando exclusión con tinta azul de trypan, solo se usaron células que se consideró que eran al menos 90% viables. Antes de usar, las células se lavaron dos veces en RPMI1640 en ausencia de IL-6 humana. Después las células se contaron y se dispensaron en placas de fondo plano de 96 pocillos con una densidad de 5×10^4 /célula por pocillo. En placas separadas, se incubó una dilución seriada de 240.g1 en presencia de IL recombinante humana, derivada de mamífero humano (denominada también CHO IL-6), de macaco cangrejero, de macaco rhesus o ratón, en una concentración fija de 1 ng/ml (0,038 nM). El complejo premezclado de 240.g1 e IL-6 después se transfirió a pocillos que contenían células T1165 que se incubaron durante 48 h a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂. Durante las últimas 6 h de incubación, se añadieron 20 ml de CellTiter 96® AQueous para determinar el número de células que proliferan. La inhibición de la proliferación de célula T1165 dependiente de IL-6 por 240.g1 se expresó como un porcentaje de inhibición de los pocillos tratados con IL-6 menos los pocillos de control que contenían células pero no IL-6.

15 La actividad de 240.g1 contra la proliferación de la línea celular T1165 inducida por IL-6 recombinante humana, derivada de mamífero humano, macaco rhesus, macaco cangrejero y ratón, se puede ver en la figura 3a. 240.g1 inhibía potencialmente la actividad de la IL-6 recombinante humana, derivada de mamífero humano, macaco rhesus, macaco cangrejero pero no de ratón.

20 La ND50 para la IL-6 recombinante humana era $1,1 \pm 0,5$ ng/ml ($7,26 \pm 3,3$ pM). La ND50 para la IL-6 de mamífero humano era $3,6 \pm 2,4$ ng/ml ($23,76 \pm 15,84$ pM). La ND50 para la IL-6 de macaco rhesus era $2,2 \pm 1,1$ ng/ml ($14,52 \pm 7,26$ pM). La ND50 para la IL-6 de macaco cangrejero era $5,4 \pm 1,1$ ng/ml ($35,64 \pm 7,26$ pM).

Medición de la actividad de 2401.g1 usando la producción de MCP-1 inducida por IL-6 y receptor de IL-6 soluble en HUVEC.

25 Se desarrollaron células HUVEC (TCS Cellworks, Reino Unido) en medio basal de células endoteliales de vasos grandes (LVECBM) y se hicieron pases en cultivo no más de 5 veces. Las células se desarrollaron hasta 75% de confluencia antes de usar. Las células se desprendieron usando tripsina/EDTA, se volvieron a suspender y se lavaron una vez en LVECBM reciente. Después las células se contaron y se dispensaron en placas de fondo plano de 96 pocillos con una densidad de 2×10^4 /célula por pocillo. Las células se cultivaron durante la noche a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂. Al día siguiente, las células se lavaron en medio reciente complementado con trombina biotinilada (3 U/ml) y se dejaron aparte. En placas separadas, se incubó una dilución seriada de 240.g1 en presencia de IL-6 recombinante humana (50 ng/ml; 3,84 nM) y sIL-6R en una concentración fija de 500 ng/ml (10,15 nM). Además, también se incubó 240.g1 con IL-17 recombinante humana (25 ng/ml; 1,18 nM), que estimula las células HUVEC para producir IL-6, y sIL-6R en una concentración fija de 500 ng/ml (10,15 nM). El complejo premezclado de 240.g1 y IL-6/sIL-6R o IL-17/sIL-6R después se transfirió a pocillos que contenían HUVEC que se incubaron durante 24 h a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂. Después del periodo de incubación, se recogió el líquido sobrenadante exento de células y se determinaron los niveles de MCP-1 humana por ELISA tipo sándwich (protocolo dado más adelante). La inhibición de la producción de MCP-1 inducida por IL-6/sIL-6R o IL-17/sIL-6R por 240.g1 se expresó como porcentaje de inhibición de los pocillos tratados con IL-6/sIL-6R o IL-17/sIL-6R menos los pocillos de control que contenían células pero no estímulos. Además se añadieron controles para indicar la respuesta de las células a la adición de IL-6 humana en ausencia de sIL-6R.

40 ELISA de MCP-1

45 Placas Nunc Maxisorp se revistieron con anticuerpo de captura anti-MCP-1 con una concentración de 2 µg/ml. Las placas se incubaron a +4°C durante la noche y después se lavaron dos veces en PBS más Tween 20 al 0,1% (tampón de lavado). Las placas se bloquearon durante 1 h en PBS más albúmina de suero bovino al 5%. Después, las placas se lavaron 4 veces con tampón de lavado y se añadieron referencias y muestras. Las placas se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Después las placas se lavaron y se añadió anticuerpo anti-MCP-1 biotinilado en una concentración de 1 mg/ml. Las placas se incubaron durante 2 h más y después se lavaron 4 veces. Después se añadió una dilución 1:5000 de estreptavidina-HRP y las placas se incubaron durante 30 min. Las placas se lavaron 4 veces finales y se añadió sustrato TMB. Se tomaron lecturas colorimétricas a 630 nm y lecturas de fondo a 492 nm. Las concentraciones de MCP-1 se obtuvieron a partir de una curva patrón usando un ajuste de curva logística de cuatro parámetros, con el software Genesis II.

La actividad de 240.g1 contra la señalización trans inducida por IL-6 humana recombinante y sIL-6R en HUVEC puede verse en la figura 3b. 240.g1 inhibía potencialmente la producción de MCP-1 inducida por IL-6 humana recombinante y sIL-6R por HUVEC. La ND50 era 64 ± 62 ng/ml (422 ± 409 pM).

55 La actividad de 240.g1 contra la señalización trans inducida por sIL-6R e IL-6 endógena inducida por IL-17 en células HUVEC se puede ver en la figura 3c. 240.g1 inhibía potencialmente la producción de MCP-1 inducida por sIL-6R e IL-6 endógena inducida por IL-17 por las HUVEC. La ND50 era 93 ± 70 ng/ml (614 ± 462 pM).

Conclusión

240.g1 es capaz de neutralizar la bioactividad de la IL-6 recombinante humana, derivada de mamífero humano, macaco rhesus y macaco cangrejero pero no de ratón en un ensayo de IL-6 de señalización cis. Además, 240.g1 puede neutralizar la señalización trans de IL-6 inducida por IL-6 recombinante o endógena.

5 Ejemplo 6: Actividad in vivo

Se sabe que la IL-6 induce proteínas en fase aguda. En ratones, la proteína en fase aguda más destacada es el amiloide A sérico (SAA). La IL-6 humana es capaz de actuar en el receptor de ratón, de modo que se puede inyectar IL-6 humana en ratones y medir la producción de SAA en el suero.

10 Se inyectó en Balb/c por vía s.c. el anticuerpo anti-hIL-6 específico del sitio 3, IgG4 entera CA030_240.g1. 24 horas después, se inyectó a los ratones por vía i.p. hIL-6 30 µg/kg (Peprotech número de catálogo 200-06, número de lote 0203B16). Después de 20 h se extrajo sangre por punción cardiaca y se recogió el suero para evaluar el amiloide A sérico (SAA) por ELISA (Tridelta, número de lote 22KT022). Como se indica en la figura 4, la inducción de SAA por la hIL-6 era inhibida por CA030_240.g1, observándose una reducción estadísticamente significativa en SAA con dosis de 0,3, 0,1 y 0,03 mg/kg.

15 n=7-8/grupo, excepto PBS n=6. Análisis estadístico por ANOVA con prueba posterior de Bonferroni, **

P<0,01. comparado con IL-6 sola.

Dos experimentos adicionales confirmaron la inhibición significativa de SAA inducido por IL-6 (30 ug/kg) por CA030_240.g1 con dosis de 0,3 y 0,1 mg/kg.

Ejemplo 7: Cartografía de epítomos de CA030 00240.g1

20 El epítomo en la IL-6 humana que reconoce CA030_00240.g1 se cartografió usando tecnología de RMN usando 240.g1 como un fragmento Fab'. Este requiere que la IL-6 humana sea expresada en *E. coli* y sea marcada uniformemente con isótopos estables $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$. Se obtuvieron las asignaciones de resonancia de la cadena principal específicas de la secuencia completa para la IL-6 libre y se detectaron los cambios en la posición de estas señales inducidos por la unión del fragmento Fab' de CA030_00240.g1 usando un espectro 3D HNCOSY.

25 Expresión y purificación de la IL-6 humana recombinante.

La IL-6 se preparó a partir de un vector de expresión de *E. coli* (pET3d) que contenía la secuencia codificante de la forma madura de la proteína. La proteína se expresó en células Tuner (DE3) pLysS, produciendo altos rendimientos de un producto insoluble. Las muestras de IL-6 marcadas con ^{15}N , $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ y $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}/^2\text{H}$ se prepararon a partir de células desarrolladas en medios ricos marcados de forma adecuada (Celtone).

30 La IL-6 se purificó a partir de células de *E. coli* transformadas, usando procedimientos bien establecidos. Inicialmente, células recogidas de 11 medios de cultivo se volvieron a suspender en 40 ml de tampón A [KCl 100 mM, DTT 2 mM, Tris-HCl 10 mM a pH 8,5, sacarosa al 25% (w/v), comprimido inhibidor de proteasa disuelto (Boehringer)]. Se añadieron 10 ml de tampón B [Tris-HCl 300 mM a pH 8,5, EDTA 100 mM, lisozima 4 mg/ml] y la suspensión se incubó en hielo durante 10-30 min con agitación ocasional. Después, se añadieron 50 ml de tampón C [LiCl 1 M, EDTA 20 mM, NP-40 al 0,5 % (v/v)] y la suspensión se puso en una prensa de French dos veces a 1.400 kg/cm² (20.000 psi). Después, el homogeneizado se centrifugó a 16.000g rpm durante 15 min a 4°C y se retuvo el sedimento. El sedimento se volvió a suspender en 40 ml de tampón D [Tris-HCl 10 mM a pH 8,5, EDTA 0,1 mM, LiCl 0,5 M, NP-40 al 0,5 % (v/v), DTT 1 mM, comprimido de proteasa disuelto] y se puso en una prensa de French y se centrifugó como antes. Esta etapa se repite. Después, el sedimento se vuelve a suspender en 40 ml de tampón E [Tris-HCl 10 mM a pH 8,5, EDTA 0,1 mM, NP-40 al 0,5 % (v/v), DTT 1 mM, comprimido de proteasa disuelto] y se pone en la prensa de French y se centrifuga como antes. Se repite esta etapa. El sedimento final se disuelve en 6 ml de GuHCl 6 M, Tris-HCl 50 mM a pH 8,0 y se clarifica por centrifugación a 48.000 g durante 30 min a 4°C. El líquido sobrenadante se retiene y la IL-6 solubilizada se cuantifica por espectrofotometría.

45 La IL-6 solubilizada se diluye a 2,5 mg/ml en GuHCl 5 M, NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM, GSH 2 mM, GSSG 0,2 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0 y se incubó a 25°C durante 1 hora. Las muestras después se diluyeron más, gota a gota hasta 250 µg/ml en NaCl 50 mM, Tris-HCl 50 mM, GSH 2 mM, GSSG 0,2 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0 y se incubaron a 25°C durante 3 h. Cualquier precipitado formado en esta etapa se separa por centrifugación a 30.000 g durante 30 minutos a 4°C. El material clarificado se dializa contra Tris-HCl 50 mM, glicerol al 10 % (v/v), pH 9,0 durante un mínimo de 16 h a 4°C con dos cambios de tampón. Después de diálisis, la solución se clarifica por centrifugación a 30.000 g durante 30 min a 4°C. El líquido sobrenadante se retiene y se carga en 8 ml de columna de intercambio iónico monoQ (Amersham Biosciences) y se eluye con un gradiente lineal de cloruro sódico (0-1,0 M). Las fracciones que contenían la IL-6 replegada se identificaron por SDS-PAGE y después se combinaron y difiltraron en fosfato sódico 25 mM, NaCl 100 mM, NaN₃ al 0,01 % (p/v), pH 6,5.

50 El fragmento Fab' de CA030_00240.g1 se generó, purificó y formuló en fosfato sódico 25 mM, NaCl 100 mM, NaN₃ al

0,01 % (p/v), pH 6,5. Los complejos 1:1 entre la IL-6 y el fragmento Fab' de CA030_00240.g1 se preparó para el análisis de RMN mezclando cantidades equimolares de las proteínas en una concentración de aproximadamente 0,2 - 0,6 mM.

Espectroscopía de RMN:

- 5 Los experimentos de RMN se llevaron a cabo en muestras de 0,35 ml de las proteínas y complejos en un tampón de fosfato sódico 25 mM, cloruro sódico 100 mM, azida sódica al 0,01 % (p/v) a pH 6,5 (95% de H₂O y 5% de D₂O). Se preparó el complejo 1:1 entre la IL-6 marcada con ¹⁵N/¹³C/¹H y el fragmento Fab' no marcado de CA030_00240.g1 para análisis de RMN mezclando cantidades equimolares de las proteínas para lograr una concentración final de 0,1 mM. Los datos de RMN se obtuvieron a 25°C para la IL-6 libre y para el complejo de IL-6:fragmento Fab' de
- 10 CA030_00240.g1 en un espectrómetro de 800 MHz Bruker Avance equipado con una criosonda de triple resonancia (¹⁵N/¹³C/¹H). Los espectros de HNCACB, CBCA(CO)NH y HNCO de referencia (Wittekind, M., y Mueller, L. (1993) *J Magn Reson*, Series B 101(2), 201; Grzesiek, S., y Bax, A. (1993) *J Biomol NMR* 3(2), 185-204; Muhandiram, D. R., y Kay, L. E. (1994) *J Magn Reson*, Series B 103(3), 203; Grzesiek, S., y Bax, A. (1992) *J Magn Reson* 96(2), 432) se usaron para hacer las asignaciones de resonancias de la cadena principal específicas de la secuencia completa
- 15 (¹⁵N, ¹³C y ¹H) para la IL-6 libre usando una muestra 0,9 mM uniformemente marcada con ¹⁵N/¹³C.

Los cambios en las posiciones de las señales de la cadena principal de la IL-6 inducidos por la unión del fragmento Fab' de CA030_00240.g1 se detectaron usando un espectro 3D TROSYHNCO (Salzmann, M. et al., (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95(23), 13585-13590). Los parámetros de adquisición típicos para todos los experimentos de RMN 3D se proporcionan en la tabla 1.

- 20 Todos los espectros se procesaron usando NMRPipe (Delaglio, F. et al., (1995) *J. Biomol. NMR* 6(3), 277-293), con predicción lineal usada para extender el tiempo de adquisición eficaz en la dimensión del ¹⁵N de los datos 3D a aproximadamente 30 ms. Se aplicó potenciación leve de la resolución en todas las dimensiones usando una función de seno cuadrado desplazada. Los análisis de los espectros se llevaron a cabo usando el programa Sparky (Goddard, T. D., y Kneller, D. G. SPARKY 3. In., University of California, San Francisco).

- 25 Análisis de los datos de unión de Fab:

- El procedimiento del desplazamiento mínimo (Farmer, B. T. et al., (1996) *Nat Struct Mol Biol* 3(12), 995; Muskett, F. W. et al., (1998) *J Biol Chem* 273(34), 21736-21743) se usó para determinar los cambios en las posiciones de las señales de RMN de la IL-6 que resultan de la unión del fragmento Fab' de CA030_00240.g1. Inicialmente, todos los picos en el espectro 3D HNCO de la IL-6 libre y espectro 3D TROSYHNCO de la IL-6 unida a g132E09 Fab se tomaron en sus centros. Los valores de los desplazamientos químicos de ¹⁵N y ¹H de las resonancias de la cadena principal se corrigieron para la diferencia de temperatura entre los espectros del complejo y la proteína libre (-0,8 ppm para ¹⁵N y -0,05 ppm para ¹H) (Baxter, N. J., y Williamson, M. P. (1997) *J Biomol NMR* 9(4), 359-369). El cambio mínimo en la posición para los picos entre la IL-6 libre y unida a Fab se obtuvo usando Microsoft Excel para calcular la diferencia de desplazamiento químico combinado en el ¹⁵N, ¹³C y ¹H para cada pico asignado en el
- 30 espectro HNCO de la proteína libre comparado con todos los picos observados en el espectro TROSY-HNCO del complejo Fab. Las diferencias combinadas de los desplazamientos químicos de protón, nitrógeno y carbono de la amida ($\Delta\delta$) se definieron según la siguiente ecuación (ecuación 1), donde $\Delta\delta_{HN}$, $\Delta\delta_N$ y $\Delta\delta_C$ corresponden a las diferencias en los desplazamientos de ¹H, ¹⁵N y ¹³C entre parejas de picos de HNCO comparados y α_N y α_C son factores de escala de 0,2 y 0,33 necesarios para tener en cuenta las diferencias en el intervalo de los
- 35 desplazamientos químicos del protón de amida, nitrógeno de amida y carbono. Para cada pico de HNCO individual, se tomó el desplazamiento mínimo inducido por la unión de Fab como el valor de desplazamiento combinado más bajo posible ($\Delta\delta$).

$$\Delta\delta = \sqrt{(\Delta\delta_{HN})^2 + (\Delta\delta_N \cdot \alpha_N)^2 + (\Delta\delta_C \cdot \alpha_C)^2} \quad (\text{Ec. 1})$$

- 45 Para identificar los sitios de unión de Fab (epítopos) en la IL-6, se usó un histograma de desplazamiento mínimo combinado frente a secuencia de proteína para poner de manifiesto las regiones de IL-6 que contenían señales significativamente perturbadas. Si el tamaño del cambio de desplazamientos químicos combinados para aminoácidos individuales superaba un valor umbral de la media del cambio de los desplazamientos químicos combinados para todos los aminoácidos más una desviación típica de esta media, estos restos se seleccionaron para la posterior evaluación como posibles restos de contacto en el sitio de unión de Fab. Los emplazamientos de los restos del sitio de unión del candidato finalmente se examinaron en la estructura de alta resolución de IL-6 (Xu, G. Y. et al., (1997) *J Mol Biol* 268(2), 468-481) y solo los restos situados en la superficie de la proteína se consideró que estaban disponibles para la unión de Fab.

- Se aplicaron dos umbrales diferentes para identificar restos unidos por Fab, el desplazamiento mínimo medio + 1SD (0,143) y el desplazamiento mínimo medio +2SD (0,213). Se encontró que el sitio de unión del anticuerpo abarcaba el resto crítico identificativo del sitio 3 Trp157 (Boulanger et al., 2003, *Science*, 300, 2101-2104). Usando la numeración de aminoácidos usada en Boulanger et al., véase antes, se encontró que el anticuerpo 240g.1 se unía a al menos los siguientes restos (media +2SD (0,213)) S47, C50, E93, R104, F105, E106, T149, K150, A153, Q156,

Q159 y S169. El anticuerpo se puede unir a todos de los siguientes restos (media +1SD (0,143)) C44, S47, C50, S53, A58, E93, V96, R104, F105, E106, T149, K150, Q152, A153, Q154, N155, Q156, W157, Q159, T163, L165, S169 y E172.

5 Se apreciará que los mismos restos también se pueden numerar basándose en la numeración de aminoácidos del precursor no procesado de la IL-6 (número de acceso a Swiss Prot P05231). Usando esta numeración, el anticuerpo 240g.1 se une a al menos los siguientes restos S75, C78, E121, R132, F133, E134, T177, K178, A181, Q182, Q187 y S197. El anticuerpo puede unirse a todos de los siguientes restos C72, S75, C78, S81, A86, E121, V124, R132, F133, E134, T177, K178, Q180, A181, Q182, N183, Q184, W185, Q187, T191, L193, S197 y E200.

Tabla1 Parámetros básicos de experimentos de RMN.

Experimento	Dimensión indirecta	Anchura de barrido [ppm]	Offset de portadora [ppm]	Tiempo de adquisición [ms]
HNCACB y CBCA(CO)NH	¹⁵ N (F2)	35	117,5	23,4
	¹³ C (F1)	70	44,7	9,6 (6,6)
HNCO	¹⁵ N (F2)	35	117,5	23
	¹³ C (F1)	12	177,5	17,7
TROSY-HNCO	¹⁵ N (F2)	35	117,5	17,6
	¹³ C (F1)	14	177,5	17,6

10

La dimensión directa de ¹H (F3 o F2) se adquirió con una anchura de barrido de 14 ppm y tiempo de adquisición de 85 ms.

15

Debe entenderse, por supuesto, que la presente invención se ha descrito solo a modo de ejemplo, que no significa de ninguna forma que sea limitante, y que se pueden hacer modificaciones del detalle dentro del alcance de las reivindicaciones en lo sucesivo. Las características preferidas de cada realización de la invención son como para cada una de las demás realizaciones mutatis mutandis.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> UCB S.A. gelinas, richard popplewell, andrew adams, ralph singhal, mitra zhang, yi

5 <120> Moléculas de anticuerpo que tienen especificidad por la IL-6 humana

<130> A0018

<160> 22

10 <170> PatentIn versión 3.3

<210> 1

<211> 357

15 <212> ADN

<213> Rattus rattus

<400> 1

```

gagggtgcaaa ttttggagac tggaggaggc ttggtgaagc ccggtgggtc cctgagactg      60
tcttgtgcaa cgtctggatt caacttcaat gattatttca tgaactgggt ccgtcaggct      120
ccaggaagg gactagagtg gcttgctcaa atgagaaaca aaaattatca atatggcaca      180
tattatgctg agtctttgga aggcagagtc acagtctcac gagacgatgc caaaaacagt      240
gtctacctgc aagtgagcag ttttaagagct gaggacacgg ccatttatta ctgtacaaga      300
gagtcatact acggctttac ctctactgg ggccaaggag tcatgggtcac agtctctg      357
    
```

20

<210> 2

<211> 120

<212> PRT

25 <213> Rattus rattus

<400> 2

```

Glu Val Gln Ile Leu Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1           5           10           15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Asn Phe Asn Asp Tyr
          20           25           30

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

Ala Gln Met Arg Asn Lys Asn Tyr Gln Tyr Gly Thr Tyr Tyr Ala Glu
          50           55           60

Ser Leu Glu Gly Arg Val Thr Val Ser Arg Asp Asp Ala Lys Asn Ser
65           70           75           80

Val Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
          85           90           95

Tyr Cys Thr Arg Glu Ser Tyr Tyr Gly Phe Thr Ser Tyr Trp Gly Gln
          100          105          110

Gly Val Met Val Thr Val Ser Ser
115           120
    
```

30

ES 2 525 325 T3

<210> 3
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Rattus rattus

5

<400> 3
 gacatccaga tgacacagtc tcctgcctcc ctgtctgcat ctctggaaga aattgtcacc 60
 atcacatgcc aggcaagcca ggacattggt atttctttat catggtatca gcagaaacca 120
 gggaggactc ctcagctcct gatccaaaat gcaaacaact tggcagatgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gccgtagatt tggcacacag ttttctctta cgatcagtac accacagggt 240
 gaagatactg gagtctatta ctgtctccag cataatagtg ctccgtacac gtttggaaact 300
 gggacccagc tggaaatcaa a 321

10 <210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

15 <400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Glu
 1 5 10 15
 Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ile Ser
 20 25 30
 Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Thr Pro Gln Leu Leu Ile
 35 40 45
 Gln Asn Ala Asn Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Arg Arg Phe Gly Thr Gln Phe Ser Leu Thr Ile Ser Thr Pro Gln Val
 65 70 75 80
 Glu Asp Thr Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Ala Pro Tyr
 85 90 95
 Thr Phe Gly Thr Gly Thr Gln Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

20

<210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

25

<400> 5
 Gly Phe Asn Phe Asn Asp Tyr Phe Met Asn
 1 5 10

30 <210> 6
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Rattus rattus

35 <400> 6

ES 2 525 325 T3

Gln Met Arg Asn Lys Asn Tyr Gln Tyr Gly Thr Tyr Tyr Ala Glu Ser
1 5 10 15

Leu Glu Gly

5 <210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> Rattus rattus

10 <400> 7
Glu Ser Tyr Tyr Gly Phe Thr Ser Tyr
1 5

15 <210> 8
<211> 11
<212> PRT
<213> Rattus rattus

<400> 8

20 Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ile Ser Leu Ser
1 5 10

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
25 <213> Rattus rattus

<400> 9

30 Asn Ala Asn Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
35 <213> Rattus rattus

<400> 10

Leu Gln His Asn Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

40 <210> 11
<211> 120
<212> PRT
<213> Artificial

45 <220>
<223> gH13

<400> 11

ES 2 525 325 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Gln Met Arg Asn Lys Asn Tyr Gln Tyr Gly Thr Tyr Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Leu Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Tyr Tyr Gly Phe Thr Ser Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 12
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> gH13

<400> 12

gaagtccagc tcgttgagag tggcgggtggc ctggtccagc ccggtggatc actccgactg 60
 tcctgcgctg caagcgggtt taattttaat gattacttca tgaactgggt tcggcaggca 120
 cctggcaaag gcctggaatg ggtggctcag atgaggaaca agaattatca gtacgggaca 180
 tactatgccg agagtctgga ggaaggttc accatctcca gggacgattc taagaacagc 240
 ctctaccttc agatgaactc ttgaaaacc gaggacacag ccgtgtacta ttgtgctaga 300
 15 gaaagttatt acgggttcac atcttattgg ggacagggaa cctggtgac tgtctcgagc 360

<210> 13
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> gL10

25 <400> 13

ES 2 525 325 T3

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ile Ser
 20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Ala Pro Tyr
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 14
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Artificial

10 <220>
 <223> gL10

<400> 14

gatatccaga tgactcaatc acccagttcc ctgagcgcct ctgtcggcga cagggtgacc 60

atcacatgcc aggcctctca agacattggc atcagcctgt cctggtacca gcaaaaaccc 120

ggcaaggccc ctaagctcct gatctacaat gctaacaacc tggccgatgg cgtgcctagt 180

aggtttagcg ggtctggttc oggaacagat ttcacactca ccacagctc actgcagccc 240

gaggacttcg ccacttacta ttgcctgcag cacaacagcg cccctacac ctteggacaa 300

ggcactaaac tggagatcaa gcgt 324

15 <210> 15
 <211> 2008
 <212> ADN
 <213> Artificial

20 <220>
 <223> cadena pesada de 240g1

25 <400> 15

ES 2 525 325 T3

atggagtgga gctgggtgtt tttgttcttc ctgtccgtga ccacaggegt gcaactctgaa 60
gtccagctcg ttgagagtgg cgggtggcctg gtccagcccg gtggatcact ccgactgtcc 120
tgcgctgcaa gcggtttaa ttttaatgat tacttcatga actgggttcg gcaggcacct 180
ggcaaaggcc tggaatgggt ggctcagatg aggaacaaga attatcagta cgggacatac 240
tatgccgaga gtctggaggg aaggttcacc atctccaggg acgattctaa gaacagcctc 300
taccttcaga tgaactcttt gaaaaccgag gacacagccg tgtactattg tgctagagaa 360
agttattacg ggttcacatc ttattgggga cagggaaacc tggtgactgt ctcgagcgt 420
tctacaaagg gcccatccgt cttccccctg gcgccctgct ccaggagcac ctccgagagc 480
acagccgcc tgggtgcct ggtcaaggac tacttccccg aaccggtgac ggtgtcgtgg 540
aactcagcgg ccctgaccag cggcgtgac accttccccg ctgtcctaca gtccctcagga 600
ctctactccc tcagcagcgt ggtgaccgtg ccctccagca gcttgggpcac gaagacctac 660
acctgcaacg tagatcacia gccagcaac accaaggtgg acaagagagt tggtgagagg 720
ccagcacagg gagggaggggt gtctgctgga agccaggctc agccctcctg cctggacgca 780
ccccggctgt gcagccccag ccagggcag caaggcatgc cccatctgtc tctcaccgg 840
gaggcctctg accaccccac tcatgccag ggagagggtc ttctggattt ttccaccagg 900
ctccggcag ccacagcgtg gatgcccta cccagggccc tgcgcataca ggggcaggtg 960
ctgcgctcag acctgccaa agccatatec gggaggacc cgtcccctgac ctaagcccac 1020
cccaaaggcc aaactctoca ctccctcagc tcagacacct tctctcctcc cagatctgag 1080
taactcccaa tcttctctct gcagagtcca aatattgtcc cccatgccca ccatgccag 1140
gtaagccaac ccaggcctcg cctccagct caaggcggga caggtgccct agagtagcct 1200
gcatccaggg acaggcccca gccgggtgct gacgcatacca cctccatctc ttccctcagca 1260
cctgagttcc tggggggacc atcagtcttc ctgttcccc caaaacccaa ggacactctc 1320
atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc gtgggtgggg acgtgagcca ggaagacccc 1380
gaggtccagt tcaactggta cgtggatggc gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagccc 1440
cgggaggagc agttcaacag cacgtaccgt gtggtcagcg tctcaccgt cctgcaccag 1500
gactggctga acggcaagga gtacaagtgc aaggtctcca acaaaggcct cccgtcctcc 1560
atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggt gggaccacg gggtgcgagg gccacatgga 1620
cagaggtcag ctccggccac cctctgcctt gggagtgacc gctgtgcca cctctgtccc 1680
tacagggcag ccccgagagc cacaggtgta caccctgccc ccatcccagg aggagatgac 1740
caagaaccag gtcagcctga cctgcctggg caaaggcttc taccacagcg acatcgccgt 1800
ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga 1860
ctccgacggc tcttctctcc tctacagcag gctaaccgtg gacaagagca ggtggcagga 1920
ggggaatgct ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacacagaa 1980
gagcctctcc ctgtctctgg gtaaatga 2008

5 <210> 16
<211> 447

ES 2 525 325 T3

<212> PRT
<213> Artificial

<220>

5 <223> cadena pesada de 240g1

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Phe Asn Asp Tyr
20 25 30

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

Ala Gln Met Arg Asn Lys Asn Tyr Gln Tyr Gly Thr Tyr Tyr Ala Glu
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Glu Ser Tyr Tyr Gly Phe Thr Ser Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro
210 215 220

Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240

10

ES 2 525 325 T3

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
 245 250 255

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu
 260 265 270

Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
 275 280 285

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 290 295 300

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 305 310 315 320

Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile
 325 330 335

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
 340 345 350

Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu
 355 360 365

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
 370 375 380

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
 385 390 400

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 405 410 415

Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
 420 425 430

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440 445

<210> 17
 <211> 705
 5 <212> ADN
 <213> Artificial

<220>
 <223> cadena ligera de 240g1

10 <400> 17

ES 2 525 325 T3

atgagcgtgc ctaccaggt cctcggcctg ttgctgctct ggctgaccga tgcccgtgc 60
gatatccaga tgactcaatc acccagttcc ctgagcgcct ctgtcggcga cagggtgacc 120
atcacatgcc aggcctctca agacattggc atcagcctgt cctggtacca gcaaaaaccc 180
ggcaaggccc ctaagctcct gatctacaat gctaacaacc tggccgatgg cgtgcctagt 240
aggtttagcg ggtctggttc cggaacagat ttcacactca ccatcagctc actgcagccc 300
gaggacttcg ccacttacta ttgcctgcag cacaacagcg ccccctacac cttcggacaa 360
ggcactaaac tggagatcaa gcgtacggta gcggcccctat ctgtcttcat cttcccgcc 420
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtttgtg gcttgctgaa taacttctat 480
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgcc tccaatcggg taactcccag 540
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg 600
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc 660
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag 705

<210> 18
<211> 214
5 <212> PRT
<213> Artificial

<220>
10 <223> cadena ligera de 240g1

<400> 18

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Ile Ser
20 25 30

Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln His Asn Ser Ala Pro Tyr
85 90 95

ES 2 525 325 T3

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 19
 <211> 100
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp His
 20 25 30

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

Gly Arg Thr Arg Asn Lys Ala Asn Ser Tyr Thr Thr Glu Tyr Ala Ala
 50 55 60

10 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser
 65 70 75 80

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

Tyr Cys Ala Arg
 100

15 <210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20

ES 2 525 325 T3

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10 15

5 <210> 21
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 21

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85

15 <210> 22
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 22

20 Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por la IL-6 humana, que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia gH13 dada en la SEQ ID NO: 11 y una cadena ligera que comprende la secuencia gL10 dada en la SEQ ID NO: 13.
- 5 2. Un anticuerpo neutralizante que tiene especificidad por la IL-6 humana según la reivindicación 1, que tiene una cadena pesada que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 16 y una cadena ligera que comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 18.
3. Una secuencia de ADN aislada que codifica la o las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo según la reivindicación 1 o reivindicación 2.
- 10 4. Una secuencia de ADN aislada según la reivindicación 3, en la que la secuencia de ADN que codifica la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 15 o los nucleótidos 58-2008 de la SEQ ID NO: 15.
5. Una secuencia de ADN aislada según la reivindicación 4, en la que la secuencia de ADN que codifica la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 17 o los nucleótidos 61-705 de la SEQ ID NO: 17.
- 15 6. Un vector de clonación o de expresión que comprende una o más secuencias de ADN según una cualquiera de las reivindicaciones 3-5.
7. Un vector según la reivindicación 6, en donde el vector comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 15 y la secuencia dada en la SEQ ID NO: 17.
- 20 8. Una célula hospedante para la expresión de un anticuerpo según la reivindicación 1 o reivindicación 2, que comprende:
 - i) una secuencia de ADN que codifica la cadena pesada de dicho anticuerpo, y
 - ii) una secuencia de ADN que codifica la cadena ligera de dicho anticuerpo
 en donde las secuencias de ADN se proporcionan en uno o más vectores de clonación o expresión.
- 25 9. Una célula hospedante según la reivindicación 8, que comprende uno o más vectores de clonación o expresión según la reivindicación 6 o reivindicación 7.
10. Una célula hospedante según la reivindicación 8, en donde la secuencia de ADN que codifica la cadena pesada comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 12 o SEQ ID NO: 15 o los nucleótidos 58-2008 de la SEQ ID NO: 15.
- 30 11. Una célula hospedante según la reivindicación 10, en donde la secuencia de ADN que codifica la cadena ligera comprende la secuencia dada en la SEQ ID NO: 14 o SEQ ID NO: 17 o los nucleótidos 61-705 de la SEQ ID NO: 17.
12. Un procedimiento para la producción de un anticuerpo que tiene especificidad de unión por la IL-6 humana, que comprende cultivar la célula hospedante de la reivindicación 8 a 11 y aislar el anticuerpo.
- 35 13. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo según la reivindicación 1 o reivindicación 2, en combinación con uno o más de un excipiente, diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable.
14. Una composición farmacéutica según la reivindicación 13, que además comprende otros principios activos.
15. El anticuerpo de la reivindicación 1 o reivindicación 2, o la composición farmacéutica de la reivindicación 13 o reivindicación 14, para usar en terapia.
- 40 16. Un anticuerpo según la reivindicación 1 o reivindicación 2, o una composición farmacéutica según la reivindicación 13 o reivindicación 14, para usar en el tratamiento o profilaxis de un trastorno patológico seleccionado del grupo que consiste en infecciones (víricas, bacterianas, fúngicas y parasitarias), choque endotóxico asociado con infección, artritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil (AIJ) de inicio sistémico, lupus eritematoso sistémico (SLE), asma, enfermedad inflamatoria pélvica, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Castleman, espondilitis anquilosante, dermatomiositis, uveítis, enfermedad de Peyronie, enfermedad celíaca, enfermedad de la vesícula biliar, enfermedad pilonidal, peritonitis, psoriasis, vasculitis, adherencias quirúrgicas, accidente cerebrovascular, diabetes de tipo I, artritis de Lyme, meningoencefalitis, trastornos inflamatorios inmunomediados del sistema nervioso central y periférico, tales como la esclerosis múltiple y síndrome de Guillain-Barré, otros trastornos autoinmunitarios, pancreatitis, traumatismo (cirugía), enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplantes, cáncer (tanto tumores sólidos tales como melanomas, hepatoblastomas, sarcomas, carcinomas de células escamosas, cánceres
- 50

de células transicionales, cánceres de ovario, como tumores malignos hematológicos y, en particular, leucemia mielógena aguda, leucemia mielógena crónica, cáncer gástrico y cáncer de colon), enfermedades del corazón, incluyendo enfermedades isquémicas tales como el infarto de miocardio, así como aterosclerosis, coagulación intravascular, resorción ósea, pacientes con quemaduras, osteoporosis, periodontitis e hipoclorhidria.

5 17. El anticuerpo o composición farmacéutica según la reivindicación 16 para dicho uso, en donde el trastorno patológico se selecciona del grupo que consiste en artritis, artritis reumatoide, artritis psoriásica, artritis idiopática juvenil (AIJ) de inicio sistémico, lupus eritematoso sistémico (SLE), asma, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad de Castleman, espondilitis anquilosante y cáncer.

10 18. El anticuerpo o composición farmacéutica según la reivindicación 16 para dicho uso, en donde el trastorno patológico es la artritis reumatoide.

Figura 2

(a) Secuencia traducida de la cadena pesada de 240.g1, que muestra los límites intrón/exón

```

      10      20      30      40      50
ATG GAG TGG AGC TGG GTG TTT TTG TTC CTG TCC GTG ACC ACA GGC GTG CAC TCT
TAC CTC ACC TCG ACC CAC AAA AAC AAG AAG GAC AGG CAC TGG TGT CCG CAC GTG AGA
M E W S W V F L F F L S V T T G V H S>

      60      70      80      90      100     110
GAA GTC CAG CTC GTT GAG AGT GGC GGT GGC CTG GTC CAG CCC GST GGA TCA CTC CGA
CTT CAG GTC GAG CAA CTC TCA CCG CCA CCG GAC CAG GTC GGG CCA CCT AGT GAG GCT
E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R>

      120     130     140     150     160     170
CTG TCC TGC GCT GCA AGC GGG TTT AAT TTT AAT GAT TAC TTC ATG AAC TGG GTT CGG
GAC AGG ACG CGA CGT TCG CCC AAA TTA AAA TTA CTA ATG AAG TAC TTG ACC CAA GCC
L S C A A S G F N F N D Y F M N W V R>

      180     190     200     210     220
CAG GCA CCT GGC AAA GGC CTG GAA TGG GTG GCT CAG ATG AGG AAC AAG AAT TAT CAG
GTC CGT GGA CCG TTT CCG GAC CTT ACC CAC CGA GTC TAC TCC TTG TTC TTA ATA GTC
Q A P G K G L E W V A Q M R N K N Y Q>

230      240      250      260      270      280
TAC GGG ACA TAC TAT GCC GAG AGT CTG GAG GGA AGG TTC ACC ATC TCC AGG GAC GAT
ATG CCC TGT ATG ATA CCG CTC TCA GAC CTC CCT TCC AAG TGG TAG AGG TCC CTG CTA
Y G T Y Y A E S L E G R F T I S R D D>

      290     300     310     320     330     340
TCT AAG AAC AGC CTC TAC CTT CAG ATG AAC TCT TTG AAA ACC GAG GAC ACA GCC GTG
AGA TTC TTG TCG GAG ATG GAA GTC TAC TTG AGA AAC TTT TGG CTC CTG TGT CCG CAC
S K N S L Y L Q M N S L K T E D T A V>

      350     360     370     380     390
TAC TAT TGT GCT AGA GAA AGT TAT TAC GGG TTC ACA TCT TAT TGG GGA CAG GGA ACC
ATG ATA ACA CGA TCT CTT TCA ATA ATG CCC AAG TGT AGA ATA ACC CCT GTC CCT TGG
Y Y C A R E S Y Y G F T S Y W G Q G T>

400      410      420      430      440      450
CTG GTG ACT GTC TCG AGC GCT TCT ACA AAG GGC CCA TCC GTC TTC CCC CTG GCG CCC
GAC CAC TGA CAG AGC TCG CGA AGA TGT TTC CCG GGT AGG CAG AAG GGG GAC CGC GGG
L V T V S S A S T K G P S V F P L A P>

      460     470     480     490     500     510
TGC TCC AGG AGC ACC TCC GAG AGC ACA GCC GCC CTG GGC TGC CTG GTC AAG GAC TAC
ACG AGG TCC TCG TGG AGG CTC TCG TGT CCG CGG GAC CCG ACG GAC CAG TTC CTG ATG
C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y>

      520     530     540     550     560     570

```

ES 2 525 325 T3

TTC CCC GAA CCG GTG ACC GTG TCG TGG AAC TCA GGC GCC CTG ACC AGC GGC GTG CAC
AAG GGG CTT GGC CAC TGC CAC AGC ACC TTG AGT CCG CGG GAC TGG TCG CCG CAC GTG
F P E P V T V S W N S G A L T S G V H>

580 590 600 610 620
ACC TTC CCG GCT GTC CTA CAG TCC TCA GGA CTC TAC TCC CTC AGC AGC GTG GTG ACC
TGG AAG GGC CGA CAG GAT GTC AGG AGT CCT GAG ATG AGG GAG TCG TCG CAC CAC TGG
T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T>

630 640 650 660 670 680
GTG CCC TCC AGC AGC TTG GGC ACG AAG ACC TAC ACC TGC AAC GTA GAT CAC AAG CCC
CAC GGG AGG TCG TCG AAC CCG TGC TTC TGG ATG TGG ACG TTG CAT CTA GTG TTC GGG
V P S S S L G T K T Y T C N V D H K P>

690 700 710 720 730 740 750
AGC AAC ACC AAG GTG GAC AAG AGA GTT G GTCAGAGGCCAGCACAGGGAGGGGTCTCTGCTGGA
TCG TTG TGG TTC CAC CTG TTC TCT CAA C CACTCTCCGGTCGTGTCCTCCCTCCACAGACGACCT
S N T K V D K R V>

760 770 780 790 800 810 820
AGCCAGGCTCAGCCCTCCTGCCTGGACGCACCCCGGCTGTGCAGCCCCAGCCAGGGCAGCAAGGCATGCCCCAT
TCGGTCCGAGTCGGGAGGACGGACCTGCGTGGGGCCGACACGTCCGGGTCCGGTCCCGTCCGTCCGACGGGTA

830 840 850 860 870 880 890 900
CTGTCTCCTCACCCTGGAGGCTCTGACCACCCCACTCATGCCAGGGAGAGGGTCTTCTGGATTTTCCACCAGG
GACAGAGAGTGGGCTCCGGAGACTGGTGGGGTGACTACGGGTCCCTCTCCAGAAAGACTAAAAAGGTGCTCC

910 920 930 940 950 960 970
CTCCGGGACGCCACAGGCTGGATGCCCTACCCCAAGCCCTGCGCATAAGGGGACGGTGTGCGCTCAGACCTG
GAGGCCCGTCCGTGTCGGACCTACGGGGATGGGGTCCGGGACCGGTATGTCCCGTCCACGACCGGATCTGGAC

980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050
CCAAGAGCCATATCCGGGAGGACCCCTGCCCTGACCTAAGCCCACCCCAAGGCCAAACTCTCCACTCCCTCAGC
GGTCTCGGTATAGGCCCTCCTGGGACGGGACTGGATTCCGGGTGGGGTTCCGGTTGAGAGGTGAGGGAGTCG

1060 1070 1080 1090 1100 1110
TCAGACACCTTCTCTCCTCCAGATCTGAGTAACTCCCAATCTTCTCTGTCAG AG TCC AAA TAT GGT
AGTCTGTGGAAGAGAGAGGGTCTAGACTCATTGAGGGTTAGAAGAGAGACGTC TC AGG TTT ATA CCA
E S K Y G>

1120 1130 1140
CCC CCA TGC CCA CCA TGC CCA G
GGG GGT ACG GGT GGT ACG GGT C
P P C P P C P>

1150 1160 1170 1180 1190 1200
GTAAGCCAACCCAGGCCTCGCCCTCCAGCTCAAGGCGGGACAGGTGCCCTAGAGTAGCCT
CATTCGGTTGGGTCCGGAGCGGAGGTCCGAGTCCCGCCCTGTCCACGGGATCTCATCGGA

1210 1220 1230 1240 1250
GCATCCAGGGACAGGCCCCAGCCGGGTGCTGACGCATCCACCTCCATCTTTCCTCAG CA CCT GAG TTC

ES 2 525 325 T3

CGTAGGTCCCTGTCCGGGGTCCGCCACGACTCCGTAGGTGGAGGTAGAGAAGGAGTC GT GGA CTC AAG
 A P E F>

1270 1280 1290 1300 1310 1320
 CTG GGG GGA CCA TCA GTC TTC CTG TTC CCC CCA AAA CCC AAG GAC ACT CTC ATG ATC
 GAC CCC CCT GGT AGT CAG AAG GAC AAG GGG GGT TTT GGG TTC CTG TGA GAG TAC TAG
 L G G P S V F L F P P K P K D T L M I>

1330 1340 1350 1360 1370 1380
 TCC CGG ACC CCT GAG GTC ACG TGC GTG GTG GTG GAC GTG AGC CAG GAA GAC CCC GAG
 AGG GCC TGG GGA CTC CAG TGC ACG CAC CAC CAC CTG CAC TCG GTC CTT CTG GGG CTC
 S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E>

1390 1400 1410 1420 1430 1440
 GTC CAG TTC AAC TGG TAC GTG GAT GGC GTG GAG GTG CAT AAT GCC AAG ACA AAG CCG
 CAG GTC AAG TTG ACC ATG CAC CTA CCG CAC CTC CAC GTA TTA CCG TTC TGT TTC GGC
 V Q P N W Y V D G V E V H N A K T K P>

1450 1460 1470 1480 1490
 CGG GAG GAG CAG TTC AAC AGC ACG TAC CGT GTG GTC AGC GTC CTC ACC GTC CTG CAC
 GCC CTC CTC GTC AAG TTG TCG TGC ATG GCA CAC CAG TCG CAG GAG TGG CAG GAC GTG
 R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H>

1500 1510 1520 1530 1540 1550
 CAG GAC TGG CTG AAC GGC AAG GAG TAC AAG TGC AAG GTC TCC AAC AAA GGC CTC CCG
 GTC CTG ACC GAC TTG CCG TTC CTC ATG TTC ACG TTC CAG AGG TTG TTT CCG GAG GGC
 Q D W L N G K E Y K C K V S N K G L P>

1560 1570 1580
 TCC TCC ATC GAG AAA ACC ATC TCC AAA GCC AAA G
 AGG AGG TAG CTC TTT TGG TAG AGG TTT CGG TTT C
 S S I E K T I S K A K>

1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650
 GTGGGACCCACGGGGTCCGAGGGCCACATGGACAGAGGTCAGCTCGGCCACCCCTCTGCCCT
 CACCCTGGGTGCCACGCTCCCGGTGTACCTGTCTCCAGTCGAGCCGGGTGGGAGACGGGA

1660 1670 1680 1690 1700 1710
 GGGAGTGACCGCTGTGCCAACCTCTGTCCCTACAG GG CAG CCC CGA GAG CCA CAG GTG TAC ACC
 CCCTCACTGGCGACACGGTTGGAGACAGGGATGTC CC GTC GGG GCT CTC GGT GTC CAC ATG TGG
 G Q P R E P Q V Y T>

1720 1730 1740 1750 1760 1770
 CTG CCC CCA TCC CAG GAG GAG ATG ACC AAG AAC CAG GTC AGC CTG ACC TGC CTG GTC
 GAC GGG GGT AGG GTC CTC CTC TAC TGG TTC TTG GTC CAG TCG GAC TGG ACG GAC CAG
 L P P S Q E E M T K N Q V S L T C L V>

1780 1790 1800 1810 1820
 AAA GGC TTC TAC CCC AGC GAC ATC GCC GTG GAG TGG GAG AGC AAT GGG CAG CCG GAG
 TTT CCG AAG ATG GGG TCG CTG TAG CCG CAC CTC ACC CTC TCG TTA CCC GTC GGC CTC
 K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E>

ES 2 525 325 T3

```

1830      1840      1850      1860      1870      1880
AAC AAC TAC AAG ACC ACG CCT CCC GTG CTG GAC TCC GAC GGC TCC TTC TTC CTC TAC
TTG TTG ATG TTC TGG TGC GGA GGG CAC GAC CTG AGG CTG CCG AGG AAG AAG GAG ATG
N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y>

1890      1900      1910      1920      1930      1940
AGC AGG CTA ACC GTG GAC AAG AGC AGG TGG CAG GAG GGG AAT GTC TTC TCA TGC TCC
TCG TCC GAT TGG CAC CTG TTC TCG TCC ACC GTC CTC CCC TTA CAG AAG AGT ACG AGG
S R L T V D K S R W Q E G N V F S C S>

1950      1960      1970      1980      1990
GTG ATG CAT GAG GCT CTG CAC AAC CAC TAC ACA CAG AAG AGC CTC TCC CTG TCT CTG
CAC TAC GTA CTC CGA GAC GTG TTG GTG ATG TGT GTC TTC TCG GAG AGG GAC AGA GAC
V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S L>

2000
GGT AAA TGA
CCA TTT ACT
G K *>

```

(b) Cadena ligera

```

10      20      30      40      50      60
ATG AGC GTG CCT ACC CAG GTC CTC GGC CTG TTG CTG CTC TGG CTG ACC GAT GCC CGC TGC GAT
TAC TCG CAC GGA TGG GTC CAG GAG CCG GAC AAC GAC GAG ACC GAC TGG CTA CGG GCG ACG CTA
M S V P T Q V L G L L L L W L T D A R C D>

70      80      90      100      110      120
ATC CAG ATG ACT CAA TCA CCC AGT TCC CTG AGC GCC TCT GTC GGC GAC AGG GTG ACC ATC ACA
TAG GTC TAC TGA GTT AGT GGG TCA AGG GAC TCG CGG AGA CAG CCG CTG TCC CAC TGG TAG TGT
I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T>

130      140      150      160      170      180
TGC CAG GCC TCT CAA GAC ATT GGC ATC AGC CTG TCC TGG TAC CAG CAA AAA CCC GGC AAG GCC
ACG GTC CGG AGA GTT CTG TAA CCG TAG TCG GAC AGG ACC ATG GTC GTT TTT GGG CCG TTC CGG
C Q A S Q D I G I S L S W Y Q Q K P G K A>

190      200      210      220      230      240      250
CCT AAG CTC CTG ATC TAC AAT GCT AAC AAC CTG GCC GAT GGC GTG CCT AGT AGG TTT AGC GGG
GGA TTC GAG GAC TAG ATG TTA CGA TTG TTG GAC CCG CTA CCG CAC GGA TCA TCC AAA TCG CCC
P K L L I Y N A N N L A D G V P S R F S G>

260      270      280      290      300      310
TCT GGT TCC GGA ACA GAT TTC ACA CTC ACC ATC AGC TCA CTG CAG CCC GAG GAC TTC GCC ACT
AGA CCA AGG CCT TGT CTA AAG TGT GAG TGG TAG TCG AGT GAC GTC GGG CTC CTG AAG CGG TGA
S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T>

320      330      340      350      360      370
TAC TAT TGC CTG CAG CAC AAC AGC GCC CCC TAC ACC TTC GGA CAA GGC ACT AAA CTG GAG ATC
ATG ATA ACG GAC GTC GTG TTG TCG CGG GGG ATG TGG AAG CCT GTT CCG TGA TTT GAC CTC TAG

```

ES 2 525 325 T3

Y Y C L Q H N S A P Y T F G Q G T K L E I>

380 390 400 410 420 430 440
AAG CGT ACG GTA GCG GCC CCA TCT GTC TTC ATC TTC CCG CCA TCT GAT GAG CAG TTG AAA TCT
TTC GCA TGC CAT CGC CGG GGT AGA CAG AAG TAG AAG GGC GGT AGA CTA CTC GTC AAC TTT AGA
K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S>

 450 460 470 480 490 500
GGA ACT GCC TCT GTT GTG TGC CTG CTG AAT AAC TTC TAT CCC AGA GAG GCC AAA GTA CAG TGG
CCT TGA CGG AGA CAA CAC ACG GAC GAC TTA TTG AAG ATA GGG TCT CTC CGG TTT CAT GTC ACC
G T A S V V C L L N N F Y P R E A K V Q W>

 510 520 530 540 550 560
AAG GTG GAT AAC GCC CTC CAA TCG GGT AAC TCC CAG GAG AGT GTC ACA GAG CAG GAC AGC AAG
TTC CAC CTA TTG CGG GAG GTT AGC CCA TTG AGG GTC CTC TCA CAG TGT CTC GTC CTG TCG TTC
K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K>

570 580 590 600 610 620 630
GAC AGC ACC TAC AGC CTC AGC AGC ACC CTG ACG CTG AGC AAA GCA GAC TAC GAG AAA CAC AAA
CTG TCG TGG ATG TCG GAG TCG TCG TGG GAC TGC GAC TCG TTT CGT CTG ATG CTC TTT GTG TTT
D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K>

 640 650 660 670 680 690
GTC TAC GCC TGC GAA GTC ACC CAT CAG GGC CTG AGC TCG CCC GTC ACA AAG AGC TTC AAC AGG
CAG ATG CGG ACG CTT CAG TGG GTA GTC CCG GAC TCG AGC GGG CAG TGT TTC TCG AAG TTG TCC
V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R>

 700
GGA GAG TGT TAG
CCT CTC ACA ATC
G E C *>

Figura 3a

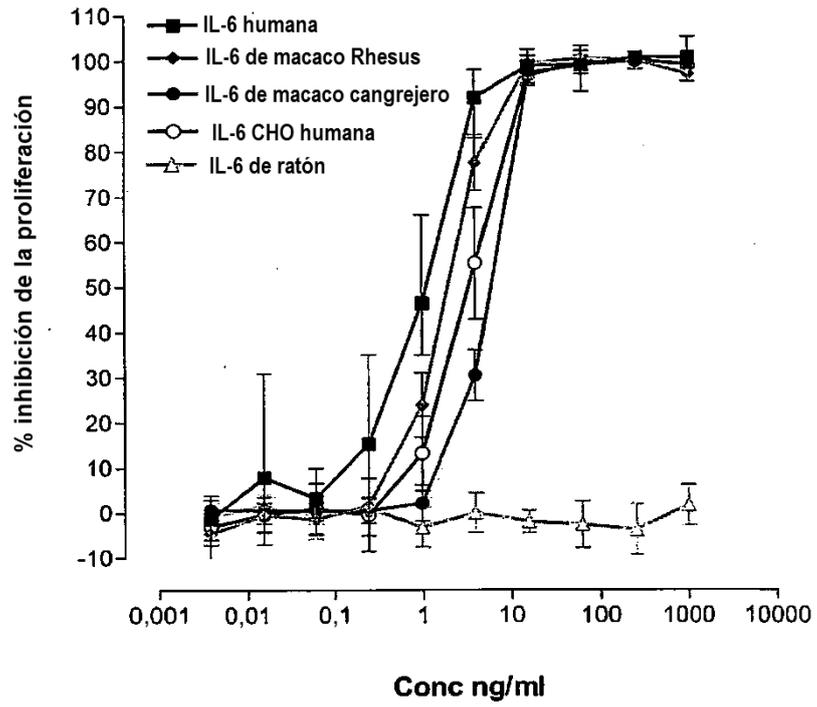


Figura 3b

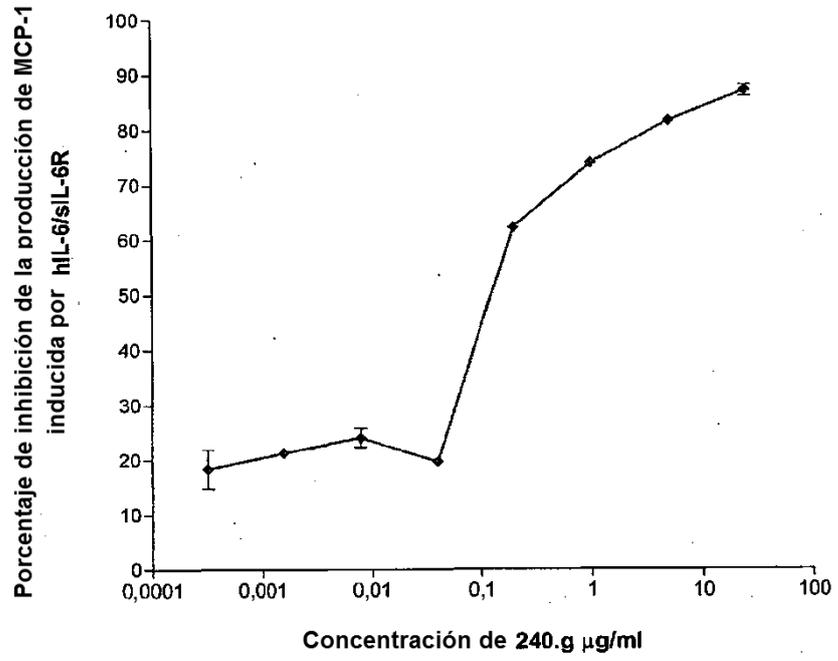


Figura 3c

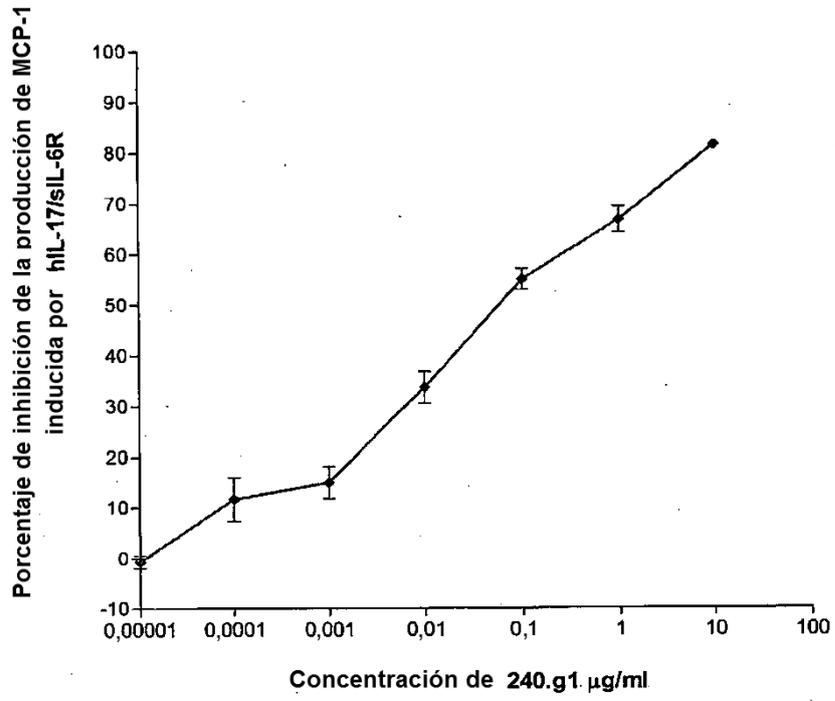


Figura 4

