

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 551 985**

51 Int. Cl.:

C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/567 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2006 E 06751915 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.04.2015 EP 1874351**

54 Título: **Anticuerpos anti-IL-6, compuestos métodos y usos**

30 Prioridad:

29.04.2005 US 676498 P
03.05.2005 US 677319 P

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

24.11.2015

73 Titular/es:

JANSSEN BIOTECH, INC. (50.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US y
APPLIED MOLECULAR EVOLUTION, INC. (50.0%)

72 Inventor/es:

CHEN, YAN;
GARDNER, DEBRA;
KNIGHT, DAVID M.;
LARK, MICHAEL W.;
LIANG, BAILIN;
SHEALY, DAVID J.;
SONG, XIAO-YU R.;
STOJANOVIC-SUSULIC, VEDRANA;
SWEET, RAYMOND W.;
TAM, SUSAN H.;
WU, SHENG-JIUN;
YANG, JING;
MARQUIS, DAVID MATTHEW;
SMITH, ERIC MICHAEL y
VASSEROT, ALAIN PHILIPPE

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 551 985 T3

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

DESCRIPCIÓN**Anticuerpos anti-IL-6, compuestos métodos y usos****ÁMBITO DEL INVENTO**

5 El presente invento trata de anticuerpos, incluidas las fracciones o variantes que se indican, específicas para por lo menos una proteína IL-6 o un fragmento de la misma, y ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos anti-IL-6, ácidos nucleicos complementarios, vectores, células hospedadoras y métodos para su creación y su uso, incluidas formulaciones terapéuticas, administración e instrumentos.

10 CONTEXTO

15 IL-6 es una citoquina pro inflamatoria pleiotrópica producida y segregada por una amplia variedad de tipos celulares, especialmente células que presentan antígenos, células T y B. IL-6 está implicada en actividades tan diversas como el crecimiento y diferenciación de células B, activación de células T, hematopoyesis, activación osteoclástica, crecimiento de queratinocitos, crecimiento neuronal y activación de hepatocitos. IL-6 se une a IL-6R de transmembrana o soluble y señala a través de gp130, compartido por otras citoquinas.

20 IL-6 juega un papel importante en las anomalías de células B, tal y como se demuestra en el lupus eritematoso sistémico, el mieloma múltiple y los trastornos linfoproliferativos. De forma similar, IL-6 también está implicada en la patogénesis de trastornos autoinmunes e inflamatorios como la artritis reumatoide y la osteoartritis. Recientemente, las pruebas indirectas sugieren una asociación entre IL-6 y trastorno obstructivo pulmonar crónico y resistencia a la insulina en diabetes de tipo 2. IL-6 tiene tanto efecto pro-inflamatorio como anti-inflamatorio en el sistema inmunológico, indicando que es probable que esta citoquina tenga un papel central en la regulación de la respuesta fisiológica a la enfermedad. Por lo tanto, IL-6 podría proporcionar beneficios terapéuticos en una amplia variedad de tipos de enfermedades.

25 Se ha observado un aumento en la producción de IL-6 en varias enfermedades, entre las que se incluyen: enfermedad de Alzheimer, trastornos autoinmunes, como artritis reumatoide, inflamación, infarto de miocardio, enfermedad de Paget, osteoporosis, tumores sólidos (carcinoma de célula renal), cánceres prostáticos y de vejiga, cánceres neurológicos y malignidad de célula B (por ejemplo, enfermedad de Castleman, ciertos linfomas, leucemia linfocítica crónica y mieloma múltiple). La investigación ha indicado que IL-6 está unida a la patogénesis de muchas de esas enfermedades, especialmente el cáncer y, por lo tanto, el bloqueo de IL-6 debería traducirse en beneficios en el ámbito clínico.

30 Se han desarrollado anticuerpos murinos, quiméricos y otros anti-IL-6 no humanos (por ejemplo, WO 2004/039826 y EP 0783893); de todas formas, podrían tener una potencia y eficacia limitadas, podrían activar con frecuencia una respuesta inmunitaria inaceptable (por ejemplo, inmunogenicidad) y/o necesitar una dosificación elevada (ver, Trikha et al., Clin. Can. Res. 9, 4653-4665, oct. 2003). Por ejemplo, los anticuerpos que contienen fracciones no humanas con frecuencia producen una respuesta inmunitaria en humanos. En consecuencia, la administración repetida de anticuerpos no es adecuada como terapia y la depuración de la circulación mediada por complejos inmunitarios de anticuerpos puede reducir la potencia/efectividad del anticuerpo. La enfermedad del suero y la anafilaxis son dos ejemplos de situaciones que puede provocar la administración repetida de anticuerpos con fracciones no humanas. A este respecto, se necesita un anticuerpo anti-IL-6 con un menor potencial para la inmunogenicidad, por ejemplo, más tolerable en humanos y que sea más potente de forma que necesite una dosis menor en comparación con los anticuerpos anti-IL-6 utilizados previamente.

RESUMEN DEL INVENTO

50 El invento proporciona un anticuerpo aislado IL-6, que incluye:
 (i) una secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera de SEC ID N°: 101 y una secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 103;
 (ii) una secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera de SEC ID N°: 124 y una secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 126;
 55 (iii) una secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera de SEC ID N°: 116 y una secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 118;
 (iv) una secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera de SEC ID N°: 120 y una secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 122;
 (v) una secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera de SEC ID N°: 128 y una secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 130; o
 60 (vi) una secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera de SEC ID N°: 97 y una secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada de SEC ID N°: 99;
 El invento también proporciona una molécula aislada de ácido nucleico que codifica un anticuerpo del invento.
 El invento también proporciona un vector aislado de ácido nucleico que incluye la molécula aislada de ácido nucleico del invento.
 65 El invento también proporciona una célula hospedadora procariótica o eucariótica que incluye la molécula aislada de ácido nucleico del invento.

El invento también proporciona un método para producir por lo menos un anticuerpo IL-6, que incluye el traslado de las moléculas de ácido nucleico del invento in vitro, in vivo o in situ, de forma que el anticuerpo IL-6 se exprese en cantidades detectables o recuperables.

5 El invento también proporciona un compuesto que incluye por lo menos un anticuerpo aislado IL-6 del invento y por lo menos un portador o diluyente aceptable farmacéuticamente.

El invento también proporciona una composición que incluye por lo menos un anticuerpo aislado IL-6 del invento para su uso en terapia.

10 El invento también proporciona un anticuerpo del invento para su uso en un método para el diagnóstico o tratamiento de una afección relacionada con IL-6 en una célula, tejido, órgano o animal, donde la afección relacionada con IL-6 se selecciona a partir del grupo de: obesidad, enfermedad inmunológica, enfermedad cardiovascular, enfermedad infecciosa o enfermedad maligna y una enfermedad neurológica.

15 El invento también proporciona un instrumento médico, que incluye un anticuerpo IL-6 del invento, donde dicho instrumento es adecuado para contactar o administrar dicho anticuerpo IL-6 por, como mínimo, una de las siguientes vías: parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelular, intracerebelosa, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocardial, intraosteal, intrapélvica, intrapericardiaca, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, intralesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, y transdérmica.

20 El invento también proporciona un artículo de fabricación para uso farmacéutico o diagnóstico humano, que incluye un material de empaquetado y un envase que incluye una solución o forma liofilizada de un anticuerpo IL-6 del invento.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

25 La Figura 1 muestra el enlace de anticuerpos de ingeniería humana y quiméricos anti-IL-6 a complejos IL-6/IL-6R.

La Figura 2 muestra el epítipo de enlace para el anticuerpo anti-IL-6 de ingeniería humana del presente invento.

La Figura 3 demuestra que el anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 inhibe la secreción de MCP-1 estimulado por IL-6 a partir de células U937 tal y como se han medido por ELISA.

30 La Figura 4 muestra que el anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 inhibe IL-6 y la secreción de SAA estimulada por IL-1 β a partir de células HepG2 tal y como se han medido por ELISA.

Las Figuras 5A y 5B muestran que el anticuerpo anti-IL-6 de ingeniería humana bloqueó la fosforilación de stat3 mediada por IL-6 de la forma medida por análisis de Western Blot que se ha mostrado a través de electroforesis de gel.

35 La Figura 6 muestra la inhibición por medio de anticuerpo anti-IL-6 de ingeniería humana y quimérico de producción de SAA humano IL-6-inducido en ratones Balb/C.

La Figura 7 muestra la inhibición de la producción de anticuerpos de anti-dsADN por anti-IL-6 mAb en ratones NZB/W F1.

La Figura 8A muestra el efecto de IL-6 en presencia y ausencia de anticuerpos anti-IL-6 de ingeniería humana sobre la fosforilación de Akt inducida por insulina.

40 La Figura 8B muestra un análisis por Western blot del efecto de IL-6 en presencia y ausencia de anticuerpos anti-IL-6 de fabricación humana sobre fosforilación de Akt inducida por insulina.

La Figura 9 muestra los resultados del ensayo de enlace de ELISA descrito en el Ejemplo 3.

La Figura 10 muestra los resultados de un ensayo de anti-proliferación utilizando la línea de célula dependiente IL-6 descrita en el Ejemplo 3.

45 La Figura 11A muestra activación de cinasa PI3 en hepatocitos de rata tratados con insulina, proteína IL-6 y anticuerpos anti-IL-6.

La Figura 11B muestra el control del estudio de la activación de cinasa PI3 en hepatocitos de rata.

La Figura 12A muestra el efecto de IL-6 sobre la señalización en hepatocitos de rata a respecto de la fosforilación inducida por insulina de IR.

50 La Figura 12B muestra el efecto de IL-6 sobre la señalización en hepatocitos de rata a respecto de la fosforilación inducida por insulina de Akt.

La Figura 13A muestra el nivel de glucosa en ratones DIO tras tratamiento con anticuerpo anti-IL-6.

La Figura 13B muestra el nivel de insulina en ratones DIO tras tratamiento con anticuerpo anti-IL-6.

55 La Figura 13C muestra el índice de la evaluación de modelo homeostático (HOMA) en ratones DIO tras tratamiento con anticuerpo anti-IL-6.

Las Figuras 14A-F muestran los niveles de lípidos antes y después de tratamiento con anticuerpo anti-IL-6.

La Figura 15 muestra el calendario de tratamiento de ratones con anti IL-6 mAb para una prueba intraperitoneal de tolerancia a la glucosa (ipGTT).

60 DESCRIPCIÓN DEL INVENTO

El presente invento proporciona anticuerpos anti-IL-6 aislados, recombinantes y/o sintéticos, así como compuestos y codificaciones de moléculas de ácido nucleico que incluye por lo menos un polinucleótido que codifica por lo menos un anticuerpo anti-IL-6. El presente invento también incluye, entre otros, métodos para crear y utilizar dichos ácidos nucleicos y anticuerpos, incluidos compuestos e instrumentos diagnósticos y terapéuticos.

65

De la forma en que se usa aquí, un “anticuerpo anti-IL-6”, “anticuerpo IL-6”, “fracción de anticuerpo anti-IL-6” o “fragmento de anticuerpo anti-IL-6” y/o “variante de anticuerpo anti-IL-6” y similares incluyen cualquier proteína o péptido que contenga moléculas que comprendan por lo menos una fracción de una molécula de inmunoglobulina, como por ejemplo, entre otras, por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una fracción de enlace a un ligando, una cadena pesada o región variable de cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región marco, o cualquier fracción de las mismas o por lo menos una fracción de un receptor IL-6 o proteína de enlace, que puede incorporarse a un anticuerpo del presente invento. Dicho anticuerpo también podría afectar a un ligando específico, como por ejemplo, entre otros, donde dicho anticuerpo module, disminuya, aumente, antagonice, agonice, mitigue, alivie, bloquee, inhiba, anule y/o interfiera con por lo menos una actividad o enlace IL-6, o con actividad de receptor IL-6 o enlace, in vitro, in situ y/o in vivo. A modo de ejemplo, un anticuerpo anti-IL-6 adecuado, fracción especificada o variante del presente invento puede enlazar por lo menos una molécula IL-6, o sus porciones especificadas, variantes o áreas de los mismos. Un anticuerpo anti-IL-6 adecuado, una porción especificada o una variante también podría afectar por lo menos a una de las actividades o funciones de IL-6, como por ejemplo, entre otros, ARN, ADN o síntesis de proteína, liberación de IL-6, señalización de receptor de IL-6, división de membrana IL-6, actividad de IL-6, producción de IL-6 y/o síntesis.

El término “anticuerpo” también incluye anticuerpos, fragmentos de digestión, fracciones y especificadas y sus variantes, incluidos similares a los anticuerpos o que incluye fracciones de anticuerpos que mimetizan la estructura y/o función de un anticuerpo o fragmento especificado o fracción del mismo, incluidos anticuerpos de cadena única y fragmentos de los mismos. Los fragmentos funcionales incluyen fragmentos de enlace de antígeno que se unen a un mamífero IL-6. Por ejemplo, fragmentos de anticuerpo capaces de enlazarse a IL-6 o fracciones de los mismos entre las que se incluyen, entre otros, Fab (por ejemplo, por digestión de papaína), Fab' (por ejemplo, por digestión de pepsina y reducción parcial) y F(ab')₂ (por ejemplo, por digestión de pepsina), facb (por ejemplo, por digestión de plasmina), pFc' (por ejemplo, por digestión de pepsina o plasmina), Fd (por ejemplo, por digestión de pepsina, reducción parcial y reagregación), fragmentos de Fv o scFv (por ejemplo, por técnicas de biología molecular), se encompasan por el invento (ver, por ejemplo, Colligan, Immunology, supra).

Dichos fragmentos pueden producirse por división enzimática, técnicas sintéticas o recombinantes, como las conocidas en este ámbito y/o como se describe en el presente documento. También se pueden producir anticuerpos en varias formas truncadas utilizando genes de anticuerpos en los que se ha introducido un codón de parada o más en dirección ascendente a respecto de la ubicación natural de parada. Por ejemplo, un gen de combinación que codifica una porción de cadena pesada F(ab')₂ pueden diseñarse para incluir secuencias de ADN que codifican el dominio CH₁ y/o la región de articulación de la cadena pesada. Las diversas porciones de anticuerpos pueden enlazarse químicamente por medio de técnicas convencionales o pueden prepararse como proteína contigua usando técnicas de ingeniería genética.

En el presente documento, el término “anticuerpo de ingeniería humana” es un anticuerpo con por lo menos marcos humanos completos y regiones constantes (dominios C_L, C_H (por ejemplo, C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}), y articulación), y CDRs derivados de anticuerpos de enlace de antígeno. Los marcos humanos completos incluyen marcos que se corresponden con secuencias de línea germinal humana así como secuencias con mutaciones somáticas. Los CDRs podrían derivarse de uno o más CDRs que se unen a IL-6 en el contexto de cualquier marco de anticuerpo. Por ejemplo, los CDRs de anticuerpo de ingeniería humana podrían derivarse de CDRs que unen IL-6 en el contexto de un marco de anticuerpo de ratón y a continuación se manipulan para enlazar IL-6 en el contexto de un marco humano completo. Con frecuencia el anticuerpo de ingeniería humana es sustancialmente no-inmunogénico en humanos.

De forma similar, los anticuerpos designan a primates (mono, mandril, chimpancé, etc.), roedores (ratón, rata, conejo, cobaya, hámster y semejantes) y otros mamíferos designan a dichos anticuerpos específicos de especies, sub-géneros, géneros, sub-familias, y familias. Además, los anticuerpos quiméricos pueden incluir cualquier combinación de los anteriores. Dichos cambios o variaciones podrían retener o reducir la inmunogenicidad en humanos y otras especies en relación con anticuerpos no modificados. Así, un anticuerpo de ingeniería humana es diferente de un anticuerpo quimérico o humanizado.

Se señala que se puede producir un anticuerpo de ingeniería humana por parte de un animal no humano o célula procariótica o eucariótica capaz de expresar genes de inmunoglobulina rearmada funcionalmente humana o de ingeniería humana (por ejemplo, cadena pesada y/o cadena ligera). Además, cuando un anticuerpo de ingeniería humana es un anticuerpo de cadena ligera, puede incluir un péptido vinculador que no se encuentra en anticuerpos nativos humanos. Por ejemplo, un Fv puede incluir un péptido vinculador, como desde dos hasta aproximadamente ocho glicinas u otros residuos de aminoácido, que conecta la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Se considera que dichos péptidos vinculadores son de origen humano.

Los biespecíficos, los heterospecíficos, heteroconjugados u otros anticuerpos similares también se pueden usar y son monoclonales, preferiblemente, humanos, de ingeniería humana, o humanizados, anticuerpos que tienen características de enlace para por lo menos dos antígenos diferentes. En este caso, una de las características de enlace se da por lo menos para una proteína IL-6, el otro es para cualquier otro antígeno. En este ámbito se conocen métodos para realizar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos

biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas pesadas tienen características diferentes (Milstein y Cuello, Nature 305:537 (1983)). Debido a la selección aleatoria de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 diferentes moléculas de anticuerpos, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta normalmente se realiza por pasos de cromatografía por afinidad. Se detallan procedimientos similares, por ejemplo, en WO 93/08829, Patentes de los EE. UU. n.º, 6210668, 6193967, 6132992, 6106833, 6060285, 6037453, 6010902, 5989530, 5959084, 5959083, 5932448, 5833985, 5821333, 5807706, 5643759, 5601819, 5582996, 5496549, 4676980, WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Traunecker et al, EMBO J. 10:3655 (1991), Suresh et al., Methods in Enzymology [Métodos de enzimología] 121:210 (1986).

Los anticuerpos anti-IL-6 útiles en los métodos y compuestos del presente invento podrían caracterizarse por uniones de alta afinidad a IL-6 y, opcional y preferiblemente, por tener un bajo nivel de toxicidad. En concreto, un anticuerpo, fragmento especificado o variante del invento, donde los componentes individuales, como la región variable, la región constante y el marco, de forma individual y/o colectiva, de forma opcional y preferiblemente poseen un bajo nivel de inmunogenicidad, es útil en el presente invento. Los anticuerpos que se pueden usar en el invento pueden ser caracterizados por su capacidad para tratar pacientes durante períodos prolongados con un alivio cuantificable de los síntomas y un nivel de toxicidad bajo y/o aceptable. Un nivel bajo o aceptable de inmunogenicidad y/o una alta afinidad, así como otras propiedades adecuadas, pueden contribuir a los resultados terapéuticos que se consigan. En este documento, "nivel bajo de inmunogenicidad" se define como la incidencia de niveles valorables de anticuerpos del anticuerpo anti-IL-6 en pacientes tratados con anticuerpo anti-IL-6 que se produce en menos del 25 % de los pacientes tratados y preferiblemente en menos del 10 % de los pacientes tratados con la dosis recomendada durante el curso recomendado de la terapia durante el período del tratamiento.

Los ácidos nucleicos aislados del presente invento pueden usarse para la producción de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 o una de sus variantes especificadas, que se puede usar para medir o incidir sobre una célula, tejido, órgano o animal (incluidos mamíferos y humanos), para diagnosticar, monitorizar, modular, tratar, aliviar, ayudar a prevenir la incidencia de, o reducir los síntomas de por lo menos una afección IL-6, seleccionada de entre el grupo (sin limitarla a él) de: trastorno o enfermedad inmunológica, trastorno o enfermedad cardiovascular, trastorno o enfermedad infecciosa, maligna y/o neurológica, u otra afección relacionada con IL-6 conocida o especificada. Dicho método puede incluir la administración de una cantidad eficaz de una composición o compuesto farmacéutico que incluye por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite dicha modulación, tratamiento, alivio, prevención, o reducción de los síntomas, efectos o mecanismos. La cantidad eficaz puede incluir una cantidad de aproximadamente entre 0,001 y 500 mg/kg por administración única (por ejemplo, bolo), múltiple o continua, o conseguir una concentración en suero de 0,01-5000 µg/ml por administración única, múltiple o continua o cualquier rango eficaz o valor del mismo, que se realizará y definirá utilizando métodos conocidos de la forma descrita en el presente documento o en las técnicas correspondientes.

Anticuerpos del presente invento – Producción y generación

Por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 del presente invento podría producirse por una línea de célula, una línea de célula mixta, una célula inmortalizada o una población clonal de células inmortalizadas, tal y como se conoce ampliamente. Ver, por ejemplo, Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology [Métodos actuales de biología molecular], John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual [Clonación molecular: manual de laboratorio], 2ª edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual [Anticuerpos, manual de laboratorio], Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology [Protocolos actuales de inmunología], John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science [Protocolos actuales de la ciencia de las proteínas], John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Los anticuerpos de ingeniería humana que son específicos de las proteínas humanas IL-6 o sus fragmentos pueden crearse contra un antígeno inmunogénico apropiado, como una proteína IL-6 aislada y/o una porción de la misma (incluidas las moléculas sintéticas, como los péptidos sintéticos).

Pueden crearse otros anticuerpos específicos o generales de mamíferos. La preparación de antígenos inmunogénicos y la producción de anticuerpos monoclonales puede llevarse a cabo utilizando cualquier técnica apropiada.

En una de las aproximaciones, se produce un hibridoma fusionando una línea de célula inmortal adecuada (por ejemplo, una línea de célula de mieloma, como por ejemplo, entre otras, Sp2/0, Sp2/0-AG14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, L243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SSI, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMALWA, NEURO 2A, u otros semejantes, o heteromilomas, productos de su fusión o cualquier célula o célula de fusión derivada de ellas, o cualquier otra línea de células adecuada, de la forma conocida en este ámbito) (ver, por ejemplo, www.atcc.org, www.lifetech.com, y otras similares), con anticuerpos que produzcan células, como por ejemplo, entre otras, bazo aislado o clonado, sangre periférica, linfa, amígdalas, u otra célula inmune o B que contenga células, o cualquier otra célula que exprese

cadena pesada o ligera constante o variable o marco o secuencias CDR, ya sea como ácido nucleico endógeno o heterólogo, recombinante o endógeno, viral, bacteriano, algal, procariótico, anfibio, insecto, reptil, pescado, mamífero, roedor, equino, ovino, cabra, oveja, primate, eucariota, ADN, cADN o rADN genómicos, ADN o ARN mitocondrial, ADN o ARN cloroplástico, hnARN, mARN, tARN, de cadena única, doble o triple, hibridizado y otros semejantes o cualquier combinación de los mismos. Ver, por ejemplo, Ausubel, supra, y Colligan, Immunology [Inmunología], supra, capítulo 2.

Los anticuerpos que producen células también pueden obtenerse a partir de la sangre periférica o, preferiblemente, del bazo o de los ganglios linfáticos, de humanos o de otros animales adecuados que hayan sido inmunizados con el antígeno de interés. Cualquier otra célula hospedadora adecuada también se puede usar para expresar ácido nucleico heterólogo o endógeno que codifica un anticuerpo, fragmento especificado o variante del mismo, del presente invento. Las células fusionadas (hibridomas) o células recombinantes pueden aislarse usando afecciones de cultivos selectivos u otros métodos conocidos adecuados, y clonarse por medio de dilución limitante o separación de células, o por otros métodos conocidos. Las células que producen anticuerpos con la especificidad buscada pueden seleccionarse por medio de un ensayo apropiado (por ejemplo, ELISA).

También se pueden usar métodos para la ingeniería o humanización de anticuerpos no-humanos o humanos y son bien conocidos en este ámbito. Un anticuerpo humanizado o procesado podría tener uno o más residuos de aminoácido a partir de una fuente que sea no-humana, por ejemplo, entre otros, ratones, ratas, conejos, primates no humanos u otros mamíferos. Estos residuos de aminoácidos no humanos a los que con frecuencia se denominan residuos "importados", que normalmente se obtienen de una variable "importada" o constante u otro ámbito de una secuencia humana conocida.

Se describen secuencias humanas conocidas de Ig, por ejemplo, en www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php; www.kabatdatabase.com/top.html; [ftp.ncbi.nih.gov/repository/kabat](ftp://ncbi.nih.gov/repository/kabat); www.sciquest.com; www.abcam.com; www.anticuerporesource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/~pedro/research_tools.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com; pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html; www.appliedbiosystems.com; www.nal.usda.gov/awic/pubs/anticuerpo; www.rn.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com; www.cancerresearchuk.org; www.biotech.ufl.edu; www.isac-net.org; baserv.uci.kun.nl/~jraats/linksl.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu; www.mrc-cpe.cam.ac.uk; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; <http://www.bioinf.org.uk/abs>; anticuerpo.bath.ac.uk; www.unizh.ch; www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.html; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/Stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.jerini.de; Rabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest [Secuencias de proteínas de interés inmunológico], Departamento de Salud de los EE. UU. (1983).

Dichas secuencias importadas pueden usarse para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar el enlace, afinidad, tasa de subida, tasa de bajada, avidéz, especificidad, media vida, o cualquier otra característica adecuada de las conocidas en la materia. En general, los residuos de CDR están implicados directa y notablemente en la influencia sobre el enlace de antígenos. En consecuencia, parte o todas las secuencias CDR no-humanas o humanas se mantienen mientras que las secuencias no-humanas de las regiones variables y constantes podrían sustituirse con aminoácidos humanos o de otros tipos.

Los anticuerpos también se podrían humanizar o procesar o los anticuerpos humanos procesarse con retención de alto nivel de afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, los anticuerpos procesados humanizados (o humanos) o los anticuerpos procesados podrían prepararse por medio de un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos humanizados conceptuales y procesados usando modelos tridimensionales de las secuencias parental, procesada y humanizada. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina suelen estar disponibles y son habituales para los expertos en la materia. Existen programas informáticos que ilustran y muestran posibles estructuras tridimensionales para secuencias seleccionadas de inmunoglobulina candidata. La inspección de estas visualizaciones permite el análisis del posible papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia candidata de inmunoglobulina, por ejemplo, el análisis de residuos que tienen influencia sobre la capacidad de la inmunoglobulina candidata de enlazar su antígeno. De esta forma, los residuos marco (FR) pueden seleccionarse y combinarse a partir del consenso e importar secuencias de forma que se consiga la característica deseada de los anticuerpos, como un aumento de la afinidad por el antígeno(s) objetivo.

Además, el anticuerpo IL-6 de ingeniería humana presentado en este documento podría incluir un marco de cadena ligera de línea germinal humana. En ciertas representaciones, la secuencia cadena ligera de línea germinal se selecciona a partir de secuencias de VK humano que incluyen, entre otras, A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, LI, L10, LI 1, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4, y O8. En ciertas representaciones, este marco de cadena ligera humana de línea germinal se selecciona a partir de VI-11, VI-13, VI-16, VI-17, VI-18, VI-19, VI-2, VI-20,

VI-22, VI-3, VI-4, VI- 5, VI-7, VI-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2- 8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4 y V5-6. Ver PCT WO 2005/005604 para una descripción de las diferentes secuencias de línea germinal.

5 En otras representaciones, el anticuerpo de ingeniería humana IL-6 descrito en este documento podría incluir un marco de línea germinal humana de cadena pesada. En ciertas representaciones, este marco de cadena pesada humana de línea germinal se selecciona a partir de VH1-18, VH1-2, VH1- 24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1 y VH7-81. Ver PCT WO 10 2005/005604 para una descripción de las diferentes secuencias de línea germinal.

En ciertas representaciones, la región variable de cadena ligera y/o la región variable de cadena pesada incluye una región marco o por lo menos una porción de una región marco (por ejemplo, que contenga 2 o 3 subregiones, como 15 FR2 y FR3). En ciertas representaciones, por lo menos FRL1, FRL2, FRL3, o FRL4 será completamente humano. En otras representaciones, por lo menos FRH1, FRH2, FRH3, o FRH4 es totalmente humano. En algunas representaciones, por lo menos FRL1, FRL2, FRL3, o FRL4 es una secuencia de línea germinal (por ejemplo, línea germinal humana) o incluye secuencias humanas de consenso para el marco concreto (disponible fácilmente en las fuentes de las secuencias conocidas de Ig humano descritas antes). En otras representaciones, por lo menos FRH1, 20 FRH2, FRH3, o FRH4 es una secuencia de línea germinal (por ejemplo, línea germinal humana) o incluye secuencias humanas de consenso para el marco concreto. En las representaciones preferidas, la región marco es una región marco humana (por ejemplo, las regiones de marco humano que se muestran en las Tablas 13 y 14). En algunas representaciones, la región marco incluye SECS con N° ID: 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, o combinaciones de las mismas.

25 La humanización o procesado de los anticuerpos del presente invento puede llevarse a cabo utilizando cualquier método conocido, como por ejemplo, entre otros, los descritos en, Winter (Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Verhoeven et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); 30 Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993), patentes de los EE. UU. N°: 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539; 4816567, PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, W090/14430, EP 229246.

35 En ciertas representaciones, el anticuerpo incluye una región Fc modificada (por ejemplo, mutada). Por ejemplo, en algunas representaciones, la región Fc se ha modificado para reducir o mejorar las funciones efectoras del anticuerpo. En algunas representaciones, la región Fc es un isotipo seleccionado a partir de IgM, IgA, IgG, IgE, u otro isotipo.

40 De forma alternativa o adicional, podría ser útil combinar modificaciones de aminoácido con una o más modificaciones de aminoácido que modifiquen el enlace de unión de Clq y/o la función de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) de la región Fc de una molécula de enlace con IL-6. El polipéptido de inicio de interés concreto podría ser uno que se una con Clq y muestre citotoxicidad dependiente de complementos. Los polipéptidos con actividad de enlace de Clq pre-existente, que podrían también tener la capacidad de mediar CDC, podrían 45 modificarse de forma que una de esas actividades o ambas se mejoren. Las modificaciones de aminoácidos que alteran Clq y/o modifican su función de citotoxicidad dependiente de complemento se describen, por ejemplo, en W00042072.

50 Tal y como se ha presentado, se puede diseñar una región de Fc de ingeniería humana de anticuerpo IL- 6 del presente invento con función efectora alterada, por ejemplo, modificando el enlace Clq y/o enlace de FcγR y por lo tanto cambiando la actividad CDC y/o la actividad ADCC. "Las funciones efectoras" son responsables de activar o disminuir una actividad biológica (por ejemplo, en un sujeto). Entre los ejemplos de funciones efectoras se incluyen, entre otros: enlace Clq; citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); enlace de receptor Fc; citotoxicidad mediada por célula dependiente de anticuerpo (ADCC); fagocitosis; regulación inferior de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptor de célula B; BCR), etc. Dichas funciones efectoras podrían necesitar que la región Fc 55 se combine con un dominio de enlace (por ejemplo, un dominio de anticuerpo variable) y puede evaluarse usando varios ensayos (por ejemplo, ensayos de enlace Fc, ensayos ADCC, ensayos CDC, etc.).

60 Por ejemplo, se puede generar una variante de región Fc de anticuerpo de ingeniería humana IL-6 con enlace de Clq mejorado y enlace de FcγRIII mejorado (por ejemplo, que tengan ambos actividad ADCC mejorada y actividad CDC mejorada). De forma alternativa, si se desea que la función efectora se reduzca o extirpe, una variante de región Fc puede modificarse con actividad de CDC reducida y/o actividad de ADCC reducida. En otras representaciones, solo una de esas actividades podría incrementarse, y, opcionalmente, también la otra actividad reducirse (por ejemplo, para generar una variante de región Fc con actividad de ADCC mejorada, pero con actividad CDC reducida y 65 viceversa).

Las mutaciones de Fc también se pueden modificar para cambiar su interacción con el receptor de Fc neonatal (FcRn) y mejorar sus propiedades farmacocinéticas. Se ha descrito una colección de variantes de Fc humano con enlace mejorado al FcRn (Shields et al., (2001). High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR [Mapeo de alta resolución de la ubicación de enlace en IgG1 humano para FcγRI, FcγRII, FcγRIII y FcRn y diseño de variantes de IgG1 con enlace mejorado al FcγR], J. Biol. Chem. 276:6591-6604).

Otro tipo de sustitución de aminoácido sirve para modificar el patrón de glucosilación de la región de Fc de anticuerpo IL-6 de ingeniería humana. La glucosilación de una región de Fc normalmente de enlace-N o de enlace-O. Enlace-N hace referencia al enlace de la fracción del carbohidrato a la cadena lateral de un residuo de asparagina. La glucosilación de enlace-O se refiere al enlace de uno de los azúcares N-aceilgalactosamina, galactosa, o xilosa a un hidroxiaminoácido, los más habituales serina o treonina, aunque también se podrían utilizar 5-hidroxiprolina o 5-hidroxilisina. Las secuencias de reconocimiento de unión enzimática de la fracción de carbohidrato a las secuencias péptidas de la cadena lateral de asparagina son asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina. De esa forma, la presencia de cualquiera de esas secuencias de péptidos en un polipéptido crea una ubicación potencial de glucosilación.

El patrón de glucosilación podría verse alterado, por ejemplo, al eliminar una o más ubicaciones de glucosilación encontradas en el polipéptido, y/o añadir una o más ubicaciones de glucosilación que no están presentes en el polipéptido. La adición de ubicaciones de glucosilación a la región de Fc de un anticuerpo de ingeniería humana IL-6 se consigue satisfactoriamente modificando la secuencia de aminoácido de forma que contenga una o más de las anteriormente descritas secuencias de tripéptidos (para ubicaciones de glucosilación de enlace-N). Una variante de glucosilación ejemplar tiene una sustitución de residuo de aminoácido de Asn 297 de la cadena pesada. La alteración también podría hacerse por medio de la adición de, o sustitución por, uno o más residuos de serina o treonina a la secuencia del polipéptido original (para ubicaciones de glucosilación de enlace-O). De manera adicional, un cambio de Asn 297 a Ala puede retirar una de las ubicaciones de glucosilación.

En ciertas representaciones, el anticuerpo IL-6 del presente invento se expresa en células que expresan beta (1,4)-N-acetilglucosaminiltransferasa III (GnT III), de forma que GnT III añade GlcNAc al anticuerpo IL-6. Se proporcionan métodos para producir anticuerpos de esa forma en WO/9954342, WO/03011878, documento de patente 20030003097A1, y Umana et al., Nature Biotechnology [Biotecnología de la naturaleza], 17:176-180, feb. 1999. Un anticuerpo humano anti-IL-6 podría generarse por inmunización de un animal transgénico (por ejemplo, ratón, rata, hámster, primate no humano y otros similares) capaz de producir un repertorio de anticuerpos humanos, tal y como se describe en este documento o de la forma conocida en este ámbito. Las células que producen un anticuerpo humano anti-IL-6 pueden aislarse de dichos animales e inmortalizarse usando métodos adecuados, como los métodos descritos en este documento.

Los ratones transgénicos que pueden producir un repertorio de anticuerpos humanos que se unen a antígenos humanos pueden producirse por métodos conocidos (por ejemplo, entre otros, Patentes de los EE. UU. Nº: 5.770.428, 5.569.825, 5.545.806, 5.625.126, 5.625.825, 5.633.425, 5.661.016 y 5.789.650 publicado en Lonberg et al.; Jakobovits et al. WO 98/50433, Jakobovits et al. WO 98/24893, Lonberg et al. WO 98/24884, Lonberg et al. WO 97/13852, Lonberg et al. WO 94/25585, Kucherlapate et al. WO 96/34096, Kucherlapate et al. EP 0463 151 BI, Kucherlapate et al. EP 0710 719 AI, Surani et al. Patente de EE. UU. Nº 5.545.807, Bruggemann et al. WO 90/04036, Bruggemann et al. EP 0438 474 BI, Lonberg et al. EP 0814 259 A2, Lonberg et al. GB 2 272 440 A, Lonberg et al. Nature 368:856-859 (1994), Taylor et al., Int. Immunol. 6(4):579-591 (1994), Green et al, Nature Genetics 7:13-21 (1994), Mendez et al., Nature Genetics 15:146-156 (1997), Taylor et al., *Nucleic Acid Research [Investigación de ácido nucleico]* 20(23):6287-6295 (1992), Tuailon et al., Proc Natl Acad Sci USA 90(8):3720-3724 (1993), Lonberg et al., Int Rev Immunol 13(1):65-93 (1995) y Fishwald et al., Nat Biotechnol 14(7):845-851 (1996)). Generalmente, estos ratones incluyen por lo menos un transgen que incluye ADN de por lo menos un lugar de inmunoglobulina humana que está reorganizado funcionalmente, o que puede reorganizarse funcionalmente. Las ubicaciones de inmunoglobulina endógena en dichos ratones pueden alterarse o borrarse para eliminar la capacidad del animal de producir anticuerpos codificados por genes endógenos.

La investigación de anticuerpos para enlace específico a proteínas similares o fragmentos puede conseguirse de forma adecuada usando bibliotecas de péptidos. Este método implica la investigación de grandes colecciones de péptidos buscando miembros individuales que tengan la función o estructura deseadas. La investigación de anticuerpos sobre bibliotecas de péptidos es bien conocida en este ámbito. Las secuencias de péptidos mostradas pueden tener una longitud de entre 3 y 5000 o más aminoácidos, frecuentemente entre 5-100 aminoácidos, y muchas veces entre 8 y 25 aminoácidos de longitud. Además de los métodos sintéticos químicos directos para generar bibliotecas de péptidos, se han descrito varios métodos de ADN recombinante. Un tipo implica la exposición de una secuencia de péptido en la superficie de un bacteriófago o célula. Cada bacteriófago o célula contiene la secuencia de nucleótido que codifica la secuencia de péptido concreta que se presenta. Dichos métodos se describen en las publicaciones de patentes PCT nº 91/17271, 91/18980, 91/19818 y 93/08278.

Otros sistemas para generar bibliotecas de péptidos tienen aspectos tanto de métodos de síntesis química in vitro y recombinantes. Véanse las publicaciones de patentes PCT nº 92/05258, 92/14843 y 96/19256. Véanse también las patentes de los EE. UU. Nº 5.658.754 y 5.643.768. Las bibliotecas de presentación de péptidos, vectores y kits de

investigación se encuentran disponibles comercialmente de proveedores como Invitrogen (Carlsbad, CA) y Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, Reino Unido). Ver, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. n° 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456, asignado a Enzon; 5223409, 5403484, 5571698, 5837500, asignado a Dyax, 5427908, 5580717, asignado a Afrymax; 5885793, asignado a Cambridge Antibody Technologies; 5750373, asignado a Genentech, 5618920, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417, asignado to Xoma, Colligan, supra; Ausubel, supra; o Sambrook, supra. Los anticuerpos del presente invento también se pueden preparar usando por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 que codifica ácido nucleico para producir animales transgénicos o mamíferos, como cabras, vacas, caballos, ovejas, conejos y similares, que producen dichos anticuerpos en su leche. Dichos animales pueden proporcionarse usando métodos conocidos. Véanse, por ejemplo, entre otros, patentes de los EE. UU. N° 5.827.690; 5.849.992; 4.873.316; 5.849.992; 5.994.616; 5.565.362; 5.304.489 y otros similares presentados en este documento.

Los anticuerpos presentados en este documento pueden también prepararse usando por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 que codifica ácido nucleico para proporcionar plantas transgénicas y células de plantas cultivadas (por ejemplo, entre otras, tabaco y maíz) que producen dichos anticuerpos, porciones especificadas o variantes de las partes de las plantas o en células cultivadas de los mismos. Únicamente a modo de ejemplo, las hojas de tabaco transgénico que expresan proteínas recombinantes se han usado con éxito para proporcionar grandes cantidades de proteínas recombinantes, por ejemplo, usando un impulsor inducible. Véase, por ejemplo, Cramer et al., Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95-118 (1999) y referencias allí citadas. Además, el maíz transgénico se ha usado para expresar proteínas de mamíferos a niveles de producción comercial, con actividades biológicas equivalentes a las producidas en otros sistemas recombinantes o purificadas a partir de fuentes naturales. Ver, por ejemplo, Hood et al., Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 (1999) y referencias allí citadas. Los anticuerpos también se han producido en grandes cantidades a partir de semillas de plantas transgénicas que incluyen fragmentos de anticuerpo, como anticuerpos de cadena única (scFv's), incluidas las semillas de tabaco y tubérculo de patata. Véase, por ejemplo, Conrad et al., Plant Mol. Biol. 38:101-109 (1998) y referencias allí citadas. Así, los anticuerpos del presente invento también pueden producirse usando plantas transgénicas, de acuerdo con métodos conocidos. Ver también, por ejemplo, Fischer et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108 (oct., 1999), Ma et al, Trends Biotechnol. 13:522-7 (1995); Ma et al., Plant Physiol. 109:341-6 (1995); Whitelam et al., Biochem. Soc. Trans. 22:940-944 (1994); y referencias allí citadas.

Los anticuerpos presentados aquí pueden enlazar IL-6 humano con una amplia gama de afinidades (K_d). En una de las representaciones preferidas, por lo menos un mAb humano del presente invento podría enlazar IL-6 humano con alto nivel de afinidad. Por ejemplo, un mAb humano de ingeniería humana puede enlazar a IL-6 humano con un K_D igual o menor de aproximadamente 10⁻⁷ M, como por ejemplo, entre otros, 0,1-9,9 (o cualquier rango o valor del mismo) X 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰, 10⁻¹¹, 10⁻¹², 10⁻¹³, 10⁻¹⁴, 10⁻¹⁵ o cualquier rango o valor de los mismos, determinado por resonancia plasmónica de la superficie o el método Kinexa, practicado por expertos en la materia.

La afinidad o aidez de un anticuerpo por un antígeno puede determinarse de forma experimental usando cualquier método adecuado. (Véase, por ejemplo, Berzofsky, et al, "Anticuerpo-Antigen Interactions" [Interacciones anticuerpo-antígeno] en *Fundamental Immunology* [Inmunología fundamental], Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kuby, Janis *Immunology* [Inmunología], W. H. Freeman y Company: New York, NY (1992); y los métodos allí descritos). La afinidad medida de una interacción concreta anticuerpo-antígeno puede variar si se mide bajo afecciones diferentes (por ejemplo, concentración salina, pH). Así, la medición de afinidad y otros parámetros relacionados con el enlace de antígenos (por ejemplo, K_D, K_{on}, K_{off}) preferiblemente se realizan con soluciones estandarizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón estandarizado, como el descrito en el presente documento.

Pueden llevarse a cabo ensayos competitivos con el anticuerpo del presente invento para determinar qué proteínas, anticuerpos, y otros antagonistas compiten por enlazarse a IL-6 con el anticuerpo del presente invento y/o comparten la región de epítipo. Estos ensayos conocidos por cualquiera que tenga un conocimiento normal de la materia evalúan la competición entre antagonistas o ligandos por un número limitado de ubicaciones de enlace en una proteína. La proteína y/o anticuerpo se ha inmovilizado o insolubilizado antes o después de la competición y la muestra enlazada a IL-6 se separa a partir de la muestra no enlazada, por ejemplo, decantando (donde la proteína/anticuerpo se ha preinsolubilizado) o centrifugando (donde la proteína/anticuerpo se precipitó tras la reacción competitiva). Además, el enlace competitivo podría verse determinado por si la función se ver alterada por el enlace o falta de enlace del anticuerpo a la proteína, por ejemplo, si la molécula del anticuerpo inhibe o potencia la actividad enzimática de, por ejemplo, una etiqueta. Podrían usarse ELISA y otros ensayos funcionales, como se conoce en este ámbito.

Los anticuerpos anti-IL-6 presentados en este documento tienen las secuencias que se muestran en las Tablas 1-5 y 12-14. Por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-6 presentado en este documento tiene una de las secuencias de cadena ligera CDR secuencias que se muestran en la Tabla 1 (por ejemplo, CDRL1, CDRL2 y CDRL3) y una de las secuencias de la cadena pesada CDR que se muestran en la Tabla 2 (por ejemplo, CDRH1, CDRH2 y CDRH3). Más específicamente, un anticuerpo anti-IL-6 (molécula AME- A9) tiene el CDRL1 de la SEC ID N°: 15, CDRL2 de la SEC ID N°: 27, CDRL3 de la SEC ID N°: 35, CDRH1 de la SEC ID N°:4 7, CDRH2 de la SEC ID N°: 61, CDRH3 de la SEC ID N°:9 1.

Moléculas de ácido nucleico

Usando la información que se proporciona en este documento, por ejemplo, las secuencias de nucleótidos que codifican por lo menos 70-100 % de los aminoácidos contiguos de por lo menos una de las regiones variables de cadenas ligeras de SEC ID N°: 93, 97 y 101, entre otras secuencias presentadas aquí, y por lo menos una de las regiones variables de la cadena pesada de SEC ID N°: 95, 99 y 103, entre otras secuencias presentadas aquí, fragmentos especificados, variantes o secuencias de consenso de los mismos, o un vector depositado que incluye por lo menos una de esas secuencias, una molécula de ácido nucleico del presente invento que codifica por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 puede obtenerse usando descritos en el presente documento o por técnicas conocidas.

Las moléculas de ácido nucleico del presente invento pueden estar en forma de ARN, como mARN, hnARN, tARN o cualquier otra forma, o en forma de ADN, incluidos, entre otros, cADN y ADN genómico obtenido por clonación o producido sintéticamente, o cualquier combinación de los mismos. El ADN puede ser de triple cadena, de doble cadena o de cadena única o cualquier combinación de los anteriores. Cualquier porción de por lo menos una cadena del ADN o ARN puede ser la cadena de codificación, también conocida como cadena de sentido, o puede ser la cadena de no codificación, también denominada cadena anti-sentido.

Las moléculas de ácido nucleico aisladas presentadas en este documento pueden incluir moléculas de ácido nucleico que incluye un marco de lectura abierto (ORF), opcionalmente, con un intrón o más, por ejemplo, entre otros, por lo menos una porción especificada de por lo menos un CDR, como CDR1, CDR2 y/o CDR3 de por lo menos una cadena pesada (por ejemplo, SEC ID N°: 38, 40, 42, 44, etc.) o cadena ligera (por ejemplo, SEC ID N°: 2, 4, 6, 8, etc.); moléculas de ácido nucleico que incluyen la secuencia de codificación de un anticuerpo anti-IL-6 o región variable (por ejemplo, región variable de cadena ligera de SEC ID N°: 94, 98 y 102, entre otras secuencias presentadas en este documento, y regiones variables de cadena pesada de SEC ID N°: 96, 100 y 104); y moléculas de ácido nucleico que incluyen una secuencia de nucleótido claramente diferente de las descritas anteriormente que, debido a la degeneración del código genético, siguen codificando por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 como se describe en este documento y/o como se conoce en este ámbito. Por supuesto, el código genético es bien conocido en esta técnica. Así, sería rutinario para alguien experto en la materia generar dichas variantes de ácido nucleico degenerado que codifican anticuerpos específicos anti-IL-6s del presente invento. Ver, por ejemplo, Ausubel, et al., supra, y dichas variantes de ácido nucleico se incluyen en el presente invento.

Tal y como se indica en este documento, las moléculas de ácido nucleico del presente invento que incluyen un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IL-6 pueden incluir, entre otras, las que codifican la secuencia de aminoácido de un fragmento de anticuerpo, por sí mismo; la secuencia de codificación del anticuerpo completo o una porción del mismo; la secuencia de codificación de un anticuerpo, fragmento o porción, así como secuencias adicionales, como la secuencia de codificación de por lo menos una señal líder o péptido de fusión, con o sin las secuencias de codificación adicionales anteriormente mencionadas, como por lo menos un intrón, junto con secuencias adicionales de no-codificación, incluidas, entre otras, secuencias de no-codificación de 5' y 3', como las secuencias transcritas no trasladadas que tienen un papel en transcripción, procesamiento mARN, incluido empalme y señales de poliadenilación (por ejemplo, el enlace de ribosoma y estabilidad de mARN); una secuencia de codificación adicional que codifica aminoácidos adicionales, como los que proporcionan funcionalidades adicionales. Así, la secuencia que codifica un anticuerpo puede fusionarse a una secuencia de marcador, como una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación del anticuerpo fusionado que incluye un fragmento o porción de anticuerpo.

Polinucleótidos que se hibridan de forma selectiva a un polinucleótido de la forma descrita en el presente documento

También se presentan ácidos nucleicos aislados que hibridizan bajo afecciones de hibridación selectiva a un polinucleótido presentado en este documento. Así, los polinucleótidos de esta representación pueden usarse para aislar, detectar, y/o cuantificar ácidos nucleicos que incluyen dichos polinucleótidos. Por ejemplo, esos polinucleótidos pueden usarse para identificar, aislar, o amplificar clones de longitud parcial o completa en una biblioteca depositada. En algunas representaciones, los polinucleótidos son genómicos o secuencias de cADN aisladas, o complementarios de otra forma a un cADN de una biblioteca de ácido nucleico humano o mamífero.

Preferiblemente, la biblioteca de cADN incluye por lo menos un 80 % de secuencias de longitud completa, preferiblemente, por lo menos un 85 % o 90 % de secuencias de longitud completa, y, más preferiblemente, por lo menos un 95 % de secuencias de longitud completa. Las bibliotecas de cADN pueden normalizarse para incrementar la representación de secuencias raras. Las afecciones de hibridación de nivel de endurecimiento bajo o moderado se usan normalmente, pero no solo, con secuencias que tienen una identidad de secuencia reducida en relación con secuencias complementarias. Las afecciones de nivel de endurecimiento moderado y elevado podrían usarse para secuencias de mayor identidad. Las afecciones de bajo nivel de endurecimiento permiten la hibridación selectiva de secuencias que tienen por lo menos una identidad de secuencia del 70 % y pueden usarse para identificar secuencias ortólogas o parálogas.

De manera opcional, estos polinucleótidos codificarán por lo menos una porción de un anticuerpo codificado por los polinucleótidos descritos en este documento. Los polinucleótidos presentados abarcan secuencias de ácido nucleico que se pueden usar para hibridación a un polinucleótido que codifica un anticuerpo del presente invento. Ver, por ejemplo, Ausubel, supra; Colligan, supra.

5

Construcción de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos aislados del presente invento pueden construirse utilizando (a) métodos recombinantes, (b) técnicas sintéticas, (c) técnicas de purificación y/o (d) combinaciones de las mismas, de forma bien conocida en este ámbito.

10

Los ácidos nucleicos pueden incluir secuencias además de un polinucleótido del presente invento. Por ejemplo, una ubicación de multi-clonación que comprende una o más ubicaciones de restricción de endonucleasa puede insertarse en el ácido nucleico para ayudar al aislamiento del polinucleótido. Además, las secuencias trasladables pueden insertarse para ayudar en el aislamiento del polinucleótido trasladado del presente invento. Por ejemplo, una secuencia de marcador de hexa-histidina proporciona un medio adecuado para la purificación de las proteínas del presente invento. El ácido nucleico del presente invento, sin incluir la secuencia de codificación, podría ser un vector, adaptador o vinculador para clonar y/o expresar un polinucleótido del presente invento.

15

Pueden añadirse secuencias adicionales a dichas secuencias de clonación y/o expresión para mejorar su función en la clonación y/o expresión, para ayudar al aislamiento del polinucleótido, o para mejorar la introducción del polinucleótido en una célula. El uso de vectores de clonación, vectores de expresión, adaptadores y vinculadores es bien conocido en este ámbito (véase, por ejemplo, Ausubel, supra; o Sambrook, supra).

20

Métodos recombinantes para la construcción de ácidos nucleicos

Los compuestos de ácido nucleico aislado de este invento, como ARN, cADN, ADN genómico, o cualquier combinación de los mismos, puede obtenerse a partir de fuentes biológicas usando cualquier cantidad de métodos de clonación conocidos por los expertos en la materia. En algunas representaciones, las sondas de oligonucleótido que hibridan de forma selectiva, en afecciones severas, a los polinucleótidos del presente invento se usan para identificar la secuencia deseada en una biblioteca de cADN o de ADN genómico. El aislamiento de ARN y la construcción de bibliotecas de cADN y genómicas, son bien conocidas por los conocedores de estas técnicas (véase, por ejemplo, Ausubel, supra; o Sambrook, supra)

30

Métodos de de investigación y aislamiento de ácido nucleico

Una biblioteca de cADN o genómica puede investigarse usando una sonda basada en la secuencia de un polinucleótido del presente invento, como los presentados en este documento. Las sondas pueden usarse para hibridar con secuencias de ADN genómico o cADN para aislar genes homólogos en el mismo organismo o en otros diferentes. Los expertos en la materia apreciarán que se pueden usar varios grados de endurecimiento de la hibridación; la hibridación o el medio de lavado pueden ser endurecedores. Al irse endureciendo las afecciones para la hibridación, debe haber un mayor grado de complementariedad entre la sonda y el objetivo para que se produzca la formación doble. El grado de endurecimiento puede controlarse por uno o más de los siguientes elementos: temperatura, fuerza iónica, pH y la presencia de un disolvente parcialmente desnaturizador, como la formamida. Por ejemplo, la dureza de la hibridación se modifica de forma adecuada cambiando la polaridad de la solución reactiva a través de, por ejemplo, la manipulación de la concentración de formamida dentro del rango de 0 % a 50 %. El grado de complementariedad (identidad de la secuencia) necesario para un enlace detectable variará de acuerdo con la estringencia del medio de hibridación y/o medio de lavado. El grado óptimo de complementariedad será 100 % o 70 – 100 %, o cualquier rango o valor del mismo. De todas formas, debe entenderse que las variaciones menores de las secuencias en las sondas y cebadores se puede compensar reduciendo la dureza de la hibridación y/o del medio de lavado.

40

45

50

Los métodos de amplificación del ARN o ADN son bien conocidos en este ámbito y se pueden usar de acuerdo con el presente invento sin demasiada experimentación, en base a la formación y directrices que se presentan en este documento.

55

Entre los métodos conocidos de amplificación de ADN o ARN se incluyen, entre otros, reacción de cadena de polimerasa (PCR) y procesos de amplificación relacionados (véase, por ejemplo, patentes de los EE. UU. n° 4.683.195, 4.683.202, 4.800.159, 4.965.188, a Mullis, et al.; 4.795.699 y 4.921.794 a Tabor, et al; 5.142.033 to Innis; 5.122.464 a Wilson, et al.; 5.091.310 a Innis; 5.066.584 a Gyllensten, et al; 4.889.818 a Gelfand, et al; 4.994.370 a Silver, et al; 4.766.067 a Biswas; 4.656.134 to Ringold) y amplificación mediada por ARN que usa ARN anti-sentido a la secuencia objetivo como modelo para síntesis de ADN de doble cadena (patente de los EE. UU. n° 5.130.238 a Malek, et al, con NASBA como nombre comercial). (Véase, por ejemplo, Ausubel, supra; o Sambrook, supra.) Por ejemplo, la tecnología de reacción de cadena de polimerasa (PCR) puede usarse para amplificar las secuencias de polinucleótidos del presente invento y genes relacionados directamente a partir de bibliotecas de ADN genómico o cADN. PCR y otros métodos de amplificación in vitro también pueden ser útiles, por ejemplo, para clonar secuencias

60

65

de ácido nucleico que codifican para la expresión de las proteínas, para hacer ácidos nucleicos para su uso como sondas para detectar la presencia deseada de mRNA en muestras, para la secuenciación de ácido nucleico o para otros propósitos. Se encuentran ejemplos de técnicas que permitirían guiar a conocedores de la materia en métodos de amplificación in vitro en Berger, supra, Sambrook, supra, y Ausubel, supra, así como Mullis, et al., patente de los EE. UU. n° 4.683.202 (1987); y Innis, et al., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications [Protocolos PCR, guía para métodos y aplicaciones], Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990). En este ámbito se conocen los kits que se encuentran disponibles comercialmente para la amplificación genómica de PCR. Véase, por ejemplo, Advantage- GC Genomic PCR Kit (Clontech). Además, por ejemplo, la proteína T4 de gen 32 (Boehringer Mannheim) puede usarse para mejorar el rendimiento de productos de PCR larga.

Métodos sintéticos para la construcción de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos aislados del presente invento también se pueden preparar por medio de síntesis química directa por métodos conocidos (véase, por ejemplo, Ausubel, et al., supra). La síntesis química generalmente produce un oligonucleótido de cadena única, que se puede convertir a ADN de doble cadena por hibridación con una secuencia complementaria, o por polimerización con una polimerasa de ADN usando la cadena única como modelo. Un experto en la materia reconocería que mientras la síntesis química del ADN se puede limitar a secuencias de aproximadamente 100 o más bases, se pueden obtener secuencias más largas por la ligadura de secuencias más cortas.

Casetes de expresión recombinante

El presente invento también proporciona casetes de expresión recombinante que incluye un ácido nucleico del presente invento. Una secuencia de ácido nucleico del presente invento, por ejemplo, un cADN o una secuencia genómica que codifica un anticuerpo del presente invento, puede usarse para construir un casete de expresión recombinante que se puede introducir en por lo menos una de las células hospedadoras que se deseen. Un casete de expresión recombinante normalmente incluirá un polinucleótido del presente invento enlazado de forma operativa a las secuencias regulatorias de iniciación transcripcional que dirigirán la transcripción del polinucleótido en la célula hospedadora pretendida. Tanto los promotores heterólogos como no-heterólogos (por ejemplo, endógeno) pueden usarse para la expresión directa de los ácidos nucleicos del presente invento.

En algunas representaciones, los ácidos nucleicos aislados que sirven como agente promotor, o de mejora, u otros elementos pueden introducirse en la posición adecuada (ascendente, descendiente o en el intrón) de una forma no-heteróloga de un polinucleótido del presente invento para regular en dirección ascendiente o descendiente la expresión de un polinucleótido del presente invento. Por ejemplo, los promotores endógenos pueden modificarse in vivo in vivo o in vitro por mutación, eliminación y/o sustitución.

Vectores y células hospedadoras

El presente invento también tiene relación con los vectores que incluyen moléculas aisladas de ácido nucleico del presente invento, células hospedadoras que se modifican genéticamente con los vectores recombinantes, y la producción de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 por técnicas recombinantes, bien conocidas en este ámbito. Ver, por ejemplo, Sambrook, et al., supra; Ausubel, et al., supra.

Los polinucleótidos pueden enlazarse a un vector que contenga un marcador seleccionable para su propagación en un anfitrión. Generalmente, se introduce un vector plásmido en un precipitado, como un fosfato de calcio precipitado, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, puede empaquetarse in vitro usando una línea celular de empaquetado adecuado y a continuación transducirse a las células hospedadoras.

La inserción de ADN debería estar enlazada de forma operativa a un promotor adecuado. La construcción de la expresión contendrá ubicaciones para la iniciación, terminación de la transcripción y, en la región transcrita, una ubicación de enlace de ribosoma para su conversión. La porción de codificación de las transcripciones maduras expresadas por las construcciones incluirán, preferiblemente, una transcripción que se iniciaría al principio y un codón de terminación (por ejemplo, UAA, UGA o UAG) posicionado de forma apropiada al final del mRNA que se va a convertir, siendo UAA y UAG preferibles para la expresión celular de mamíferos o eucariotas.

Los vectores de expresión preferiblemente (de forma opcional) incluirán por lo menos un marcador seleccionable. Dichos marcadores incluyen, por ejemplo, entre otros, metotrexato (MTX), reductasa de dehidrofolato (DHFR, patente de los EE. UU. n° 4.399.216; 4.634.665; 4.656.134; 4.956.288; 5.149.636; 5.179.017, ampicilina, neomicina (G418), resistencia al cultivo de célula eucariota de ácido micofenólico o sintetasa de glutamina (GS, patente de los EE. UU. n° 5.122.464; 5.770.359; 5.827.739) y genes de resistencia de tetraciclina o ampicilina para el cultivo de E. coli y otras bacterias o procarióticos. Los medios de cultivo adecuados y afecciones de las células hospedadoras antes descritas son conocidos en este ámbito. Los vectores adecuados serán evidentes fácilmente para el experto en la materia. La introducción de una construcción de vector en una célula hospedadora puede lograrse por transfección de fosfato de calcio, transfección mediada por dextrano-DEAE, transfección catiónica mediada por lípido, electroporación, transducción, infección u otros métodos conocidos. Dichos métodos están descritos por ejemplo en Sambrook, supra, capítulos 1-4 y 16-18; Ausubel, supra, capítulos 1, 9, 13, 15, 16.

5 Por lo menos un anticuerpo del presente invento puede expresarse en forma modificada, como proteína de fusión, y puede incluir tanto señales de secreción como regiones funcionales adicionales de heterólogo. Por ejemplo, una región de aminoácidos adicionales, aminoácidos con carga particular, pueden añadirse al término-N de un anticuerpo para mejorar su estabilidad y persistencia en la célula hospedadora, durante la purificación o durante su posterior manipulación y almacenamiento. Además, las fracciones de péptido pueden añadirse a un anticuerpo del presente invento para facilitar la purificación. Dichas regiones pueden retirarse antes de la preparación final de un anticuerpo o por lo menos un fragmento de las mismas. Dichos métodos están descritos en muchos manuales estándar de laboratorio, como Sambrook, supra, capítulos 17.29-17.42 y 18.1-18.74; Ausubel, supra, capítulos 16, 17 y 18.

15 Los expertos en la materia son conocedores de los muchos sistemas disponibles para la expresión de un ácido nucleico que codifica una proteína del presente invento. De forma alternativa, ácidos nucleicos del presente invento pueden expresarse en una célula hospedadora activándose (por medio de manipulación) en una célula hospedadora que contiene ADN endógeno que codifica un anticuerpo del presente invento. Dichos métodos son bien conocidos en este ámbito, por ejemplo, tal y como se describe en las patentes de los EE. UU. n° 5.580.734, 5.641.670, 5.733.746 y 5.733.761.

20 Ilustrativas de los cultivos celulares útiles para la producción de los anticuerpos, porciones especificadas o variantes de las mismas, son las células de mamífero. Los sistemas celulares de mamíferos con frecuencia tendrán la forma de monocapas de células aunque también se pueden usar suspensiones de células de mamíferos o biorreactores. Se han desarrollado varias líneas de células hospedadoras adecuadas capaces de expresar proteínas glicosiladas intactas, que incluyen COS-1 (por ejemplo, ATCC CRL 1650), COS-7 (por ejemplo, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (por ejemplo, ATCC CRL-10), CHO (por ejemplo, ATCC CRL 1610) y BSC-1 (por ejemplo, ATCC CRL-26) líneas celulares, células Cos-7, células CHO, células hep G2, P3X63Ag8.653, SP2/0-Agl4, células 293, células HeLa y otras similares, que están disponibles a partir de, por ejemplo, American Type Culture Collection, Manassas, Va (www.atcc.org). Las células hospedadoras preferibles incluyen células de origen linfoide, como células de mieloma y linfoma. Se prefieren especialmente las células hospedadoras P3X63Ag8.653 (Número de entrada ATCC CRL-1580) y células SP2/0-Agl4 (Número de entrada ATCC CRL-1851). En una de las representaciones que se prefieren, la célula recombinante es una P3X63Ab8.653 o una célula SP2/0-Agl4.

35 Los vectores de expresión para esas células pueden incluir una o más de las siguientes secuencias de control de expresión, como por ejemplo, entre otros, un origen de una replicación; un promotor (por ejemplo, promotores tardíos o iniciales de SV40, el promotor CMV (patentes de los EE. UU. n° 5.168.062; 5.385.839), un promotor HSV tk, un promotor pgk (cinasa de fosfoglicerato), un promotor EF-1 alfa (patente de los EE. UU. n° 5.266.491), por lo menos un promotor de inmunoglobulina humana; un mejorador, y/o ubicaciones de procesamiento de información, como ubicaciones de enlace de ribosoma, ubicaciones de empalme de ARN, ubicaciones de poliadenilación (por ejemplo, una ubicación de adición SV40 T Ag poli A), y secuencias de terminación transcripcional. Véase, por ejemplo, Ausubel et al., supra; Sambrook, et al., supra. Otras células útiles para la producción de ácidos nucleicos o proteínas del presente invento son conocidas y/o disponibles, por ejemplo, a partir del Catálogo de la Colección de Cultivos Tipo Americanos de Líneas Celulares e Hibridomas (www.atcc.org) u otras fuentes conocidas o comerciales.

45 Cuando se usan células hospedadoras eucariotas, las secuencias de terminación de poliadenilación o transcripción normalmente se incorporan al vector. Un ejemplo de secuencia de terminación es la secuencia de poliadenilación a del gen de la horma del crecimiento bovino. También se pueden incluir secuencias para empalmar de forma exacta la transcripción. Un ejemplo de una secuencia de empalme es el intrón VP1 de SV40 (Sprague, et al., J. Virol. 45:773-781 (1983)). Además, las secuencias de genes que van a controlar la replicación en la célula hospedadora pueden incorporarse al vector, por técnicas conocidas.

50 **Purificación de un anticuerpo**

55 Un anticuerpo anti-IL-6 puede recubrirse y purificarse a partir de cultivos de células recombinantes por métodos conocidos entre los que se incluyen, entre otros, purificación de proteína A, precipitación de sulfato de amonio o etanol, extracción de ácido, cromatografía por intercambio de anión o catión, cromatografía fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía por afinidad, cromatografía por hidroxilapatita y cromatografía por lectina. También se puede usar para la purificación la cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC"). Véase, por ejemplo, Colligan, Current Protocols in Immunology [Protocolos actuales en inmunología], o Current Protocols in Protein Science [Protocolos actuales en ciencia de las proteínas], John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), por ejemplo, capítulos 1, 4, 6, 8, 9, 10.

60 Los anticuerpos del presente invento incluyen productos purificados naturalmente, productos de procedimientos sintéticos químicos y productos producidos por técnicas recombinantes a partir de un anfitrión eucariota, que incluye, por ejemplo, levadura, células de especies de planta superior, insectos y mamíferos. Dependiendo del anfitrión que se haya utilizado en un procedimiento de producción recombinante, el anticuerpo del presente invento puede glicosilarse o no-glicosilarse, pero se prefiere el glicosilado. Dichos métodos se describen en muchos manuales

65

estándar de laboratorio, como Sambrook, supra, secciones 17.37-17.42; Ausubel, supra, Capítulos 10, 12, 13, 16, 18 y 20, Colligan, Protein Science [Ciencia de las proteínas], supra, capítulos 12-14.

Anticuerpos anti-IL-6s

- 5 Un anticuerpo anti-IL-6 presentado en este documento incluye cualquier proteína o molécula que contenga péptidos que incluya por lo menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, como por ejemplo, entre otras, por lo menos una porción de enlace de ligando (LBP), como por ejemplo, entre otras, una región determinante de la complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de enlace a ligando del mismo, una cadena pesada o región variable de cadena ligera, una región marco (por ejemplo, FR1, FR2, FR3, FR4 o un fragmento de las mismas, o como se muestra en las SEC ID N°: 105-112, de forma opcional que incluye por lo menos una sustitución, inserción o eliminación), una región constante de cadena pesada o cadena ligera, (por ejemplo, que incluye por lo menos una CHI, articulación₁, articulación₂, articulación₃, articulación₄, CH2 o CH3 o fragmentos de las mismas, que a demás podría comprender por lo menos una sustitución, inserción o eliminación), o cualquier porción de los mismos, que puede incorporarse a un anticuerpo presentado en este documento. Un anticuerpo presentado en este documento puede incluir o derivarse de cualquier mamífero, como por ejemplo, entre otros, un humano, un ratón, un conejo, una rata, un roedor, un primate o cualquier combinación de los mismos y otros similares.
- 10
- 15
- 20 Los anticuerpos aislados del presente invento incluyen las secuencias de anticuerpo de aminoácidos presentados en este documento codificados por cualquier polinucleótido adecuado o cualquier anticuerpo aislado o preparado. Preferiblemente, el anticuerpo humano o fragmento de enlace al antígeno una IL-6 humano y, por lo tanto, neutraliza parcial o notablemente por lo menos una actividad biológica de la proteína. Un anticuerpo, o porción especificada o variante de los mismos, que neutraliza parcialmente o preferiblemente de forma notable por lo menos una actividad biológica de por lo menos una proteína IL-6 o fragmento puede enlazar la proteína o fragmento y por lo tanto inhibir actividades mediadas por el enlace de IL-6 al receptor IL-6 o a través de otros mecanismos dependientes o mediados por IL-6. Tal y como se usa en este documento, el término “anticuerpo de neutralización” hace referencia a un anticuerpo que puede inhibir una actividad dependiente de IL-6 aproximadamente en un 20-120 %, preferiblemente por lo menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 % o más dependiendo del ensayo. La capacidad de un anticuerpo anti-IL-6 de inhibir una actividad dependiente de IL-6 se evalúa preferiblemente por lo menos por una proteína adecuada IL-6 o ensayo receptor, como se describe en este documento y/o por técnicas conocidas. Un anticuerpo humano del invento puede ser de cualquier tipo (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, etc.) o isotipo y puede incluir una cadena ligera de kappa o lambda. En una representación, el anticuerpo humano incluye una cadena pesada de IgG o un fragmento definido, por ejemplo, por lo menos uno de los isotipos, IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 (por ejemplo, γ 1, γ 2, γ 3 o γ 4). Se pueden preparar anticuerpos de este tipo usando un ratón transgénico u otro mamífero transgénico no humano que incluye por lo menos transgenes de una cadena ligera humana (por ejemplo, IgG, IgA y IgM) como los descritos en este documento y/o por técnicas conocidas. En otra representación, el anticuerpo anti-humano IL-6 humano incluye una cadena pesada IgG1 y una cadena ligera IgG1.
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45 Por lo menos un anticuerpo del invento une por lo menos un epítipo específico a por lo menos una proteína IL-6, subunidad, fragmento, porción o cualquier combinación de los anteriores. Ese como mínimo un epítipo puede comprender por lo menos una región de enlace al anticuerpo que incluye por lo menos una porción de la proteína, cuyo epítipo es preferiblemente comprendido de por lo menos una porción extracelular, soluble, hidrofílica, externa o citoplásmica de la proteína. Ese como mínimo un epítipo especificado puede comprender cualquier combinación de lo menos una secuencia de aminoácido de por lo menos 1-3 aminoácidos a la porción especificada entera de aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 115, por ejemplo), residuos de aminoácido 151-178, más específicamente, residuos 171-182.
- 50
- 55
- 60
- 65
- Generalmente, el anticuerpo humano o fragmento de enlace de antígeno presentado en este documento incluirá una región de enlace de antígeno que incluye por lo menos una región determinante de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3) o variante de por lo menos una región de cadena pesada variable y por lo menos una región determinante de la complementariedad humana (CDR1, CDR2 y CDR3) o variante de por lo menos una región variable de cadena ligera. Las secuencias CDR podrían derivarse de secuencias de línea germinal humana o coinciden exactamente con las secuencias de la línea germinal. Por ejemplo, pueden usarse los CDRs de una biblioteca sintética derivados de los CDRs del ratón original. Esos CDRs podrían formarse por la incorporación de sustituciones conservadoras a partir de la secuencia original del ratón. Únicamente a modo de ejemplo, el anticuerpo o porción o variante de enlace de antígeno puede comprender por lo menos uno de los CDR3 de cadena pesada que tenga una secuencia de aminoácido seleccionada a partir del grupo que consta de SEC ID N°: 79, 81, 83, 85, 87, 89 y 91, y/o un CDR3 de cadena ligera que tenga una secuencia de aminoácido seleccionada a partir del grupo que consta de SEC ID N°: 29, 31, 33 y 35. En una representación concreta, el anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno puede tener una región de enlace de antígeno que incluye por lo menos una porción de por lo menos una cadena pesada CDR (por ejemplo, CDR1, CDR2 y/o CDR3) con la secuencia de aminoácido de los CDRs 1, 2, y/o 3 correspondientes (por ejemplo, SEC ID N°:37, 49 y 79). En otra representación concreta, el anticuerpo o porción de enlace de antígeno o variante puede tener una región de enlace de antígeno que comprenda por lo menos una

porción de por lo menos un CDR de cadena ligera (por ejemplo, CDR1, CDR2 y/o CDR3) que tenga la secuencia de aminoácido de los CDRs 1, 2 y/o 3 correspondientes (por ejemplo, SEC ID N°: 1, 17 y 29).

5 En una de las representaciones preferidas, los tres CDRs de cadena pesada y los tres CDRs de cadena ligera del anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno tienen la secuencia de aminoácido del CDR correspondiente de por lo menos uno de los siguientes mAb AME-A9, AME-Ib, AME-18a, AME-22a, AME-20b, AME-23a y AME-19a, de la forma descrita en este documento. Dichos anticuerpos pueden prepararse uniendo químicamente las diversas porciones (por ejemplo, CDRs, marco) del anticuerpo usando técnicas convencionales, preparando y expresando una (por ejemplo, una o más) molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo usando técnicas convencionales de tecnología de ADN recombinante o usando otro método adecuado.

10 El anticuerpo anti-IL-6 puede incluir por lo menos uno entre: cadena pesada o región variable de cadena ligera con secuencia de aminoácido definida. Por ejemplo, en una de las representaciones preferidas, el anticuerpo anti-IL-6 incluye por lo menos uno entre: por lo menos una región variable de cadena pesada, que podría tener una secuencia de aminoácido seleccionada a partir del grupo que consta de SEC ID N°:95, 99, 103, 118, 122, 126 y 130 y/o por lo menos una región variable de cadena ligera, que podría tener una secuencia de aminoácido seleccionada a partir del grupo que consta de SEC ID N°: 93, 97, 101, 116, 120, 124 y 128. Los anticuerpos que se unen al IL-6 humano y que incluyen una cadena pesada definida o una región variable de cadena ligera pueden prepararse utilizando métodos adecuados, como muestra de fago (Katsube, Y., et al, IntJMol. Med, l(5):863-868 (1998)) o métodos que emplean animales transgénicos, con técnicas conocidas y/o de la forma descrita en este documento. Por ejemplo, un ratón transgénico, que incluye un transgene de cadena pesada de cadena de inmunoglobulina redistribuido de forma funcional y un transgen que incluye ADN de una ubicación de cadena ligera de inmunoglobulina humana que puede reorganizarse de forma funcional, puede inmunizarse con IL-6 humano o un fragmento del mismo para provocar la producción de anticuerpos. Si se desea, las células que producen anticuerpos pueden aislarse y los hibridomas u otras células inmortalizadas productoras de anticuerpos pueden prepararse de la forma descrita en este documento y/o con técnicas conocidas. De forma alternativa, el anticuerpo, porción especificada o variante puede expresarse usando el ácido nucleico de codificación o una porción suya en una célula hospedadora adecuada.

30 Códigos de aminoácidos

Los aminoácidos crean anticuerpos anti-IL-6s del presente invento con frecuencia se abrevian. Las designaciones de aminoácidos pueden indicarse designando el aminoácido por su código de letra única, su código de tres letras, nombre, o codón (o codones) de tres nucleótidos, de forma comprensible en este ámbito (ver Alberts, B., et al., Molecular Biology of The Célula (Biología molecular de la célula), Tercera Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994). Un anticuerpo anti-IL-6 del presente invento puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos, eliminaciones o adiciones, ya sea por mutaciones naturales o por manipulación humana, tal y como se especifica en el presente documento. Los aminoácidos de un anticuerpo anti-IL-6 el presente invento que son esenciales para su funcionamiento se pueden identificar por técnicas conocidas, como mutagénesis de sitio dirigido o mutagénesis de exploración de alanina (por ejemplo, Ausubel, supra, capítulos 8, 15; Cunningham y Wells, Science 244:1081-1085 (1989)). El último procedimiento introduce mutaciones de alanina simple en todos los residuos de la molécula. Se busca entonces actividad biológica en las moléculas mutantes resultantes, como por ejemplo, sin excluir otros, por lo menos una actividad neutralizadora de IL-6. Las ubicaciones críticas para el enlace de anticuerpos también se pueden identificar por medio de análisis estructural, como cristalización, resonancia magnética nuclear o etiquetado de fotoafinidad (Smith, et al., J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992) y de Vos, et al., Science 255:306-312 (1992)).

45 Los anticuerpos anti-IL-6s presentados en este documento pueden incluir, entre otros, por lo menos una porción, secuencia o combinación seleccionada a partir de 5 hasta todos los aminoácidos contiguos de por lo menos una de las SEC ID N°: 91, 93, 95, 97, 99, etc.

50 Las variantes no limitadoras que pueden mejorar o mantener por lo menos una de las actividades indicadas incluyen, entre otros, cualquiera de los polipéptidos anteriores, que también incluye por lo menos una mutación correspondiente a por lo menos una sustitución de los residuos modificados entre las secuencias presentadas de variantes de aminoácido.

55 Un anticuerpo anti-IL-6 también podría incluir un polipéptido con una secuencia de aminoácido que varía a partir de la secuencia de los aminoácidos contiguos de por lo menos uno de: SEC ID N°: 95, 99 y 103, etc (por ejemplo, una o más sustituciones conservadoras a partir de las secuencias indicadas en este documento). Además, en este documento se presentan variantes de la secuencia de aminoácido de una región variable de cadena ligera de SEC ID N°: 93, 97 o 101, o la secuencia de aminoácido de una cadena pesada de SEC ID N°: 79, 81, 83, 85, 87, 89 o 91.

60 Como comprenderán los expertos, el presente invento incluye por lo menos un anticuerpo del presente invento biológicamente activo. Los anticuerpos activos biológicamente tienen una actividad específica de por lo menos 20 %, 30 % o 40 % y preferiblemente, por lo menos 50 %, 60 %, o 70 %, y todavía más preferible, por lo menos del 80 %, 90 %, o 95 %-1000 % o más de eso que el anticuerpo nativo (no-sintético), endógeno o relacionado y conocido. Los métodos para probar y cuantificar las medidas de actividad enzimática y especificidad de sustrato son bien conocidos en este ámbito.

En otro aspecto, el invento se relaciona con anticuerpos humanos y fragmentos de enlace con antígeno, de la forma descrita en este documento, modificados por el enlace covalente de una fracción orgánica. Dicha modificación puede producir un anticuerpo o fragmento de unión de antígeno con propiedades farmacocinéticas mejoradas (por ejemplo, aumento de media vida de suero in vivo). La fracción orgánica puede ser un grupo polimérico lineal o hidrofílico ramificado, grupo de ácidos grasos, o grupo de éster de ácidos grasos. En ciertas representaciones, el grupo polimérico hidrofílico puede tener un peso molecular de entre aproximadamente 800 a aproximadamente 120.000 Dalton y puede ser un glicol polialcano (por ejemplo, polietileno glicol (PEG), polipropileno glicol (PPG)), carbohidrato de polímero, polímero de aminoácido o pirolidona de polivinilo, y el ácido graso o grupo de éster de ácido graso puede comprender entre aproximadamente ocho hasta aproximadamente cuarenta átomos de carbono.

Los anticuerpos modificados y los fragmentos de enlace de antígeno del invento pueden incluir una o más fracciones orgánicas que están enlazadas de forma covalente, directa o indirectamente, al anticuerpo. Cada fracción orgánica enlazada a un anticuerpo o fragmento de enlace de antígeno del invento podrían de forma independiente ser un grupo polimérico hidrofílico, un grupo de ácido graso o un grupo de éster de ácido graso. En este documento, el término "ácido graso" abarca ácidos mono-carboxílicos y ácidos di-carboxílicos. "Grupo polimérico hidrofílico", usado en este texto, hace referencia al polímero orgánico que es más soluble en agua que en octano. Por ejemplo, la polisilina es más soluble en agua que en octano. Así, un anticuerpo modificado por la unión covalente de polisilina se incluye en el invento. Los polímeros hidrofílicos adecuados para la modificación de anticuerpos del invento pueden ser lineales o ramificados e incluir, por ejemplo, polialcan glicoles (por ejemplo, PEG, monometoxi-polietileno glicol (mPEG), PPG y otros similares), carbohidratos (por ejemplo, dextrano, celulosa, oligosacáridos, polisacáridos y otros similares), polímeros de aminoácidos hidrofílicos (por ejemplo, polilisina, poliarginina, poliaspartata y otros similares), óxidos de polialcano (por ejemplo, óxido de polietileno, óxido de polipropileno y otros similares) y pirolidona de polivinilo.

Preferiblemente, el polímero hidrofílico que modifica el anticuerpo del invento tiene un peso molecular de aproximadamente entre 800 y 150.000 Dalton con entidad molecular independiente. Por ejemplo, se puede usar PEG₅₀₀₀ y PEG_{20.000}, donde el subíndice es la media del peso molecular del polímero en Dalton. El grupo polimérico hidrofílico puede sustituirse con entre uno y seis grupos de alquilo, ácido graso o de éster de ácido graso. Los polímeros hidrofílicos que se sustituyen con un grupo de ácido graso o de éster de ácido graso se pueden preparar usando los métodos adecuados. Por ejemplo, un polímero que incluye un grupo de amina se puede acoplar a un carboxilato del ácido graso o éster de ácido graso, y un carboxilato activado (por ejemplo, activado con diimidazola N, N-carbonilo) en un ácido graso o éster de ácido graso pueden acoplarse a un grupo de hidroxilo en un polímero.

Los ácidos grasos y ésteres de ácido graso adecuados para modificar anticuerpos del invento pueden saturarse o contener una o más unidades de insaturación. Entre los ácidos grasos adecuados para modificar los anticuerpos del invento se incluyen, por ejemplo, n-dodecanoato (C₁₂, laurato), n-tetradecanoato (C₁₄, miristato), n-octadecanoato (C₁₈, estearato), n-eicosanoato (C₂₀, arachidato), n-docosanoato (C₂₂, behenato), n-triacontanoato (C₃₀), n-tetracontanoato (C₄₀), *cis*- Δ 9-octadecanoate (C₁₈, oleato), todos *cis*- Δ 5,8,11,14-eicosatetraenoato (C₂₀, araquidonato), ácido octanedioico, ácido tetradecanedioico, ácido octadecanedioico, ácido docosanedioico y otros similares. Entre los ésteres de ácidos grasos adecuados se incluyen los mono ésteres de ácidos dicarboxílicos que incluyen un grupo lineal o grupo bajo ramificado de alquilo. El grupo bajo de alquilo puede incluir entre uno y aproximadamente doce, y preferiblemente entre uno y seis átomos de carbono.

Los anticuerpos humanos modificados y los fragmentos de enlace de antígeno pueden prepararse usando métodos adecuados, como por ejemplo por la reacción de uno o más agentes modificadores. Un "agente modificador" en este texto, hace referencia a un grupo orgánico adecuado (por ejemplo, polímero hidrofílico, un ácido graso, un éster de ácido graso) que incluye un grupo de activación. Un "grupo de activación" es una fracción química o grupo funcional que puede, en afecciones concretas, reaccionar con un segundo grupo químico formando así un enlace covalente entre el agente modificador y el segundo grupo químico. Por ejemplo, los grupos de activación reactivos a amina incluyen grupos electrofílicos, como tosilato, mesilato, halo (cloro, bromo, fluoro, yodo), ésteres de N-hidroxisuccinimidilo (NHS) y otros similares. Los grupos de activación que pueden reaccionar con tioles incluyen, por ejemplo, maleimida, yodoacetilo, acrilolilo, disulfidos de piridilo, 5-tiol-2-tiol de ácido nitrobenzoico (TNB-tiol) y otros similares. Un grupo funcional de aldehído puede acoplarse a moléculas que contengan amina- o hidrazida, y un grupo de azida puede reaccionar con un grupo trivalente de fósforo para formar fosforamidoato o enlaces de fosforimida. Los métodos adecuados para introducir grupos de activación en moléculas son conocidos en este ámbito (véase por ejemplo, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques* [Técnicas de bioconjugados], Academic Press: San Diego, CA (1996)). Un grupo de activación puede enlazarse directamente al grupo orgánico (por ejemplo, polímero hidrofílico, ácido graso, éster de ácido graso), o a través de una fracción vinculadora, por ejemplo, un grupo de C1-C12 divalente donde uno o más átomos de carbono pueden sustituirse por un heteroátomo, como el oxígeno, nitrógeno o azufre. Entre las fracciones vinculadoras adecuadas se incluyen, por ejemplo, glicol de tetraetileno, -(CH₂)₃-, -NH-(CH₂)₆-NH-, -(CH₂)₂-NH- y -CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH-NH-. Los agentes modificadores que incluyen una fracción vinculadora se pueden producir, por ejemplo, reaccionando una mono-Boc-alquildiamina (por ejemplo, mono-Boc-etilenediamina, mono-Boc-diaminohexano) con un ácido graso en presencia de l-etilo-3-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimida (EDC) para formar un enlace de amida entre la amina libre y el carboxilato de ácido graso. El grupo protector Boc puede retirarse del producto tratándolo con ácido trifluoroacético (TFA) para exponer una amina primaria que puede acoplarse a otro carboxilato, de la forma descrita, o puede reaccionarse con

anhídrido maleico y el producto resultante puede ciclizarse para producir un derivado de maleimido activado del ácido graso (véase, por ejemplo, Thompson, et al., WO 92/16221.)

5 Los anticuerpos modificados del invento pueden producirse reaccionando un anticuerpo humano o fragmento de enlace de antígeno con un agente modificador. Por ejemplo, las fracciones orgánicas pueden enlazarse al anticuerpo de forma no específica para la ubicación usando un agente modificador reactivo de amina, por ejemplo, un éster NHS de PEG. Los anticuerpos humanos modificados o fragmentos de enlace antígeno también se pueden preparar reduciendo enlaces de disulfuro (por ejemplo, enlaces de disulfuro del interior de la cadena) de un anticuerpo o fragmento de enlace antígeno. El anticuerpo reducido o fragmento de enlace de antígeno entonces podría reaccionarse con un agente modificador reactivo de tiol para producir el anticuerpo modificado del invento. Los anticuerpos humanos modificados y los fragmentos de unión de antígeno que incluyen una fracción orgánica enlazada a ubicaciones específicas de un anticuerpo del presente invento pueden prepararse usando métodos adecuados, como proteólisis inversa (Fisch et al., *Bioconjugate Chem.*, 3:147-153 (1992); Werlen et al., *Bioconjugate Chem.*, 5:411-417 (1994); Kumaran et al., *Protein Sci.* 6(10):2233-2241 (1997); Itoh et al., *Bioorg. Chem.*, 24(1): 59-68 (1996); Capellas et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 56(4):456-463 (1997)), y los métodos descritos en Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques [Técnicas de bioconjugados]*, Academic Press: San Diego, CA (1996).

Anticuerpos anti-idiotipo para compuestos de anticuerpo anti-IL-6

20 Además de los anticuerpos monoclonales anti-IL-6, en este documento también se presenta un anticuerpo anti-idiotípico (anti-id) específico de dichos anticuerpos. Un anticuerpo anti-id es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos asociados generalmente a la región de enlace antígeno de otro anticuerpo. El anti-id puede prepararse inmunizando un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo, ratones) como fuente del anticuerpo de Id con el anticuerpo o un CDR que contenga una región de la misma. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizador y producir un anticuerpo anti-id. El anticuerpo anti-id también se podría usar como "inmunogene" para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal, produciendo lo que se denomina un anticuerpo anti-anti-Id.

30 También se presenta en este documento por lo menos un compuesto de anticuerpo anti-IL-6 que incluye por lo menos uno, por lo menos dos, por lo menos tres, por lo menos cuatro, por lo menos cinco, por lo menos seis o más anticuerpos anti-IL-6 de los mismos, de la forma descrita aquí y/o con técnicas conocidas que se proporcionan en un compuesto, mezcla o forma que no se produce de forma natural. Dichos compuestos incluyen composiciones que no se producen naturalmente que incluyen por lo menos una o dos variantes, dominios, fragmentos o variantes específicas de longitud completa, C- y/o N-terminalmente eliminados, de la secuencia de aminoácido de anticuerpo anti-IL-6 seleccionada a partir del grupo que consta de 70-100 % de los aminoácidos contiguos de SEC ID N°: 1-114 y 116-138, o fragmentos específicos, dominios o variantes de los mismos. Las composiciones preferidas de anticuerpo anti-IL-6 incluyen por lo menos uno o dos fragmentos, dominios o variantes de longitud completa como por lo menos un CDR o LBP que contenga porciones de la secuencia de anticuerpo anti-IL-6 descrita en este documento, por ejemplo, 70-100 % de SEC ID N°: 15, 27, 35, 47, 61 y 91, o fragmentos, dominios o variantes especificadas de los mismos. Se consideran todavía mejor las composiciones que incluyen, por ejemplo, 40-99 % de por lo menos uno de 70-100 % de SEC ID N°: 93, 95, 97, 99, 101, 103, etc., o fragmentos, dominios o variantes específicas de los mismos. Dichos porcentajes de las composiciones se refieren a peso, volumen, concentración, molaridad o molaridad de soluciones líquidas o sólidas, mezclas, suspensiones, emulsiones, partículas, polvo o coloides, por técnicas conocidas o de la forma descrita en este documento.

Composiciones de anticuerpos que incluyen ingredientes activos terapéuticamente

50 Las composiciones de anticuerpos del invento podrían también comprender una cantidad eficaz de por lo menos un compuesto o proteína seleccionada a partir de por lo menos uno de los siguientes: medicamento antiinfeccioso, medicamento del sistema cardiovascular (CV), medicamento del sistema nervioso central (CNS), medicamento del sistema nervioso autónomo (ANS), medicamento del tracto respiratorio, medicamento del tracto gastrointestinal (GI), medicamento hormonal, medicamento para el equilibrio de líquidos o electrolitos, medicamento hematológico, antipleonástico, medicamento de inmunomodulación, medicamento oftalmológico, óptico o nasal, medicamento tópico, medicamento nutricional u otros similares. Dichos medicamentos son bien conocidos en este ámbito, incluidas formulaciones, indicaciones, dosificaciones y administración para cada uno de ellos presentada aquí (véase, por ejemplo, *Nursing 2001 Handbook of Drugs [Manual de medicamentos para enfermería 2001]*, 21^a edición, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; *Health Professional's Drug Guide 2001 [Guía de medicamentos para profesionales de la salud]*, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; *Pharmacotherapy Handbook [Manual de farmacoterapia]*, Wells et al., ed., Appleton & Lange, Stamford, CT).

60 Los medicamentos antiinfecciosos pueden ser por lo menos uno seleccionado de entre: amebicidas o por lo menos un antiprotozoario, antihelmínticos, antifúngicos, antipalúdicos, antituberculosis o por lo menos un antilepra, aminoglucósidos, penicilinas, cefalosporinas, tetraciclinas, sulfonamidas, fluoroquinolonas, antivirales, antiinfecciosos macrólidos, y varios antiinfecciosos. El medicamento puede por lo menos ser uno de los siguientes: inotrópicos, antiarrítmicos, antianginosos, antihipertensivos, antilépéricos y otros medicamentos cardiovasculares. El medicamento del CNS puede ser por lo menos uno de los siguientes: analgésicos no narcóticos o por lo menos uno

de los siguientes: antipiréticos, antiinflamatorios no esteroideos, analgésicos narcóticos o por lo menos un opiáceo, sedantes hipnóticos, anticonvulsivos, antidepresivos, medicamentos anti ansiedad, antipsicóticos, estimulantes del sistema nervioso central, antiparkinsonianos y otros medicamentos del sistema nervioso central. El medicamento para ANS puede ser por lo menos uno de los siguientes: colinérgicos (parasimpatomiméticos), anti-colinérgicos, adrenérgicos (simpatomiméticos), bloqueadores adrenérgicos (simpatolíticos), relajantes musculares y bloqueadores neuromusculares. El medicamento del tracto respiratorio puede ser por lo menos uno de los siguientes: antihistamínicos, broncodilatadores, expectorantes o por lo menos un antitusivo y varios medicamentos respiratorios. El medicamento del tracto GI puede ser por lo menos uno de los siguientes: antiácido o por lo menos un adsorbente o por lo menos un antiflatulento, enzima digestiva o por lo menos un solubilizador de cálculos biliares, antidiarreico, laxante, antiemético y medicamentos antiulcerosos. El medicamento hormonal puede ser por lo menos uno de los siguientes: corticosteroides, andrógenos o por lo menos un esteroide anabólico, estrógeno o por lo menos una progestina, gonadotropina, medicamento antiadiabético o por lo menos un glucagón, hormona del tiroides, antagonista de hormona del tiroides, hormona pituitaria y medicamento tipo paratiroides. El medicamento para el equilibrio de fluidos y electrolito puede ser por lo menos uno de los siguientes: diuréticos, electrolitos o por lo menos una solución de reposición, acidificante o por lo menos un alcalinizador. El medicamento hematológico puede ser por lo menos uno de los siguientes: hematínicos, anticoagulantes, derivados sanguíneos y enzimas trombolíticas. Los antineoplásicos pueden ser por lo menos uno de los siguientes: medicamentos alquilantes, antimetabolitos, antineoplásicos antibióticos, antineoplásicos que modifican el equilibrio hormonal y otros antineoplásicos. El medicamento de inmunomodulación puede ser por lo menos uno de los siguientes: inmunosupresores, vacunas, por lo menos un toxoide, antitoxina o por lo menos un contraveneno, suero inmune y modificadores de la respuesta biológica. Los medicamentos oftálmicos, óticos y nasales pueden ser por lo menos uno de los siguientes: antiinfecciosos oftálmicos, antiinflamatorios oftálmicos, mióticos, midriáticos, vasoconstrictores oftálmicos, varios oftálmicos, óticos y medicamentos nasales. El medicamento tópico puede ser por lo menos uno de los siguientes: antiinfecciosos locales, escabicidas o por lo menos un pediculicida o corticoesteroide tópico. El medicamento nutricional puede ser por lo menos uno de los siguientes: vitaminas, minerales o calóricos. Véase, por ejemplo, los contenidos del Manual de medicamentos de enfermería 2001, supra.

El como mínimo un amebicida o antiprotozoario puede por lo menos ser uno de los siguientes: atovaquona, hidrocloreuro de cloroquina, fosfato de cloroquina, metronidazola, hidrocloreuro de metronidazola e isentionato de pentamidina. El por lo menos un antelmíntico puede ser por lo menos uno de los siguientes: mebendazol, pamoato de pirantel y tiabendazol. El por lo menos un antifúngico puede ser por lo menos uno de los siguientes: anfotericina B, complejo de sulfato de colesterol de anfotericina B, complejo lípido de anfotericina B, liposomal de anfotericina B, fluconazol, flucitosina, micro-griseofulvina, ultramicro-griseofulvina, itraconazol, ketoconazol, nistatina y hidrocloreuro de terbinafina. El por lo menos un antipalúdico puede ser por lo menos uno de los siguientes: hidrocloreuro de cloroquina, fosfato de cloroquina, doxiciclina, sulfato de hidroxiclo-roquinas, hidrocloreuro de mefloquina, fosfato primaquina, pirimetamina y pirimetamina con sulfadoxina. El por lo menos un antituberculoso o antilepra puede ser por lo menos uno de los siguientes: clofazimina, cicloserina, dapsona, hidrocloreuro de etambutol, isoniazida, pirazinamida, rifabutina, rifampina, rifapentina y sulfato de estreptomina. El por lo menos un aminoglucosida puede ser por lo menos uno de los siguientes: sulfato de amikacina, sulfato de gentamicina, sulfato de neomicina, sulfato de estreptomina y sulfato de tobramicina. El por lo menos un elemento de penicilina puede ser por lo menos uno de los siguientes: amoxicilina/potasio de clavulanato, trihidrato de amoxicilina, ampicilina, sodio de ampicilina, trihidrato de ampicilina, sodio de ampicilina /sodio de sulbactam, sodio de cloxacilina, sodio de dicloxacilina, sodio de mezlocilina, sodio de nafcilina, sodio de oxacilina, benzatrina de penicilina G, potasio de penicilina G, procaína de penicilina G, sodio de penicilina G, potasio de penicilina V, sodio de piperacilina, sodio de pieracilina/sodio de tazobactamo, disodio de ticarcilina y disodio de ticarcilina/potasio de clavulanato. El por lo menos un cefalosporino puede ser por lo menos uno de los siguientes: cefaclor, cefadroxil, sodio de cefazolina, cefdinir, hidrocloreuro de cefepima, cefixima, sodio de cefmetazol, sodio de cefonicid, sodio de cefoperazona, sodio de cefotaxima, disodio de cefotetán, sodio de cefoxitina, proxetil de cefpodoxima, cefprozil, ceftazidima, ceftibutén, sodio de ceftizoxima, sodio de ceftriaxona, axetil de cefuroxima, sodio de cefuroxime, hidrocloreuro de cefalexín, monohidrato de cefalexín, cefradine y loracarbef. El por lo menos un elemento de tetraciclina puede ser por lo menos uno de los siguientes: hidrocloreuro de demeclociclina, calcio de doxiciclina, hclato de doxiciclina, hidrocloreuro de doxiciclina, monohidrato de doxiciclina, hidrocloreuro de minociclina e hidrocloreuro de tetraciclina. La por lo menos una sulfonamida puede ser por lo menos una de las siguientes: co-trimoxazol, sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfisoxazol, y acetilo de sulfisoxazol. El por lo menos una fluoroquinolona puede ser por lo menos uno de los siguientes: mesilato de alatrofloxacin, ciprofloxacin, enoxacina, levofloxacin, hidrocloreuro de lomefloxacin, ácido nalidíxico, norfloxacin, ofloxacin, esparfloxacin, y mesilato de trovafloxacin. El por lo menos un elemento de fluoroquinolona puede ser por lo menos uno de los siguientes: mesilato de alatrofloxacin, ciprofloxacin, enoxacina, levofloxacin, hidrocloreuro de lomefloxacin, ácido nalidíxico, norfloxacin, ofloxacin, esparfloxacin, y mesilato de trovafloxacin. El por lo menos un antiviral puede ser por lo menos uno de los siguientes: sulfato de abacavir, sodio de aciclovir, hidrocloreuro de amantadina, amprenavir, cidofovir, mesilato de delavirdina, didanosina, efavirenz, famciclovir, sodio de fomivirsén, sodio de foscamet, ganciclovir, sulfato de indinavir, lamivudina, lamivudina/zidovudina, mesilato de nelfmavir, nevirapina, fosfato de oseltamivir, ribavirina, hidrocloreuro de rimantadina, ritonavir, saquinavir, mesilato de saquinavir, stavudina, hidrocloreuro de valaciclovir, zalcitabina, zanamivir y zidovudina. El por lo menos un elemento de macrolina antiinfecciosa puede ser por lo menos ser uno de los siguientes: azitromicina, claritromicina, diritromicina, base de eritromicina, estolato de eritromicina, etilsuccinato de eritromicina, lactobionato de eritromicina y estearato de eritromicina. El por lo menos un elemento infeccioso general puede ser por lo menos uno de los siguientes

aztreonam, bacitracina, succinato de sodio de cloranfenicol, hidroclicloruro de clindamicina, hidroclicloruro de palmitato de clindamicina, fosfato de clindamicina, sodio de imipenem y cilastatina, meropenem, macrocristales de nitrofurantoína, microcristales de nitrofurantoína, quinupristina/dalfopristina, hidroclicloruro de espectinomicina, trimetoprim e hidroclicloruro de vancomicina. (Véase, por ejemplo, pp. 24-214 del Manual de medicamentos de enfermería 2001).

5 El por lo menos un inotrópico puede ser por lo menos uno de los siguientes: lactato de amrinona, digoxina, y lactato de millrinona. El por lo menos un antiarrítmico puede ser por lo menos uno de los siguientes adenosina, hidroclicloruro de amiodarona, sulfato de atropina, tosílato de bretilio, hidroclicloruro de diltiazem, disopiramida, fosfato de disopiramida, hidroclicloruro de esmolol, acetato de flecainida, fumarato de ibutilida, hidroclicloruro de udoacaína, hidroclicloruro de mexiletina, hidroclicloruro de moricizina, fenitoína, sodio de fenitoína, hidroclicloruro de procainamida, hidroclicloruro propafenona, hidroclicloruro de propranolol, bisulfato de quinidina, gluconato de quinidina, poligalacturonato de quinidina, sulfato de quinidina, sotalol, hidroclicloruro de tocainida e hidroclicloruro de verapamil. El por lo menos un antianginal puede ser por lo menos uno de los siguientes: besílato de amlodipidina, nitrito de amilo, hidroclicloruro de bepridilo, hidroclicloruro de diltiazem, dinitrato de isosorbida, mononitrato de isosorbida, nadolol, hidroclicloruro de nicardipina, nifedipina, nitroglicerina, hidroclicloruro de propranolol, verapamil e hidroclicloruro de verapamil. El por lo menos un antihipertensivo puede ser por lo menos uno de los siguientes: hidroclicloruro de acebutolol, besílato de amlodipina, atenolol, hidroclicloruro de benazepril, hidroclicloruro de betaxolol, fumarato de bisoprolol, ciletexil de candesartano, captopril, hidroclicloruro de carteolol, carvedilol, clonidina, hidroclicloruro de clonidina, diazoxida, hidroclicloruro de diltiazem, mesílato de doxazosina, enalaprilat, maleato de enalapril, mesílato de eprosartano, felodipina, mesílato de fenoldopam, sodio de fosinopril, acetato de guanabenz, sulfato de guanadrel, hidroclicloruro de guanfacina, hidroclicloruro de hidralazina, irbesartano, isradipina, hidroclicloruro de labetalol, lisinopril, potasio de losartano, metildopa, hidroclicloruro de metildopato, succinato de metoprolol, tartrato de metoprolol, minoxidil, hidroclicloruro de moexipril, nadolol, hidroclicloruro de nicardipina, nifedipina, nisoldipina, sodio de nitroprusida, sulfato de penbutolol, erbumina de perindopril, mesílato de fentolamina, pindolol, hidroclicloruro de prazosina, hidroclicloruro de propranolol, hidroclicloruro de quinapril, ramipril, telmisartan, hidroclicloruro de terazosina, maleato de timolol, trandolapril, valsartan e hidroclicloruro de verapamil. El por lo menos un antilipémico puede ser por lo menos uno de los siguientes: calcio de atorvastatina, sodio de cerivastatina, colestiramina, hidroclicloruro de colestipol, fenofibrato (micronizado), sodio de fluvastatina, gemfibrozil, lovastatina, niacina, sodio de pravastatina y simvastatina. El por lo menos un medicamento general CV puede ser por lo menos uno de los siguientes: abciximab, alprostadil, hidroclicloruro de arbutamina, cilostazol, bisulfato de clopidogrel, dipiridamol, eptifibatida, hidroclicloruro de midodrina, pentoxifilina, hidroclicloruro de ticlopidina e hidroclicloruro de tirofibano (véase, por ejemplo, pp. 215-336 del Manual de medicamentos para enfermería 2001).

35 El por lo menos un analgésico no narcótico o antipirético puede ser por lo menos uno de los siguientes: acetaminofeno, aspirina, trisalicilato de magnesio de colina, diflunisal y salicilato de magnesio. El por lo menos un medicamento antiinflamatorio no esteroideo puede ser por lo menos uno de los siguientes: celecoxib, potasio de diclofenaco, sodio de diclofenaco, etodolaco, calcio de fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, trihidrato de sodio de indometacina, ketoprofeno, trometamina de ketorolac, nabumetona, naproxeno, sodio de naproxeno, oxaprozina, piroxicam, rofecoxib y sulindac. El por lo menos un narcótico o analgésico opiáceo puede ser por lo menos uno de los siguientes: hidroclicloruro de alfentanil, hidroclicloruro de buprenorfina, tartrato de butorfanol, fosfato de codeína, sulfato de codeína, citrato de fentanilo, sistema transdérmico de fentalino, fentanilo transmucosal, hidroclicloruro de hidromorfona, hidroclicloruro de meperidina, hidroclicloruro de metadona, hidroclicloruro de morfina, sulfato de morfina, tartrato de morfina, hidroclicloruro de nalbufina, hidroclicloruro de oxycodona, pectinato de oxycodona, hidroclicloruro de oximorfona, hidroclicloruro de pentazocina, hidroclicloruro de pentazocina e hidroclicloruro de naloxona, lactato de pentazocina, hidroclicloruro de propoxifeno, napsílato de propoxifeno, hidroclicloruro de remifentanil, citrato de sufentanil e hidroclicloruro de tramadol. El por lo menos un sedante hipnótico puede ser por lo menos uno de los siguientes: hidrato de cloral, estazolam, hidroclicloruro de flurazepam, pentobarbital, sodio de pentobarbital, sodio de fenobarbital, sodio de secobarbital, temazepam, triazolam, zaleplon y tartrato de zolpidem. El por lo menos un anticonvulsivo puede ser por lo menos uno de los siguientes: sodio de acetazolamida, carbamazepina, clonazepam, dipotasio de clorazepato, diazepam, sodio de divalproex, etosuximida, sodio de fosfenitoína, gabapentina, lamotrigina, sulfato de magnesio, fenobarbital, sodio de fenobarbital, fenitoína, sodio de fenitoína, sodio de fenitoína (ampliado), primidona, hidroclicloruro de tiagabina, topiramato, sodio de valproato y ácido valproico. El por lo menos un antidepresivo puede ser por lo menos uno de los siguientes: hidroclicloruro de amitriptilina, pamoato de amitriptilina, amoxapina, hidroclicloruro de bupropion, bromhidrato de citalopram, hidroclicloruro de clomipramina, hidroclicloruro de desipramina, hidroclicloruro de doxepina, hidroclicloruro de fluoxetina, hidroclicloruro de imipramina, pamoato de imipramina, mirtazapina, hidroclicloruro de nefazodona, hidroclicloruro de nortriptilina, hidroclicloruro de paroxetina, sulfato de fenelzina, hidroclicloruro de sertralina, sulfato de tranilcipromina, maleato de trimipramina e hidroclicloruro de venlafaxina. El por lo menos un medicamento anti ansiedad puede ser por lo menos uno de los siguientes: alprazolam, hidroclicloruro buspirona, clordiazepoxida, hidroclicloruro de clordiazepoxida, dipotasio de clorazepato, diazepam, hidroclicloruro de doxepina, embonato de hidroxizina, hidroclicloruro de hidroxizina, pamoato de hidroxizina, lorazepam, mefrobamato, hidroclicloruro de midazolam y oxazepam. El por lo menos un medicamento antipsicótico puede ser por lo menos uno de los siguientes: hidroclicloruro de clorpromazina, clozapina, decanoato de fluphenazina, enantato de fluphenazina, hidroclicloruro de fluphenazina, haloperidol, decanoato de haloperidol, lactato de haloperidol, hidroclicloruro de loxapina, succinato de loxapina, besílato de mesoridazina, hidroclicloruro de molindona, olanzapina, perfenazina, pimozida, proclorperazina, fumarato de quetiapina, risperidona, hidroclicloruro de tioridazina, thiothixena, hidroclicloruro de thiothixena e hidroclicloruro de trifluoperazina. El por lo menos un estimulante del sistema

nervioso central puede ser por lo menos uno de los siguientes: sulfato de anfetamina, cafeína, sulfato de dextroanfetamina, hidrocloreuro de doxapram, hidrocloreuro de metamfetamina, hidrocloreuro de metilfenidato, modafinil, pemolina e hidrocloreuro de fentermina. El por lo menos un antiparkinsoniano puede ser por lo menos uno de los siguientes: hidrocloreuro de amantadina, mesilato de bengtropina, hidrocloreuro de biperideno, lactato de biperideno, mesilato de bromocriptina, carbidopa-levodopa, entacapona, levodopa, mesilato de pergolida, dehidrocloreuro de pramipexole, hidrocloreuro de ropinirol, hidrocloreuro de selegilina, tolcapona e hidrocloreuro de trihexifenidilo. El por lo menos un medicamento general del sistema nervioso central puede ser por lo menos uno de los siguientes: hidrocloreuro de bupropion, hidrocloreuro de donepezil, droperidol, maleato de fluvoxamina, carbonato de litio, citrato de litio, hidrocloreuro de naratriptano, polacrillex de nicotina, sistema transdérmico de nicotina, propofol, benzoato de rizatriptan, monohidrato de hidrocloreuro de sibutramina, succinato de sumatriptano, hidrocloreuro de tacrina y zolmitriptano (véase, por ejemplo, pp. 337-530 del Manual de medicamentos para enfermería 2001).

El por lo menos un colinérgico (por ejemplo, parasimatomimético) puede ser por lo menos uno de los siguientes: cloruro de betanecol, cloruro de edrofonio, bromuro de neostigmina, metilsulfato de neostigmina, salicilato de fisostigmina y bromuro de piridostigmina. El por lo menos un anticolinérgico puede ser por lo menos uno de los siguientes: sulfato de atropina, hidrocloreuro de diciclomina, glicopirrolato, hiosciamina, sulfato de hiosciamina, bromuro de propantelina, escopolamina, butilbromuro de escopolamina e hidrobromuro de escopolamina. El por lo menos un adrenergico (simpatomimético) puede ser por lo menos uno de los siguientes: hidrocloreuro de dobutamina, hidrocloreuro de dopamina, bitartrato de metaraminol, bitartrato de norepinefrina, hidrocloreuro de fenilefrina, hidrocloreuro de pseudoefedrina y sulfato de pseudoefedrina. El por lo menos un bloqueador adrenérgico (simpatolítico) puede ser por lo menos uno de los siguientes: mesilato de dehidroergotamina, tartrato de ergotamina, maleato de metisergida e hidrocloreuro de propranolol. El por lo menos un relajante muscular puede ser por lo menos uno de los siguientes: baclofeno, carisoprodol, clorzoxazona, hidrocloreuro de ciclobenzaprina, sodio de dantroleno, metocarbamol e hidrocloreuro de tizanidina. El por lo menos un bloqueador neuromuscular puede ser por lo menos uno de los siguientes: besilato de atracurio, besilato de cisatracurio, cloruro de doxacurio, cloruro de mivacurio, bromuro de pancuronio, bromuro de pipecuronio, bromuro de rapacuronio, bromuro de rocuronio, cloruro de succinilcolina, cloruro de tubocurarina y bromuro de vecuronio (véase, por ejemplo, pp. 531-84 del Manual de medicamentos para enfermería 2001).

El por lo menos un antihistamínico puede ser por lo menos uno de los siguientes: maleato de bronfeniramina, hidrocloreuro de cetirizina, maleato de clorfeniramina, fumarato de clemastina, hidrocloreuro de ciproheptadina, hidrocloreuro de difenhidramina, hidrocloreuro de fexofenadina, loratadina, hidrocloreuro de prometazina, teoclato de prometazina e hidrocloreuro de triprolidina. El por lo menos un broncodilatador puede ser por lo menos uno de los siguientes: albuterol, sulfato de albuterol, aminofilina, sulfato de atropina, sulfato de efedrina, epinefrina, bitartrato de epinefrina, hidrocloreuro de epinefrina, bromuro de ipratropio, isoproterenol, hidrocloreuro de isoproterenol, sulfato de isoproterenol, hidrocloreuro de levalbuterol, sulfato de metaproterenol, oxtrifilina, acetato de pirbuterol, xinafato de salmeterol, sulfato de terbutalina y teofilina. El por lo menos un expectorante o antitusivo puede ser por lo menos uno de los siguientes: benzonatato, fosfato de codeína, sulfato de codeína, hidrobromuro de dexametorfano, hidrocloreuro de difenhidramina, guaifenesina e hidrocloreuro de hidromorfona. El por lo menos un medicamento respiratorio general puede ser por lo menos uno de los siguientes: acetilcisteína, dipropionato de beclometasona, beractante, budesonida, calfactante, sodio de cromolino, alfa domasa, sodio de epoprostenol, flunisolida, propionato de fluticasona, sodio de montelukast, sodio de nedocromil, palivizumab, acetona de triamcinolona, zafirlukast y zileutón (véase, por ejemplo, pp. 585-642 del Manual de medicamentos para enfermería 2001).

El por lo menos un antiácido, adsorbente o antiflatulento puede ser por lo menos uno de los siguientes: carbonato de aluminio, hidróxido de aluminio, carbonato de calcio, magaldrato, hidróxido de magnesio, óxido de magnesio, simeticona y bicarbonato de sodio. La por lo menos una enzima digestiva o solubilizador de cálculos biliares puede ser por lo menos uno de los siguientes: pancreatina, pancrelipasa, y ursodiol. El por lo menos un antiidiarreico puede ser por lo menos uno de los siguientes: atapulguita, subsalicilato de bismuto, policarbofilo de calcio, hidrocloreuro de difenoxilato y sulfato de atropina, loperamida, acetato de octreótido, tintura de opio y tintura de opio (alcanforado). El por lo menos un laxante puede ser por lo menos uno de los siguientes: bisocodil, policarbofilo de calcio, cascara sagrada, fluidoextracto aromático de cascara sagrada, fluidoextracto de cascara sagrada, aceite de ricino, calcio de docusato, sodio de docusato, glicerina, lactulosa, citrato de magnesio, hidróxido de magnesio, sulfato de magnesio, metilcelulosa, aceite mineral, polietilenglicol o solución de electrolito, psilio, senna y fosfatos de sodio. El por lo menos un antiemético puede ser por lo menos uno de los siguientes: hidrocloreuro de clorpromazina, dimenhidrinato, mesilato de dolasetron, dronabinol, hidrocloreuro de granisetron, hidrocloreuro de meclizina, hidrocloreuro de metoclopramida, hidrocloreuro de ondansetron, perfenazina, proclorperazina, edisilato de proclorperazina, maleato de proclorperazina, hidrocloreuro de prometazina, escopolamina, maleato de tietilperazina e hidrocloreuro de trimetobenzamida. El por lo menos un medicamento antiulceroso puede ser por lo menos uno de los siguientes: cimetidina, hidrocloreuro de cimetidina, famotidina, lansoprazol, misoprostol, nizatidina, omeprazol, sodio de rabeprozol, citrato de bismuto de rantidina, hidrocloreuro de ranitidina y sucralfato (véase, por ejemplo, pp. 643-95 de Manual de medicamentos para enfermería 2001).

El por lo menos un corticosteroide puede ser por lo menos uno de los siguientes: betametasona, acetato de betametasona o fosfato de sodio de betametasona, fosfato de sodio de betametasona, acetato de cortisona, dexametasona, acetato de dexametasona, fosfato de sodio de dexametasona, acetato de fludrocortisona, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, cipionato de hidrocortisona, fosfato de sodio de hidrocortisona, succinato

de sodio de hidrocortisona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, succinato de sodio de metilprednisolona, prednisolona, acetato de prednisolona, fosfato de sodio de prednisolona, tebutato de prednisolona, prednisona, triamcinolona, acetona de triamcinolona y diacetato de triamcinolona. El por lo menos un esteroide andrógeno o anabólico puede ser por lo menos uno de los siguientes: danazol, fluoximesterona, metiltestosterona, decanoato de nandrolona, fenpropionato de nandrolona, testosterona, cipionato de testosterona, enantato de testosterona, propionato de testosterona y sistema transdérmico de testosterona. El por lo menos un estrógeno o progestina puede ser por lo menos uno de los siguientes: estrógenos esterificados, estradiol, cipionato de estradiol, sistema transdérmico de acetato de estradiol/noretindrona, valerato de estradiol, estrógenos (conjugados), estropipato, estradiol de etinilo, estradiol y desogestrel de etinilo, estradiol de etinilo y diacetato de etinodiol, estradiol de etinilo y desogestrel, estradiol de etinilo y diacetato de etinodiol, estradiol de etinilo y levonorgestrel, estradiol de etinilo y noretindrona, estradiol de etinilo y acetato de noretindrona, estradiol de etinilo y norgestimata, estradiol de etinilo y norgestrel, estradiol de etinilo y noretindrona y acetato de fumarato ferroso, levonorgestrel, acetato de medroxiprogesterona, mestranol y noretindrona, noretindrona, acetato de noretindrona, norgestrel y progestona. La por lo menos una gonadotropina puede ser por lo menos uno de los siguientes: acetato de ganirelix, acetato de gonadorelina, acetato de histrelina y menotropinas. El por lo menos un antidiabético o glucagón puede ser por lo menos uno de los siguientes: acarbosa, clorpropamida, glimepirida, glipizida, glucagón, gliburida, insulinas, hidrocloreto de metformina, miglitol, hidrocloreto de pioglitazona, repaglinida, maleato de rosiglitazona y troglitazona. La por lo menos una hormona tiroidea puede ser por lo menos uno de los siguientes: sodio de levotiroxina, sodio de lioironina, lioironina y tiroidea. El por lo menos un antagonista de hormona tiroidea puede ser por lo menos uno de los siguientes: metimazol, yoduro de potasio, yoduro de potasio (solución saturada), propiltiouracil, yodo radioactivo (yoduro de sodio ¹³¹I) y solución yodada fuerte. La por lo menos una hormona pituitaria puede ser por lo menos uno de los siguientes: corticotropina, cosintropina, acetato de desmofresina, acetato de leuprolida, corticotropina repositiva, somatrem, somatropina y vasopresina. El por lo menos un medicamento tipo paratiroideo puede ser por lo menos uno de los siguientes: calcifediol, calcitonina (humana), calcitonina (de salmón), calcitriol, dehidrotacisterol y disodio de etidronato (véase, por ejemplo, pp. 696-796 del Manual de medicamentos para enfermería 2001).

El por lo menos un diurético puede ser por lo menos uno de los siguientes: acetazolamida, sodio de acetazolamida, hidrocloreto de amilorida, bumetanida, clortalidona, sodio de etacrinato, ácido etacrínico, furosemida, hidroclorotiazida, indapamida, manitol, metolazona, espironolactona, torsemida, triamtereno, y urea. El por lo menos un electrolito o solución de reposición puede ser por lo menos uno de los siguientes: acetato de calcio, carbonato de calcio, cloruro de calcio, citrato de calcio, gluconato de calcio, gluceptato de calcio, gluconato de calcio, lactato de calcio, fosfato de calcio (dibásico), fosfato de calcio (tribásico), dextrano (alto peso molecular), dextrano (bajo peso molecular), hetaalmidón, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, acetato de potasio, bicarbonato de potasio, cloruro de potasio, gluconato de potasio, inyección de Ringer, inyección de Ringer (lactato) y cloruro de sodio. El por lo menos un acidificador o alcalinizador puede ser por lo menos uno de los siguientes: bicarbonato de sodio, lactato de sodio y trometamina. (Véase, por ejemplo, pp. 797-833 of Manual de medicamentos para enfermería 2001).

El por lo menos un hemático puede ser por lo menos uno de los siguientes: fumarato ferroso, gluconato ferroso, sulfato ferroso, sulfato ferroso (secado), dextrano de hierro, sorbitol de hierro, complejo de hierro polisacárido y complejo de gluconato férrico de sodio. El por lo menos un anticoagulante puede ser por lo menos uno de los siguientes: sodio de ardeparina, sodio de dalteparina, sodio danaparoida, sodio de enoxaparina, calcio de heparina, sodio de heparina y solución de warfarina. El por lo menos un derivado de la sangre puede ser por lo menos uno de los siguientes: albúmina 5 %, albúmina 25 %, factor antihemofílico, complejo coagulante anti-inhibidor, antitrombina III (humana), factor IX (humano), complejo factor IX y fracciones de proteína de plasma. La por lo menos una enzima trombolítica puede ser por lo menos uno de los siguientes: alteplasa, anistreplasa, reteplasa (recombinante), estreptocinasa y urocinasa (véase, por ejemplo, pp. 834-66 del Manual de medicamentos para enfermería 2001).

El por lo menos un medicamento alquilante puede ser por lo menos uno de los siguientes: busulfano, carboplatina, carmustina, clorambucil, cisplatina, ciclofosfamida, ifosfamida, lomustina, hidrocloreto mecloretamina, melfalán, hidrocloreto de melfalán, estreptozocina, temozolomida y tiotepa. El por lo menos un antimetabolito puede ser por lo menos uno de los siguientes: capecitabina, cladribina, citarabina, floxuridina, fosfato de fludarabina, fluorouracil, hidroxiaurea, mercaptopurina, metotrexato, sodio de metotrexato y tioguanina. El por lo menos un antineoplásico antibiótico puede ser por lo menos uno de los siguientes: sulfato de bleomicina, dactinomycin, citrato liposomal de daunorubicina, hidrocloreto de daunorubicina, hidrocloreto de doxorubicina, hidrocloreto liposomal de doxorubicina, hidrocloreto de epirubicina, hidrocloreto de idarubicina, mitomicina, pentostatina, plicamycin y valrubicina. El por lo menos un antineoplásico que modifica el equilibrio hormonal puede ser por lo menos uno de los siguientes: anastrozol, bicalutamida, fosfato de sodio de estramustina, exemestano, flutamida, acetato de goserelina, letrozol, acetato de leuprolida, acetato de megestrol, nilutamida, citrato de tamoxifeno, testolactona y citrato de toremifeno. El por lo menos un antineoplásico general puede ser por lo menos uno de los siguientes: asparaginasa, bacilo Calmette-Guerin (BCG) (intravesical vivo), dacarbazina, docetaxel, etoposida, fosfato de etoposida, hidrocloreto de gemcitabina, hidrocloreto de irinotecano, mitotano, hidrocloreto de mitoxantrona, paclitaxel, pegaspargasa, sodio de porfímero, hidrocloreto de procarbazona, rituximab, teniposida, hidrocloreto de topotecano, trastuzumab, tretinoína, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina y tartrato de vinorelbina (véase, por ejemplo, pp. 867-963 del Manual de medicamentos para enfermería 2001).

El por lo menos un inmunosupresor puede ser por lo menos uno de los siguientes: azatioprina, basiliximab, ciclosporina, daclizumab, globulina inmune de linfocito, muromonab-CD3, mofetil de micofelonato, hidroclicloruro mofetil de micofelonato, sirolimus y tacrolimus. La por lo menos una vacuna o toxoide puede ser por lo menos uno de los siguientes: vacuna de BCG, vacuna de la cólera, toxoides de difteria y tétanos (adsorbido), toxoides de difteria y tétanos y vacuna adsorbida de tos ferina celular, toxoides de difteria y tétanos y vacuna de la tos ferina de célula completa, vacunas conjugadas de hemofilia b, vacuna de hepatitis A (inactivada), vacuna de hepatitis B (recombinante), vacuna del virus de la gripe 1999-2000 de tipos trivalentes A & B (antígeno de superficie purificada), vacuna del virus de la gripe 1999-2000 de tipos trivalentes A & B (subvirión – o subvirión purificado), vacuna del virus de la gripe 1999-2000 tipos trivalentes A & B (virión completo), vacuna del virus de encefalitis japonesa (inactivada),
 5
 10
 15
 20
 25

El por lo menos un antiinfeccioso oftálmico puede seleccionarse a partir de: bacitracina, cloranfenicol, hidroclicloruro de ciprofloxacina, eritromicina, sulfato de gentamicina, ofloxacina 0,3 %, sulfato de polimixina B, sodio de sulfacetamida 10 %, sodio de sulfacetamida 15 %, sodio de sulfacetamida 30 %, tobramicina y vidarabina. El por lo menos un antiinflamatorio oftálmico puede ser por lo menos uno de los siguientes: dexametasona, fosfato de sodio de dexametasona, sodio de diclofenaco 0,1 %, fluorometolona, sodio de flurbiprofeno, trometamina de ketorolaco, acetato de prednisolona (suspensión) y fosfato de sodio de prednisolona (solución). El por lo menos un miótico puede ser por lo menos uno de los siguientes: cloruro de acetilcolina, carbacol (intraocular), carbacol (tópico), yoduro de ecotiofato, pilocarpina, hidroclicloruro de pilocarpina y nitrato de pilocarpina. El por lo menos un midriático puede ser por lo menos uno de los siguientes: sulfato de atropina, hidroclicloruro de ciclopentolato, hidroclicloruro de epinefrina, borato de epinefrilo, hidrobromuro de homatropina, hidroclicloruro de fenilefrina, hidrobromuro de escopolamina y tropicamida. El por lo menos un vasoconstrictor oftálmico puede ser por lo menos uno de los siguientes: hidroclicloruro de nafazolina, hidroclicloruro de oximetazolina e hidroclicloruro de tetrahidrozolina. El por lo menos un oftálmico general puede ser por lo menos uno de los siguientes: hidroclicloruro apraclonidina, hidroclicloruro de betaxolol, tartrato de brimonidina, hidroclicloruro de carteolol, hidroclicloruro de dipivefrina, hidroclicloruro de dorzolamida, difumarato de emedastina, sodio de fluorescina, fumarato de ketotifeno, latanoprost, hidroclicloruro de levobunolol, hidroclicloruro de metipranolol, cloruro de sodio (hipertónico) y maleato de timolol. El por lo menos un ótico puede ser por lo menos uno de los siguientes: ácido bórico, peróxido de carbamida, cloranfenicol y oleato-condensado de polipéptido de trietanolamina. El por lo menos un medicamento nasal puede ser por lo menos uno de los siguientes: dipropionato de beclometasona, budesónida, sulfato de efedrina, hidroclicloruro de epinefrina, flunisolida, propionato de fluticasona, hidroclicloruro de nafazolina, hidroclicloruro de oximetazolina, hidroclicloruro de fenilefrina, hidroclicloruro de tetrahidrozolina, acetonida de triamcinolona e hidroclicloruro de xilometazolina (véase, por ejemplo, las pp. 1041-97 del Manual de medicamentos para enfermería 2001).

El por lo menos un antiinfeccioso local puede ser por lo menos uno de los siguientes: acyclovir, anfotericina B, crema con ácido acelaico, bacitracina, nitrato de butoconazol, fosfato de clindamicina, clotrimazol, nitrato de econazol, eritromicina, sulfato de gentamicina, ketoconazol, acetato de mafenida, metronidazol (tópico), nitrato de miconazol, mupirocina, hidroclicloruro de naftifina, sulfato de neomicina, nitrofurazona, nistatina, sulfadiazina de plata, hidroclicloruro terbinafina, terconazol, hidroclicloruro de tetraciclina, tioconazol y tolnaftate. El por lo menos un escabicida o pediculicida puede ser por lo menos uno de los siguientes: crotamitón, lindano, permetrina y piretrin. El por lo menos un corticosteroide tópico puede ser por lo menos uno de los siguientes: dipropionato de bemetasona, valerato de betametasona, propionato de clobetasol, desonide, desoximetasona, dexametasona, fosfato de sodio de dexametasona, diacetato de diflorasona, acetonida de fluocinolona, fluocinonida, flurandrenolida, propionato de fluticasona, halcionida, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, valerato de hidrocortisona, furoato de mometasona y acetonida de triamcinolona (véase, por ejemplo, las pp. 1098-1136 del Manual de medicamentos para enfermería 2001).

65

La por lo menos una vitamina o mineral puede ser por lo menos uno de los siguientes: vitamina A, complejo de vitamina B, cianocobalamina, ácido fólico, hidroxocobalamina, calcio leucovorina, niacina, niacinamida, hidrocloreto de piridoxina, riboflavina, hidrocloreto de tiamina, vitamina C, vitamina D, colecalciferol, ergocalciferol, análogo de vitamina D, doxercalciferol, paricalcitol, vitamina E, análogo de vitamina K, fitonadiona, fluoruro de sodio, fluoruro de sodio (tópico), oligoelementos, cromo, cobre, yodo, manganeso, selenio y zinc. El por lo menos un calórico puede ser por lo menos uno de los siguientes: infusiones de aminoácido (cristalinas), infusiones de aminoácido en dextrosa, infusiones de aminoácido con electrolitos, infusiones de aminoácido con electrolitos en dextrosa, infusiones de aminoácido para fallo hepático, infusiones de aminoácido para estrés metabólico alto, infusiones de aminoácido para fallo renal, dextrosa, emulsiones grasas y triglicéridos de cadena media (véase, por ejemplo, las pp. 1137-63 del Manual de medicamentos para enfermería 2001).

Las composiciones de anticuerpo anti-IL-6 del presente invento también pueden incluir por lo menos uno de cualquier cantidad adecuada y eficaz de una composición o compuesto farmacéutico que incluye por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 en contacto o administrado a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite dicha modulación, tratamiento o terapia, que también podría comprender por lo menos uno de los siguientes: por lo menos un antagonista TNF (por ejemplo, entre otros, un antagonista TNF químico o proteína, anticuerpo o fragmento de TNF monoclonal o policlonal, un receptor de TNF soluble (por ejemplo, p55, p70 o p85) o fragmento, polipéptidos de su fusión o un antagonista de pequeña molécula TNF, por ejemplo, proteína I o II de unión de TNF (TBP-1 o TBP-II), nerelimonmab, infliximab, etanercept, CDP-571, CDP-870, afelimomab, lenercept y otros similares), un antireumático (por ejemplo, metotrexato, auranofin, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato de sodio de oro, sulfato de hidroxicloroquina, leflunomida, sulfasalzina), un relajante muscular, un narcótico, un medicamento antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueante neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo, aminoglucósido, antifúngico, antiparasitario, antiviral, carbapenem, cefalosporina, flurorquinolona, macrólido, penicilina, sulfonamida, tetracylina, otro antimicrobiano), un antipsoriásico, un corticosteroide, un esteroide anabólico, un agente relacionado con diabetes, un mineral, un nutricional, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con el calcio, un antidiarreico, un antitussivo, un antiemético, un antiulceroso, un laxante, un anticoagulante, un eritropoyetina (por ejemplo, epoyetina alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-CSF, Leukine), una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona del crecimiento, un medicamento hormonal sustitutivo, un modulador de receptores de estrógeno, un midriático, un ciclopéptico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor mitótico, un radiofarmacéutico, un antidepresivo, agente antimaníaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpatomimético, un estimulante, donepezil, tacrina, un medicamento para el asma, un agonista beta, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrieno, una metilxantina, un cromolino, una epinefrina o similar, domasa alfa (Pulmozima), una citoquina o un antagonista de citoquina. Entre los ejemplos de dichas citoquinas se incluyen, entre otros, cualquiera entre IL-1 a IL-23 (por ejemplo, IL-1, IL-2, etc.). Las dosis adecuadas son bien conocidas en este ámbito. Véase, por ejemplo, Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook* [Manual de farmacoterapia], 2ª edición, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia, Tarascón Pocket Pharmacopoeia 2000* [Farmacopea de bolsillo Tarascón 2000], edición de lujo, Tarascón Publishing, Loma Linda, CA (2000).

Dichos anticancerígenos o antiinfecciosos también pueden incluir moléculas de toxinas que se asocian, unen, co-formulan o co-administran con por lo menos un anticuerpo del presente invento. La toxina podría actuar para eliminar de forma selectiva la célula o tejido patológico. La célula patológica puede ser un cáncer u otra célula. Dichas toxinas pueden ser, entre otros, una toxina purificada o recombinante o fragmento de toxina que incluye por lo menos un dominio citotóxico funcional de toxina, por ejemplo, seleccionado a partir de por lo menos uno de los siguientes: ricino, toxina de la difteria, toxina de veneno una toxina bacteriana. El término toxina también incluye tanto las endotoxinas como exotoxinas producidas por cualquier bacteria o virus de producción natural, mutante o recombinante que podría causar cualquier afección patológica en humanos y otros mamíferos, incluido el shock por toxina, que puede provocar la muerte. Dichas toxinas podrían incluir, entre otros, enterotoxina termolábil de *E. coli* enterotoxigénica (LT), enterotoxina termoestable (ST), citotoxina Shigella, enterotoxinas *Aeromonas*, toxina-1 de síndrome de shock tóxico (TSST-1), enterotoxina *Estafilocócica A* (SEA), B (SEB), o C (SEC), enterotoxinas *Streptocócicas* y otros similares. Dichas bacterias incluyen, entre otros, cepas de una especie de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágico (por ejemplo, cepas del serotipo 0157:H7), especies de *Estafilococo* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*), especies de *Shigella* (por ejemplo, *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, y *Shigella sonnei*), especies de *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella typhi*, *Salmonella cholera-suis*, *Salmonella enteritidis*), especies de *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), especies de *Camphlobacter* (por ejemplo, *Camphlobacter jejuni*, *Camphlobacter fetus*), especies de *Heliobacter*, (por ejemplo, *Heliobacter pylori*), especies de *Aeromonas* (por ejemplo, *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*), *Pleisomonas shigelloides*, *Yersina enterocolitica*, especies de *Vibrios* (por ejemplo, *Vibrios cholerae*, *Vibrios parahemolyticus*), especies de *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococos*. Véase, por ejemplo, Stein, ed., *INTERNAL MEDICINE* [MEDICINA INTERNA], 3ª ed., pp. 1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans et al., eds., *Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control* [Infecciones bacterianas en humanos: epidemiología y control], 2ª. ed., pp. 239-254, Plenum Medical Book Co., New York (1991); Mandell et al, *Principles and Practice of Infectious Diseases* [Principios y práctica de enfermedades infecciosas], 3ª ed., Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow et al, eds., *The Merck Manual* [Manual Merck], 16ª ed., Merck and Co., Rahway, N.J., 1992; Wood et al, *FEMS*

Microbiology Immunology [Inmunología de microbiología], 76:121-134 (1991); Marrack et al, Science, 248:705-711 (1990).

5 Los compuestos, composiciones o combinaciones de anticuerpo anti-IL-6 del presente invento también pueden incluir al menos un auxiliar adecuado, como, entre otros, diluyente, aglutinante, estabilizador, tampones, sales, disolvente lipofílico, conservante, adyuvante o similares. Se prefieren los auxiliares aceptables farmacéuticamente. En esta técnica se conocen ejemplos (no limitativos) y métodos de preparación de dichas soluciones estériles como, entre otros, en Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences [Ciencia farmacéutica de Remington], 18ª Edición, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Se pueden seleccionar de forma rutinaria portadores adecuados farmacéuticamente que sean adecuados para la forma de administración, solubilidad y/o estabilidad del anticuerpo anti-IL-6, fragmento o composición variante de la forma bien conocida en este ámbito o como se describe en este documento.

15 Entre los excipientes farmacéuticos y aditivos útiles en la presente composición se incluyen, entre otros, proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos y carbohidratos (por ejemplo, azúcares, incluidos los monosacáridos, di-, tri-, tetra- y oligosacáridos; azúcares derivados, como alditores, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcar), que pueden estar presentes individualmente o en combinación, que incluyen solo o en combinación un 1-99,99 % por peso o volumen. Entre los ejemplos de excipientes de proteínas se incluyen albúmina sérica, como albúmina sérica humana (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína y similares. Entre los componentes de aminoácidos/anticuerpos representativos, que también pueden funcionar con capacidad amortiguadora, se incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo y similares. Uno de los aminoácidos que se prefieren es la glicina.

25 Entre los excipientes de carbohidratos adecuados para su uso en el invento se incluyen, por ejemplo, monosacáridos como la fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos, como la rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y los alditoles, como el manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol), mioinositol y similares. Los excipientes de carbohidrato que se prefieren para su uso en el presente invento son el manitol, la trehalosa y la rafinosa.

35 Las composiciones de anticuerpo anti-IL-6 también pueden incluir un tampón o agente de ajuste del pH; normalmente, el tampón es una sal preparada a partir de un ácido orgánico o base. Entre los tampones representativos se incluyen las sales de ácidos orgánicos, como las sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o el ácido ftálico; Tris, hidrocloreto de trometamina o tampones de fosfato. Los tampones que se prefieren para su uso en las presentes composiciones son las sales de ácidos orgánicos, como el citrato.

40 Además, las composiciones de anticuerpo anti-IL-6 del invento pueden incluir excipientes/aditivos poliméricos, como las polivinilpirrolidonas, ficolls (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, como 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina), glicoles de polietileno, agentes saborizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, tensoactivos (por ejemplo, polisorbatos, como "TWEEN 20" y "TWEEN 80"), lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (por ejemplo, colesterol), y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA).

45 Estos y otros excipientes y/o aditivos farmacéuticos adicionales conocidos adecuados para su uso en el anticuerpo anti-IL-6, porción o variaciones de su composición de acuerdo con el invento con conocidos, por ejemplo, de la forma indicada en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy" [«Remington: la ciencia y la práctica de la farmacia»], 19ª ed., Williams & Williams, (1995) y en "Physician's Desk Reference" [Referencia de escritorio del médico], 52ª ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998). Los materiales portadores o excipientes que se prefieren son carbohidratos (por ejemplo, sacáridos y alditoles) y tampones (por ejemplo, citrato) o agentes poliméricos. Una molécula portadora, a modo de ejemplo, es el mucopolisacárido, ácido hialurónico, que podría ser útil para la administración intraarticular.

Formulaciones

55 Como se ha indicado, el invento proporciona formulaciones estables, que preferiblemente incluyen un tampón de fosfato con salino o una sal escogida, así como soluciones conservadas y formulaciones que contengan un conservante, así como formulaciones conservadas multi-uso adecuadas para uso farmacéutico o veterinario, que incluye por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 en una formulación aceptable farmacéuticamente. Las formulaciones conservadas contienen por lo menos un conservante conocido o uno que podría seleccionarse del siguiente grupo:
60 por lo menos un fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, nitrito de fenilmercúrico, fenixietanol, formaldehído, clorobutanol, cloruro de magnesio (por ejemplo, hexahidrato), alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de benzetonio, dehidroacetato de sodio y timerosal, polímeros o mezclas de los mismos en un diluyente acuoso. Cualquier concentración adecuada o mezcla puede usarse por técnicas conocidas, como aproximadamente 0,0015 % o cualquier rango, valor o fracción de los mismos.
65 Algunos ejemplos (no limitativos) son, sin conservante, aproximadamente 0,1-2 % m-cresol (por ejemplo, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,9, 1,0 %), aproximadamente 0,1-3 % alcohol bencílico (por ejemplo, 0,5, 0,9, 1,1, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5 %),

aproximadamente 0,001-0,5 % timerosal (por ejemplo, 0,005, 0,01), aproximadamente 0,001-2,0 % fenol (por ejemplo, 0,05, 0,25, 0,28, 0,5, 0,9, 1,0 %), 0,0005-1,0 % alquilparabeno(s) (por ejemplo, 0,00075, 0,0009, 0,001, 0,002, 0,005, 0,0075, 0,009, 0,01, 0,02, 0,05, 0,075, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 0,75, 0,9, 1,0 %) y similares.

5 Como se ha indicado anteriormente, el invento proporciona un artículo manufacturado, que incluye material de empaquetado y por lo menos un vial que incluye una solución de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 con los
 10 tampones y/o conservantes indicados, opcionalmente un diluyente acuoso, donde dicho material de empaquetado incluye una etiqueta que indica que dicha solución puede mantenerse por un período de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 horas o más. El invento también incluye un artículo manufacturado, que incluye material de empaquetado, un primer vial que tiene liofilizado por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 y un segundo vial que incluye un diluyente acuoso del tampón o conservante prescrito, donde dicho material de empaquetado incluye una etiqueta que indica al paciente que reconstituir el por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 en el diluyente acuoso para formar una solución que puede mantenerse por un período de veinticuatro horas o más.

15 El por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 que se utiliza de acuerdo con el presente invento puede producirse por medios recombinantes, entre ellos a partir de células de mamífero célula o preparaciones transgénicas, o puede purificarse a partir de otras fuentes biológicas, como las descritas en este documento o por técnicas conocidas.

20 El rango de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 en el producto del presente invento incluye cantidades que producen tras la reconstitución, en un sistema húmedo/seco, concentraciones de entre aproximadamente 1,0 µg/ml y aproximadamente 1000 mg/ml, aunque las concentraciones mayores y menores son manejables y dependen de la vía de administración que se pretenda, por ejemplo, las formulaciones en solución serán diferentes de los parches transdérmicos o de métodos pulmonar, transmucoso, osmótico o micro bomba.

25 Preferiblemente, el diluyente acuoso podría también comprender un conservante aceptable farmacéuticamente. Entre los conservantes que se prefieren se incluyen los seleccionados a partir del grupo que consta de fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, desidroacetato de sodio y timerosal o mezclas de los mismos. La concentración de conservantes que se usan en la formulación es una concentración suficiente para producir un efecto anti-microbiano. Dichas concentraciones dependen del conservante que se haya seleccionado y el técnico podrá definir las fácilmente.

30 Otros excipientes, por ejemplo, agentes de isotonicidad, tampones, antioxidantes y mejoradores de los conservantes, puede añadirse (y sería preferible hacerlo) al diluyente. Un agente de isotonicidad, como la glicerina, se usa habitualmente a concentraciones conocidas. Preferiblemente, se añade un tampón tolerado fisiológicamente para proporcionar un control mejorado del pH. Las formulaciones pueden cubrir un rango mayor de pHs, como desde pH 4 hasta aproximadamente pH 10 y los rangos que se prefieren van desde aproximadamente pH 5 hasta aproximadamente pH 9, y un rango que se prefiere todavía más de aproximadamente 6.0 hasta aproximadamente 8.0. Preferiblemente, las formulaciones del presente invento tienen un pH entre aproximadamente 6.8 y aproximadamente 7.8. Entre los tampones que se prefieren se incluyen tampones de fosfato, preferiblemente, fosfato de sodio, especialmente, salino tamponado de fosfato (PBS).

35 Otros aditivos, como los solubilizadores aceptables farmacéuticamente como Tween 20 (polioxietileno (20) monolaurato de sorbitán), Tween 40 (polioxietileno (20) monopalmitato de sorbitano), Tween 80 (polioxietileno (20) monooleato de sorbitán), F68 Plurónico (copolímeros de bloque de polioxietileno polioxipropileno) y PEG (polietilenglicol) o tensoactivos no iónicos, como polisorbato 20 o 80 o poloxamer 184 o 188, polils Pluronic®, otros co-polímeros de bloque y queladores, como EDTA y EGTA, podrían añadirse también a las formulaciones o compuestos para reducir la agregación. Estos aditivos son especialmente útiles si se usa una bomba o recipiente plástico para administrar la formulación. La presencia de tensoactivos aceptables farmacéuticamente mitiga la propensión de la proteína a la agregación.

40 Las formulaciones del presente invento pueden prepararse por un proceso que incluye la mezcla de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 y un conservante seleccionado del grupo que consta de: fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabeno, (metilo, etilo, propilo, butilo y semejantes), cloruro del benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal o mezclas de los mismos en un diluyente acuoso. La mezcla de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 y conservante en un diluyente acuoso se realiza usando procedimientos convencionales para la disolución y la mezcla. Para preparar una formulación adecuada, por ejemplo, se combina una cantidad medida de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 en solución tamponada con el conservante deseado en una solución tamponada en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y el conservante a las concentraciones que se buscan. Un técnico en la materia reconocería las variaciones de este proceso. Por ejemplo, el orden de adición de los componentes, si se usan aditivos adicionales, la temperatura y pH al que se prepara la formulación son factores que se pueden optimizar para la concentración y vía de administración.

45 Las formulaciones reivindicadas pueden suministrarse a pacientes como soluciones claras o en forma de viales de tipo dual, que incluyen un vial liofilizado de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 que se reconstituye con un segundo vial que contiene agua, un conservante y/o excipientes, preferiblemente, un tampón de fosfato y/o salino y una sal seleccionada, en un diluyente acuoso. Independientemente de si es un vial de solución única un vial dual que

necesita reconstitución, puede reutilizarse múltiples veces y puede ser suficiente para un ciclo único o ciclos múltiples de tratamiento para un paciente y de esa forma puede proporcionar un régimen de tratamiento más adecuado que los disponibles actualmente.

5 Los presentes artículos manufacturados que se reivindican son útiles para su administración en un período que varía desde el momento inmediato a veinticuatro horas o más. En consecuencia, los artículos manufacturados que se reivindican ofrecen ventajas significativas para el paciente. Las formulaciones del invento podrían almacenarse de forma segura a temperaturas de aproximadamente 2° C hasta aproximadamente 40° C y mantener la actividad biológica de la proteína durante largos períodos de tiempo, permitiendo etiquetar el paquete con una indicación de
10 que la solución puede guardarse y/o usarse en un período de 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 o 96 horas o más. Si se usa el diluyente conservado, dicha etiqueta puede incluir un uso hasta 1-12 meses, medio año, año y medio, y/o dos años.

Las soluciones de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 del invento pueden prepararse por medio de un proceso que incluye la mezcla de por lo menos un anticuerpo en un diluyente acuoso. La mezcla se lleva a cabo usando procedimientos de disolución y mezcla convencionales. Para preparar un diluyente adecuado, por ejemplo, se combina una cantidad medida de por lo menos un anticuerpo en agua o tampón en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y, de forma opcional, un conservante o tampón a las concentraciones deseadas. Alguien que tenga un conocimiento normal de esta la materia reconocería las variaciones de este proceso. Por ejemplo, el orden en que se añaden los componentes, si se usan aditivos adicionales, la temperatura y pH a los que se prepara la formulación, son factores que pueden optimizarse para la concentración y vías de administración que se usen.

Los productos reivindicados pueden administrarse a pacientes en forma de soluciones claras o de viales duales que incluyen un vial de liofilizado por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 que se reconstituye con un segundo vial que contiene el diluyente acuoso. Independientemente de si es una solución única o un vial dual que necesita reconstitución, puede reutilizarse en múltiples ocasiones y puede ser suficiente para un ciclo único o ciclos múltiples del tratamiento de un paciente, por lo que proporciona un régimen de tratamiento más adecuado que los que se encuentran disponibles actualmente.

Los productos reivindicados pueden suministrarse a pacientes de forma indirecta, suministrando a farmacias, clínicas o otras instituciones e instalaciones similares, soluciones claras o viales duales que incluyen un vial de liofilizado de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 que se reconstituye con un segundo vial que contiene el diluyente acuoso. La solución clara en este caso puede ser de hasta un litro o incluso de mayor tamaño, proporcionando un gran reservorio a partir del cual se pueden recuperar porciones menores de por lo menos una solución de anticuerpo una o más veces para transferirlas a viales de menor tamaño y que la farmacia o clínica pueda suministrarlos a sus clientes y/o pacientes.

Los instrumentos reconocidos que incluyen sistemas de vial único incluyen instrumentos de lápiz inyector para la administración de una solución, lápices BD, BD Autojector®, Humaject®, NovoPen®, B-D®Pen, AutoPen® y OptiPen®, GenotropinPen®, Genotronorm Pen®, Humatro Pen®, Reco-Pen®, Roferon Pen®, Biojector®, lject®, J-tip Needle-Free Injector®, Intraject®, Medi-Ject®, por ejemplo, fabricados o desarrollados por Becton Dickenson (Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com), Disetronic (Burgdorf, Switzerland, www.disetronic.com; Bioject, Portland, Oregon (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, www.mediject.com) y otros instrumentos similares. Los instrumentos reconocidos que incluyen un sistema vial dual incluyen los sistemas de lápiz inyector para reconstituir un medicamento liofilizado en un cartucho para la administración de la solución reconstituida, como el HumatroPen®. Entre los ejemplos de otros instrumentos adecuados se incluyen jeringuillas precargadas, auto-inyectores, inyectores sin aguja y conjuntos de infusión IV sin aguja.

Los productos que se reivindican en el presente documento incluyen material de empaquetado. Este material proporciona, además de la información indicada por las agencias reguladoras, las afecciones con las que se puede usar el producto. El empaquetado del presente invento proporciona instrucciones al paciente para reconstituir el por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 en el diluyente acuoso para formar una solución y usar la solución en un período de 2-24 horas o mayor para el producto de dos viales, húmedo/seco. Para el vial único, producto en solución, la etiqueta indica que dicha solución puede usarse durante un período de 2-24 horas o mayor. Los productos que se reivindican en este documento son útiles para el uso farmacéutico en humanos del producto.

Las formulaciones del presente invento pueden prepararse por medio de un proceso que incluye la mezcla de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 y un tampón seleccionado, preferiblemente, un tampón de fosfato que contenga salino o una sal seleccionada. La mezcla de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 y el tampón en un diluyente acuoso se lleva a cabo usando disolución y procedimientos convencionales. Para preparar una formulación adecuada, por ejemplo, una cantidad medida de por lo menos un anticuerpo en agua o tampón se combina con el agente tampón que se desee en agua en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y tampón en las concentraciones que se deseen. Alguien con un conocimiento normal de la materia reconocería las variaciones de este proceso. Por ejemplo, el orden en el que se añaden los componentes, si se usan aditivos adicionales, la temperatura y pH a los que se prepara la formulación, son factores que se pueden optimizar para la concentración y medios de administración que se hayan usado.

Las formulaciones estables o conservadas que se reivindican pueden suministrarse a los pacientes en forma de soluciones claras o viales duales que incluyen un vial de liofilizado de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 que se reconstituye con un segundo vial que contiene un conservante o tampón y excipientes en un diluyente acuoso. Ya sea un vial de solución única o un vial dual que necesite reconstitución puede reutilizarse en múltiples ocasiones y puede ser suficiente para un ciclo único o ciclos múltiples de tratamiento de un paciente y por lo tanto proporciona un régimen de tratamiento más adecuado que los disponibles actualmente.

Otras formulaciones o métodos para estabilizar el anticuerpo anti-IL-6 podrían tener como resultado solo una solución clara de polvo liofilizado que incluye el anticuerpo. Entre las soluciones no claras están las formulaciones que incluyen suspensiones de partículas, dichas partículas serían una composición que contenga el anticuerpo anti-IL-6 en una estructura de dimensión variable y conocida diversamente como microesfera, micropartícula, nanopartícula, nanoesfera o liposoma. Estas formulaciones de partículas relativamente homogéneas, esencialmente esféricas, que contienen un agente activo pueden formarse contactando una fase acuosa que contenga el agente activo y un polímero y una fase no-acuosa seguida de la evaporación de la fase no acuosa para causar la coalescencia de partículas a partir de la fase acuosa como se indica en la patente de EE. UU. n° 4.589.330. Las micropartículas porosas pueden prepararse usando una primera fase que contenga un agente activo y un polímero dispersado en un disolvente continuo y que retire dicho disolvente de la suspensión por liofilización o dilución-extracción-precipitación como se indica en la patente de EE. UU. n° 4.818.542. Los polímeros que se prefieren para dichas preparaciones son copolímeros o polímeros naturales o sintéticos que se seleccionan a partir del grupo que consta de gelatina agar, almidón, arabinogalactano, albúmina, colágeno, ácido poliglicólico, poliácido láctico, glicólido-L(-) láctido poli(epsilon-caprolactona, poli(epsilon-caprolactona-CO-ácido láctico), poli(epsilon-caprolactona-CO-ácido glicólico), poli(B-hidroxi ácido butírico), óxido polietileno, polietileno, poli(alquilo-2-cianoacrilato), poli(hidroxi etilo metacrilato), poliamidas, poli(aminoácidos), poli(2-hidroxi etilo DL-aspartamida), poli(éster urea), poli(L-fenilalanina/etileno glicol/1,6-diisocianato hexano) y poli(metil metacrilato). Los polímeros que se prefieren son los poliésteres, como el ácido poliglicólico, el ácido poliláctico, el glicólido-L(-) láctido poli(epsilon-caprolactona, poli(epsilon-caprolactona-CO-ácido láctico) y poli(epsilon-caprolactona-CO-ácido glicólico). Los solventes útiles para disolver el polímero y/o el activo incluyen: agua, hexafluoroisopropanol, metilencloruro, tetrahidrofurano, hexano, benceno o sesquihidrato de hexafluoroacetona. El proceso para dispersar la fase activa con una segunda fase podría implicar forzar la presión de dicha primera fase a través de un orificio en un pulverizado para afectar a la formación de gotas.

Las formulaciones en polvo seco podrían ser resultado de procesos diferentes de la liofilización, como secado por pulverización o extracción por solvente por evaporación o por precipitación de una composición cristalina seguida de un paso o más para retirar el solvente acuoso o no acuoso. La preparación de una preparación de anticuerpo por secado por pulverización se explica en la patente de los EE. UU. 6.019.968. Los compuestos de polvo seco basados en anticuerpos podrían producirse por soluciones de secado por pulverización o lodos del anticuerpo y, opcionalmente, excipientes, en un disolvente en enfermedades para proporcionar un polvo seco respirable. Los disolventes podrían incluir compuestos polares, como agua y etanol, que podrían secarse rápidamente. La estabilidad del anticuerpo podría mejorarse llevando a cabo el procedimiento de secado por pulverización en ausencia de oxígeno, como en una capa de nitrógeno o usando nitrógeno como gas secante. Otra formulación relativamente seca es una dispersión de un grupo de microestructuras perforadas en un medio de suspensión que normalmente comprenda un propulsor de hidrofuroalcano como se explica en WO 9916419. Las dispersiones estabilizadas podrían administrarse al pulmón del paciente usando un inhalador dosificado. El equipo útil para la fabricación comercial de medicamentos secados por pulverización lo fabrica Buchi Ltd. o Niro Corp.

Por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 en las formulaciones estables o conservadas o en las soluciones que se describen en este documento pueden administrarse a un paciente de acuerdo con el presente invento a través de varios métodos de administración incluida inyección SC o IM; transdérmica, pulmonar, transmucosal, implante, bomba osmótico, cartucho, microbomba u otros medios apreciados por los expertos en la materia y que son conocidos.

Aplicaciones terapéuticas

En este documento se presenta un método para modular o tratar por lo menos una enfermedad relacionada con IL-6 en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, por técnicas conocidas o como se ha descrito en este documento, usando por lo menos un anticuerpo IL-6 del presente invento, por ejemplo, administrando o contactando con la célula, tejido, órgano, animal, o paciente con una cantidad terapéutica efectiva de anticuerpo IL-6. También se presenta en este documento un método para modular o tratar por lo menos una enfermedad relacionada con IL-6, en una célula, tejido, órgano, animal, o paciente que incluya, entre otros, por lo menos uno de los siguientes: obesidad, enfermedad de tipo inmune, enfermedad cardiovascular, enfermedad infecciosa, enfermedad maligna o enfermedad neurológica.

En este documento también se presenta un método para modular o tratar por lo menos una enfermedad inmune relacionada con IL-6, en una célula, tejido, órgano, animal, o paciente incluidos, entre otros, por lo menos uno de los siguientes: artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis reumatoide juvenil de inicio sistémico, artritis

psoriásica, espondilitis anquilosante, úlcera gástrica, artropatía seronegativa, osteoartritis, osteolisis, aflojamiento aséptico de implantes ortopédicos, enfermedad intestinal inflamatoria, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso cutáneo, nefritis lúpica, síndrome antifosfolípido, iridociclitis/uveitis/neuritis óptica, fibrosis pulmonar idiopática, vasculitis sistémica/ granulomatosis de Wegener, sarcoidosis, orquitis/procedimientos de inversión de vasectomía, enfermedades alérgicas/atópicas, asma, rinitis alérgica, eccema, dermatitis alérgica de contacto, conjuntivitis alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, trasplantes, rechazo de trasplante de órgano, enfermedad de injerto contra huésped, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, septicemia, sepsis de gram positivo, sepsis de gram negativo, sepsis de cultivo negativo, sepsis fúngico, fiebre neutropénica, urosepsis, meningococcemia, trauma/hemorragia, quemaduras, exposición a radiación ionizante, pancreatitis aguda, síndrome de dificultad respiratoria adulta, artritis reumatoide, hepatitis inducida por alcohol, patologías inflamatorias crónicas, sarcoidosis, enfermedad de Crohn, anemia falciforme, diabetes, nefritis, enfermedades atópicas, reacciones de hipersensibilidad, rinitis alérgica, fiebre del heno, rinitis perenne, conjuntivitis, endometriosis, asma, urticaria, anafilaxis sistémica, dermatitis, anemia perniciosa, enfermedad hemolítica, trombocitopenia, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido, rechazo de trasplante renal, rechazo de trasplante de corazón, rechazo de trasplante de hígado, rechazo de trasplante de páncreas, rechazo de trasplante de pulmón, rechazo de trasplante de médula ósea (BMT), rechazo de aloinjerto de piel, rechazo de trasplante de cartílago, rechazo de injerto óseo, rechazo de trasplante de intestino delgado, rechazo de implante de timo fetal, rechazo de trasplante de paratiroides, rechazo de xenoinjerto de cualquier órgano o tejido, rechazo de aloinjerto, reacciones de hipersensibilidad anti-receptores, enfermedad de Graves, enfermedad de Raynaud, diabetes tipo B resistente a insulina, asma, miastenia gravis, citotoxicidad mediada por anticuerpos, reacciones de hipersensibilidad tipo III, síndrome POEMS (polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gamopatía monoclonal y síndrome de cambios cutáneos), polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gamopatía monoclonal, síndrome de cambios cutáneos, síndrome antifosfolípido, pénfigo, escleroderma, enfermedad mixta del tejido conectivo, enfermedad de Addison idiopática, diabetes mellitus, hepatitis activa crónica, cirrosis biliar primaria, vitiligo, vasculitis, síndrome de cardiomiopatía post-MI, hipersensibilidad tipo IV, dermatitis de contacto, neumonitis de hipersensibilidad, rechazo de aloinjerto, granulomas debidos a organismos intracelulares, sensibilidad a medicamentos, metabólico/idiopático, enfermedad de Wilson, hemacromatosis, déficit de alfa-1-antitripsina, retinopatía diabética, tiroiditis de hashimoto, osteoporosis, evaluación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, cirrosis biliar primaria, tiroiditis, encefalomiелitis, caquexia, fibrosis quística, enfermedad pulmonar crónica neonatal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), linfocitosis familiar hematofagocítica, afecciones dermatológicas, psoriasis, alopecia, síndrome nefrótico, nefritis, nefritis glomerular, fallo renal agudo, hemodiálisis, uremia, toxicidad, pre-eclampsia, terapia okt3, terapia anti-cd3, terapia de citoquina, quimioterapia, terapia de radiación (por ejemplo, se incluyen, entre otros, astenia, anemia, caquexia y similares), intoxicación crónica por salicilato y similares. Véase, por ejemplo, el Manual Merck, ediciones 12^a-17^a Editions, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook [Manual de farmacoterapia], Wells et al., eds., 2^a ed., Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000).

También se presenta en este documento un método para modular o tratar por lo menos una enfermedad cardiovascular en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluidos, entre otros, por lo menos uno de los siguientes: síndrome de aturdimiento cardíaco, infarto de miocardio, insuficiencia cardíaca congestiva, embolia, derrame isquémico, hemorragia, síndrome coronario agudo, arteriosclerosis, aterosclerosis, restenosis, enfermedad arteriosclerótica diabética, hipertensión, hipertensión arterial, hipertensión renovascular, síncope, conmoción, sífilis del sistema cardiovascular, insuficiencia cardíaca, cor pulmonale, hipertensión pulmonar primaria, arritmias cardíacas, latidos auriculares ectópicos, aleteo auricular, fibrilación auricular (sostenida o paroxística), síndrome post perfusión, respuesta inflamatoria a derivación cardiopulmonar, taquicardia auricular caótica o multifocal, taquicardia normal de QRS estrecho, arritmias específicas, fibrilación ventricular, arritmias del haz de His, bloqueo atrioventricular, bloqueo de rama, trastorno isquémico de miocardio, cardiopatía isquémica, angina de pecho, infarto de miocardio, cardiomiopatía, cardiomiopatía dilatada congestiva, cardiomiopatía restrictiva, valvulopatía, endocarditis, enfermedad pericárdica, tumores cardíacos, aneurismas aórtico y periférico, disección aórtica, inflamación de la aorta, oclusión de la aorta abdominal y sus ramificaciones, trastornos vasculares periféricos, trastornos arteriales oclusivos, enfermedad arteriosclerótica periférica, tromboangeitis obliterante, trastornos arteriales periféricos funcionales, fenómeno y síndrome de Raynaud, acrocianosis, eritromelalgia, enfermedades venosas, trombosis venosa, venas varicosas, fístula arteriovenosa, linfedema, lipedema, angina inestable, lesión de isquemia, síndrome post bombeo, lesión de isquemia-reperfusión y similares. Dicho método podría también comprender la administración de una cantidad eficaz de una composición o compuesto farmacéutico que incluye por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite dicha modulación, tratamiento o terapia.

También se presenta en este documento un método para modular o tratar por lo menos una enfermedad infecciosa relacionada con IL-6 en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluyendo, entre otras, por lo menos una de las siguientes: infección bacteriana aguda o crónica, procesos infecciosos parasitarios agudo y crónico, incluidas las infecciones bacterianas, víricas y fúngicas, infección por VIH/neuropatía VIH, meningitis, hepatitis (por ejemplo, A, B o C o similares), artritis séptica, peritonitis, neumonía, epiglotitis, e. coli 0157:h7, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombótica, malaria, dengue hemorrágico, leishmaniosis, lepra, síndrome del shock tóxico, miositis por estreptococo, gangrena gaseosa, tuberculosis microbacteriana, mycobacterium avium intracellulare, neumonía pneumocystis carinii, enfermedad inflamatoria pélvica, orquitis/epididimitis, legionella,

enfermedad de Lyme, gripe A, virus de epstein-barr, síndrome hemafagocítico viral, encefalitis viral/meningitis aséptica y similares.

5 También se presenta en este documento un método para modular o tratar por lo menos una enfermedad maligna relacionada con IL-6 en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluyendo, entre otros, por lo menos uno de los siguientes: leucemia, leucemia aguda, leucemia aguda linfoblástica (ALL), leucemia linfocítica aguda, B-célula, T-célula o FAB ALL, leucemia mieloide aguda (AML), leucemia mielógena aguda, leucemia mielocítica crónica (CML), leucemia linfocítica crónica (CLL), leucemia de células pilosas, síndrome mielodiplástico (MDS), un linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma maligno, linfoma no-hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorectal, carcinoma pancreático, carcinoma nasofaríngeo, histiocitosis maligna, síndrome paraneoplástico/hipercancemia maligna, tumores sólidos, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorectal, cáncer endometrial, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer no poliposo hereditario, linfoma de Hodgkin, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma de célula renal, cáncer testicular, adenocarcinomas, sarcomas, melanoma maligno, hemangioma, enfermedad metastática, resorción ósea relacionada con cáncer, dolor óseo relacionado con cáncer y similares.

20 También se presenta en este documento un método para modular o tratar por lo menos una enfermedad neurológica relacionada con IL-6 en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluidas, entre otras, por lo menos una de las siguientes: enfermedades neurodegenerativas, esclerosis múltiple, dolor de cabeza por migraña, complejo de demencia del SIDA, enfermedades desmielinizantes, como esclerosis múltiple y mielitis transversa aguda; trastornos extrapiramidal y cerebeloso, como lesiones del sistema corticoespinal; trastornos de los ganglios basales; trastornos de movimientos hiperkinéticos, como corea de Huntington y corea senil; trastornos del movimiento inducidos por medicamentos, como los inducidos por medicamentos que bloquean los receptores de dopamina CNS; trastornos del movimiento hipocinético, como la enfermedad de Parkinson; parálisis supranuclear progresiva; lesiones estructurales del cerebelo; degeneraciones espinocerebelares, como ataxia espinal, ataxia de Friedreich, degeneraciones corticales cerebelares, degeneraciones de sistemas múltiples (Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager, y Machado-Joseph); trastornos sistémicos (enfermedad de Refsum, abetalipoproteinemia, ataxia, telangiectasia y trastorno mitocondrial multisistémico); trastornos de núcleo desmielinizante, como esclerosis múltiple, mielitis transversal aguda; y trastornos de la unidad motora, como atrofia muscular neurogénica (degeneración celular del hom anterior, como esclerosis lateral amiotrófica, atrofia muscular espinal infantil y atrofia muscular espinal juvenil); enfermedad de Alzheimer; Síndrome de Down de mediana edad; síndrome de cuerpos de Lewy difusos; demencia senil de cuerpos de Lewy; síndrome Wernicke-Korsakoff; alcoholismo crónico; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; panencefalitis esclerosante subaguda, enfermedad de Hallerorden-Spatz; demencia pugilística; lesiones neurotraumáticas (por ejemplo, lesiones de médula espinal, lesión cerebral, conmoción cerebral, conmoción repetitiva); dolor; dolor inflamatorio; autismo; depresión; derrame cerebral; trastornos cognitivos; epilepsia y similares. Dicho método podría también incluir la administración de una cantidad eficaz de una composición o compuesto farmacéutico que incluye por lo menos un anticuerpo TNF o porción especificada o variante de una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite dicha modulación, tratamiento o terapia. Véase, por ejemplo, el Manual Merck, 16ª ed., Merck & Company, Rahway, NJ (1992).

45 También se presenta un método para modular o tratar por lo menos una herida, trauma o lesión en un tejido u otra afección crónica relacionada con IL-6, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluidos, entre otros, por lo menos uno de los siguientes: lesión corporal o trauma asociado con cirugía oral incluida cirugía periodontal, extracción/es dentaria(s), tratamiento de endodoncia, inserción de implantes dentales, aplicación y uso de prótesis dentarias; o donde la herida se seleccione a partir del grupo que consta de: heridas asépticas, heridas por contusión, heridas por incisión, heridas por laceración, heridas no penetrantes, heridas abiertas, heridas penetrantes, heridas perforantes, heridas por pinchazo, heridas con sepsis, infartos y heridas subcutáneas; o donde la herida se seleccione a partir del grupo que consta de: úlceras isquémicas, úlceras por presión, fístulas, mordeduras graves, quemaduras térmicas y heridas de sitio donante; o donde la herida sea una herida aftosa, una herida traumática o una herida asociada con herpes.

55 Las heridas y/o úlceras normalmente se encuentran salientes de la piel o en una superficie mucosa o como resultado de un infarto en un órgano ("derrame"). Una herida podría ser resultado de un defecto de tejido blando o una lesión o una afección subyacente. En el presente contexto, el término "piel" hace referencia a la superficie exterior del cuerpo de un animal, incluidos humanos, y abarca piel intacta o casi intacta así como superficie cutánea lesionada. El término "mucosa" hace referencia a mucosa to intacta o dañada de un animal, como un humano, y podría ser mucosa oral, bucal, auditivo, nasal, pulmonar, ocular, gastrointestinal, vaginal o rectal.

60 En el presente contexto el término "herida" denota una lesión corporal con interrupción de la integridad normal de las estructuras del tejido. El término también pretende abarcar el término "llaga", "lesión", "necrosis" y "úlceras". Normalmente, el término "llaga" es una palabra popular para casi cualquier lesión de la piel o membranas mucosas y el término "úlceras" es un defecto local o excavación de la superficie de un órgano o tejido, que se produce por el desprendimiento de tejido necrótico. Lesión generalmente hace referencia a cualquier defecto de un tejido. Necrosis hace referencia a tejido muerto resultante de una infección, lesión, inflamación o infartos.

65

- El término “herida” usado en este contexto se refiere a cualquier herida (ver más adelante una clasificación de las heridas) a cualquier estadio concreto del proceso de cura, incluido el estadio antes de que se haya iniciado cualquier cura o incluso antes de que se realice una herida específica como una incisión quirúrgica (tratamiento profiláctico). Entre los ejemplos de heridas que se pueden evitar y/o tratar se encuentran, por ejemplo, heridas asépticas, heridas por contusión, heridas por incisión, heridas por laceración, heridas no penetrantes (por ejemplo, heridas en las que no hay una alteración de la piel pero hay una lesión en estructuras subyacentes), heridas abiertas, heridas penetrantes, heridas perforantes, heridas de punción, heridas de sepsis, heridas subcutáneas, etc. Entre los ejemplos de llagas se encuentran las llagas por presión, aftas, llagas de cromo, llagas frías, llagas de presión, etc. Entre los ejemplos de úlceras se encuentran, por ejemplo, la úlcera péptica, úlcera duodenal, úlcera gástrica, úlcera gotosa, úlcera diabética, úlcera isquémica hipertensiva, úlcera por estasis, *ulcus cruris* (úlcera venosa), úlcera sublingual, úlcera submucosa, úlcera sintomática, úlcera trófica, úlcera tropical y úlceras venéreas, por ejemplo, provocadas por gonorrea (incluida uretritis, endocervicitis y proctitis). Las afecciones relacionadas con heridas o llagas que podrían tratarse con éxito son: quemaduras, ántrax, tétanos, gangrena gaseosa, escarlatina, erisipela, sycosis barbae, folliculitis, impetigo contagiosa o impetigo bullosa, etc. Con frecuencia hay un cierto solapamiento en el uso de los términos “herida” y “úlcera” y “herida” y “llaga” y, además con frecuencia los términos se usan aleatoriamente. Por lo tanto, como se ha mencionado, en el presente contexto el término “herida” incluye los términos “úlcera”, “lesión”, “llaga” e “infarto,” y los términos se usan indistintamente a no ser que se indique lo contrario.
- Los tipos de heridas que se van a tratar incluyen también (i) heridas generales, como por ejemplo, heridas quirúrgicas, traumáticas, infecciosas, isquémicas, térmicas, químicas y ampollas; (ii) heridas específicas de la cavidad oral, como por ejemplo, heridas post-extracción, heridas endodóncicas, especialmente en conexión con tratamiento de quistes y abscesos, úlceras y lesiones de origen bacteriano, vírico o autoinmune, heridas mecánicas, químicas, termales, infecciosas y liquenoides; herpes ulceroso, estomatitis aftosa, gingivitis ulcerosa necrotizante aguda y síndrome de boca ardiente son ejemplos específicos; y (iii) heridas en la piel, como por ejemplo, neoplasma, quemaduras (por ejemplo, químicas, termales), lesiones (bacteriana, vírica, autoinmune), mordeduras e incisiones quirúrgicas. Otra forma de clasificación de las heridas es: (i) pequeñas pérdidas de tejido debidas a incisiones quirúrgicas, abrasiones menores y mordeduras menores, o (ii) pérdidas significativas de tejido. El último grupo incluye úlceras isquémicas, llagas de presión, fístulas, laceraciones, mordeduras graves, quemaduras térmicas y heridas del área donante (en tejidos blandos y duros) e infartos.
- Otras heridas importantes son las heridas como las úlceras isquémicas, llagas de presión, fístulas, mordeduras graves, quemaduras térmicas y heridas del área donante. Las úlceras isquémicas y llagas de presión son heridas que normalmente solo se curan muy lentamente y especialmente en dichos casos un proceso de cura mejorado y más rápido es sin duda de gran importancia para el paciente. Además, los costes que implica el tratamiento de pacientes que sufren esos tipos de heridas se reducen notablemente cuando se mejora la cura y se realiza de más rápidamente.
- Las heridas del área donante son heridas que, por ejemplo, se producen en conexión con la retirada de tejido duro de una parte del cuerpo a otra parte del cuerpo, por ejemplo, en conexión con un trasplante. Las heridas resultantes de esas operaciones son muy dolorosas y por lo tanto una mejora en la cura es muy valiosa. El término “piel” se usa en un sentido muy amplio e incluye la capa epidérmica de la piel y — en los casos en los que la superficie de la piel está dañada en mayor o menor medida — también la capa dérmica de la piel. Aparte del *stratum comeum*, la capa epidérmica de la piel es la capa exterior (epitelial) y la capa de tejido conectivo más profunda de la piel se denomina dermis.
- También se presenta aquí un método para modular o tratar osteoartritis, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso cutáneo, nefritis lúpica, diabetes mellitus tipo II y trastorno pulmonar obstructivo crónico, entre las otras enfermedades indicadas anteriormente como relacionadas con IL-6, en una célula, tejido, órgano, animal, o paciente incluidos, entre otros, por lo menos una enfermedad tipo inmune, enfermedad cardiovascular, enfermedad infecciosa, maligna y/o neurológica. Dicho método podría incluir la administración de una cantidad eficaz de por lo menos una composición o compuesto farmacéutico que incluye por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite dicha modulación, tratamiento o terapia.
- Cualquiera de los métodos presentados en este documento puede incluir la administración de una cantidad eficaz de una composición o compuesto farmacéutico que incluye por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite dicha modulación, tratamiento o terapia. Dicho método podría también comprender la coadministración o terapia de combinación para tratar dichas enfermedades o trastornos, donde la administración de dicho por lo menos un anticuerpo anti-IL-6, porción específica o variante de los mismos, también incluye la administración, previa, simultáneamente y/o posterior, de por lo menos uno de los siguientes por lo menos un antagonista TNF (por ejemplo, entre otros, un químico TNF o antagonista proteico, monoclonal TNF o anticuerpo o fragmento policlonal, un receptor TNF soluble (por ejemplo, p55, p70 o p85) o fragmento, polipéptidos de fusión de los mismos, o un antagonista TNF de molécula pequeña, por ejemplo, proteína de unión TNF I o II (TBP- 1 o TBP-II), nerelimonmab, infliximab, etanercept (Enbrel™), adalimumab (Humira™), CDP-571, CDP-870, afelimomab, lenercept y similares), un antireumático (por ejemplo, metotrexato, auranofín, aurotioglucosa, azatioprina, tiomalato de sodio de oro, sulfato de hidroxiclороquina, leflunomida, sulfasalzina), relajante muscular, narcótico, medicamento

5 antiinflamatorio no esteroideo (AINEs), analgésico, anestésico, sedante, anestésico local, bloqueante neuromuscular, antimicrobiano (por ejemplo, aminoglucósido, antifúngico, antiparasitario, antivírico, carbapenem, cefalosporina, flurorquinolona, macrólido, penicilina, sulfonamida, tetraciclina, otro antimicrobiano), antipsoriásico, corticosteroide, esteroide anabólico, agente diabético, mineral, nutricional, agente tiroideo, vitamina, hormona
 10 relacionada con el calcio, antidiarreico, antitusivo, antiemético, antiulceroso, laxante, anticoagulante, eritropoyetina (por ejemplo, epoyetina alfa), filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), sargramostim (GM-CSF, Leukine), inmunización, inmunoglobulina, inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), hormona de crecimiento, medicamento sustitutivo hormonal, modulador de los receptores de estrógeno, midriático, ciclopéptico, agente alquilante, antimetabolito, inhibidor mitótico, radiofarmacéutico, antidepresivo, agente antimaníaco,
 15 antipsicótico, ansiolítico, hipnótico, simpaticomimético, estimulante, donepezil, tacrina, medicación de asma, agnista beta, esteroide inhalado, inhibidor de leucotrieno, metiloxantina, cromolina, epinefrina o similar, domasa alfa (Pulmozyme), citoquina o antagonista de citoquina. Las dosis adecuadas son conocidas. Véase, por ejemplo, Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook [Manual de farmacoterapia]*, 2ª edición, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia, Tarascón Pocket Pharmacopoeia 2000 [Farmacopea de bolsillo de Tarascón, 2000]*, edición de lujo, Tarascón Publishing, Loma Linda, CA (2000); *Nursing 2001 Handbook of Drugs [Manual de medicamentos]*, 21ª ed., Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; *Health Professional's Drug Guide 2001 [Guía de medicamentos para profesionales de la salud, 2001]*, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ.

20 Los antagonistas TNF adecuados para composiciones, terapia combinada, coadministración, y/o instrumentos del presente invento (que también comprende por lo menos un anticuerpo, porción especificada y variante de los mismos del presente invento), incluyen, entre otros, anticuerpos anti-TNF (por ejemplo, por lo menos un antagonista TNF como se ha definido), fragmentos de unión de antígeno de los mismos, y moléculas receptoras que se unen específicamente a TNF; compuestos que evitan y/o inhiben la síntesis de TNF, la liberación de TNF o su acción
 25 sobre células objetivo, como as talidomida, tenidap, inhibidores de fosfodiesterasa (por ejemplo, pentoxifilina y rolipram), agonistas de receptor de adenosina A2b y mejoradores de receptores de adenosina A2b; compuestos que evitan y/o inhiben señalización de receptores TNF, como inhibidores de cinasa por proteína activada por mitógeno (MAP); compuestos que bloquean y/o inhiben la división de membrana TNF, como inhibidores de metaloproteína; compuestos que bloquean y/o inhiben la actividad de TNF, como inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina (ACE) (por ejemplo, captopril); y compuestos que bloquean y/o inhiben la producción y/o la síntesis de TNF, como inhibidores de cinasa MAP.

35 Tal y como se usan en este documento, un " anticuerpo de factor de necrosis tumoral", "anticuerpo TNF", "anticuerpo TNF α ", o fragmento o similar disminuye, bloquea, inhibe, anula o interfiere con la actividad de TNF α in vitro, in situ y/o, preferiblemente, in vivo. Por ejemplo, un anticuerpo humano TNF adecuado puede unir TNF α e incluye anticuerpos anti-TNF, fragmentos de unión de antígeno de los mismos y mutantes especificados o sectores de los mismos que se unen específicamente a TNF α . Un anticuerpo o fragmento TNF adecuado también puede disminuir, bloquear, anular, interferir, evitar y/o inhibir TNF ARN, ADN o síntesis de proteínas, liberación de TNF, señalización de receptor TNF, división de membrana TNF, actividad TNF, producción TNF y/o síntesis.

40 Un ejemplo de un anticuerpo o antagonista TNF es el anticuerpo quimérico cA2. En este ámbito se han descrito otros ejemplos de anticuerpos monoclonales anti-TNF que se pueden usar (véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. nº 5.231.024; Möller, A. et al., *Citoquina* 2(3): 162-169 (1990); solicitud de los EE. UU. Nº 07/943.852 (emitida el 11 de septiembre de 1992); Rathjen et al., publicación internacional nº WO 91/02078 (publicada el 21 de febrero de 1991); Rubin et al, publicación de patente europea nº 0 218 868 (publicada el 22 de abril de 1987); Yone et al., patente europea nº 0 288 088 (26 de octubre de 1988); Liang, et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 137:847-854 (1986); Meager, et al., *Hybridoma* 6:305-311 (1987); Fendly et al., *Hybridoma* 6:359-369 (1987); Bringman, et al., *Hybridoma* 6:489-507 (1987); y Hirai, et al., *J. Immunol. Meth.* 96:57-62 (1987).

50 **Moléculas receptoras TNF**

Las moléculas receptores TNF útiles que se prefieren son las que unen TNF α con alto nivel de afinidad (véase, por ejemplo, Feldmann et al., publicación internacional nº WO 92/07076 (publicada el 30 de abril de 1992); Schall et al., *Cell [Célula]* 67:361-370 (1990); y Loetscher et al., *Cell [Célula]* 67:351-359 (1990)) y podrían poseer un bajo nivel de
 55 inmunogenicidad. En concreto, los receptores de superficie celular de TNF 55 kDa (p55 TNF-R) y el 75 kDa (p75 TNF-R) son útiles. Las formas truncadas de esos receptores, que incluye los dominios extracelulares (ECD) de los receptores o porciones funcionales de los mismos (véase, por ejemplo, Corcoran et al., *Eur. J. Biochem.* 223:831-840 (1994)), también son útiles. Las formas truncadas de los receptores TNF, que incluye ECD, se han detectado en orina y suero como proteínas inhibitorias de unión 30 kDa y 40 kDa TNF α (Engelmann, H. et al., *J. Biol. Chem.* 265:1531-1536 (1990)). Las moléculas multiméricas de receptor TNF y las moléculas de fusión de inmunoreceptor TNF y derivados y fragmentos o porciones de los mismos son otros ejemplos de moléculas receptoras de TNF que son útiles en los métodos y compuestos que se presentan aquí.

65 Las moléculas multiméricas receptoras de TNF incluyen todas o una porción funcional del ECD de dos o más receptores de TNF unidos por medio de un vinculador polipéptido o más u otros vinculadores no péptidos, como el polietilenglicol (PEG). Un ejemplo de dicha molécula de fusión de inmunoreceptor TNF es la proteína de fusión de

receptor TNF/fusión de IgG. Las molécula de fusión de inmunoreceptor TNF y los métodos para su producción se han descrito anteriormente (Lesslauer et al., Eur. J. Immunol. 21:2883-2886 (1991); Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58:10535-10539 (1991); Peppel et al., J. Exp. Med. 174:1483-1489 (1991); Kolls et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:215- 219 (1994); Butler et al., Citoquina d(6):616-623 (1994); Baker et al., Eur. J. Immunol. 24:2040-2048 (1994); Beutler et al., patente de los EE. UU. n° 5.447.851; y solicitud de los EE. UU. n° 08/442.133 (emitida el 16 de mayo de 1995)). También se pueden encontrar métodos para la producción de moléculas de fusión de inmunoreceptores en Capon et al., patente de los EE. UU. n° 5.116.964; Capon et al., patente de los EE. UU. n° 5.225.538; y Capon et al., Nature 337:525-531 (1989).

Las citoquinas incluyen cualquier citoquina conocida. Véase, por ejemplo, CopewithCitoquinas.com. Los antagonistas de citoquinas incluyen, entre otros, cualquier anticuerpo, fragmento o mimético, cualquier receptor soluble, fragmento o mimético, cualquier antagonista de pequeña molécula o cualquier combinación de los mismos.

Tratamientos terapéuticos

Cualquier método presentado en este documento puede incluir un método para tratar un trastorno mediado por IL-6, que comprende la administración de una cantidad eficaz de una composición o compuesto farmacéutico que incluye por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite dicha modulación, tratamiento o terapia. Dicho método podría incluir también la co-administración o terapia combinada para tratar dichas enfermedades o trastornos, donde la administración de dicho por lo menos un anticuerpo anti-IL-6, porción especificada o variante de los mismos, también incluye la administración antes, durante y/o después, de por lo menos uno de los siguientes: un medicamento antiinfeccioso, un medicamento de sistema cardiovascular (CV), un medicamento del sistema nervioso central (CNS), un medicamento del sistema nervioso autónomo (ANS), un medicamento del tracto respiratorio, un medicamento del tracto gastrointestinal (GI), un medicamento hormonal, un medicamento para el equilibrio de fluido o electrolito, un medicamento hematológico, un antineoplásico, un medicamento de inmunomodulación, un oftálmico, ótico o nasal, un medicamento tópico, un medicamento nutricional o similares, por lo menos un antagonista TNF (por ejemplo, entre otros, un anticuerpo o fragmento TNF, un receptor soluble TNF o fragmento, proteínas de fusión de los mismos, o un antagonista de molécula pequeña de TNF), un antireumático (por ejemplo, metotrexato, auranofina, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato de sodio de oro, sulfato de hidroxycloquina, leflunomida, sulfasalzina), relajante muscular, narcótico, medicamento antiinflamatorio no esteroideo (AINEs), analgésico, anestésico, sedante, anestésico local, bloqueante neuromuscular, antimicrobiano (por ejemplo, aminoglucósido, antifúngico, antiparasitario, antivirico, carbapenem, cefalosporina, fluroroquinolona, macrólido, penicilina, sulfonamida, tetraciclina, otro antimicrobiano), antipsoriásico, corticosteroide, esteroide anabólico, agente diabético, agente mineral, nutricional, tiroideo, vitamina, hormona relacionada con el calcio, antidiarreico, antitussivo, antiemético, antiulceroso, laxante, anticoagulante, eritropoyetina (por ejemplo, epoyetina alfa), filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), sargramostim (GM-CSF, Leukine), inmunización, inmunoglobulina, inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), hormona del crecimiento, medicamento hormonal sustitutivo, modulador de receptores de estrógeno, midriático, ciclopléxico, agente alquilante, antimetabolito, inhibidor mitótico, radiofarmacéutico, antidepresivo, agente anti maníaco, antipsicótico, ansiolítico, hipnótico, simpatomimético, estimulante, donepezil, tacrina, medicación para asma, agonista beta, esteroide inhalado, inhibidor de leucotriena, metilxantina, cromolina, epinefrina o similares, alfa domasa (Pulmozyme), una citoquina o antagonista de citoquina. Dichos medicamentos son bien conocidos en este ámbito, incluidas sus formulaciones, indicaciones, dosificación y administración para cada uno de los presentados (véase, por ejemplo, Nursing 2001 Handbook of Drugs [Manual de medicamentos para enfermería, 2001], 21ª ed., Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; Health Professional's Drug Guide 2001 [Guía de medicamentos para profesionales de la salud, 2001], ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; Pharmacotherapy Handbook [Manual de farmacoterapia], Wells et al., ed., Appleton & Lange, Stamford, CT).

Normalmente, el tratamiento de afecciones patológicas se efectúa administrando una cantidad o dosis eficaz de por lo menos una composición de anticuerpo anti-IL-6 de un total, como media, que cubra un rango de aproximadamente 0,01 a 500 miligramos de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 por kilogramo de paciente por dosis, y, preferiblemente, desde por lo menos aproximadamente 0,1 a 100 miligramos anticuerpo/kilogramo de paciente por administración única o múltiple, dependiendo de la actividad específica del agente activo que contenga la composición. De forma alternativa, la concentración de suero efectivo puede incluir una concentración de suero de 0,1-5000 µg/ml por administración única o múltiple. Los facultativos médicos conocen las dosis adecuadas que dependerán, sin duda, del estado concreto de la enfermedad, de la actividad específica de la composición que se administra y del paciente concreto que esté a tratamiento. En algunos casos, para obtener la cantidad terapéutica que se desea puede ser necesaria una administración repetida, administraciones individuales repetidas de una dosis concreta medida o monitorizada, donde las administraciones individuales se repitan hasta que se consiga la dosis diaria o el efecto deseado.

Las dosis que se prefieren podrían incluir aproximadamente 0,1-99 y/o 100-500 mg/kg/administración, o cualquier rango, valor o fracción de los mismos, o obtener una concentración de suero de aproximadamente una concentración de suero de 0,1 -5000 µg/ml por administración única o múltiple, o cualquier rango, valor o fracción de los mismos. El rango de dosificación preferible para el anticuerpo anti-IL-6 del presente invento va entre

aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 3, aproximadamente 6 o aproximadamente 12 mg/kg de peso corporal del paciente.

5 De forma alternativa, la dosis administrada puede variar dependiendo de factores conocidos, como las características farmacodinámicas del agente concreto y su vía y ruta de administración; edad, estado y peso del recipiente; naturaleza y alcance de los síntomas, tipo de tratamiento simultáneo, frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. Normalmente, una dosificación de ingrediente activo puede ser de aproximadamente entre 0,1 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal. Normalmente 0,1 a 50, y preferiblemente de 0,1 a 10 miligramos por kilogramo por administración o en forma de liberación sostenida será eficaz para obtener los resultados deseados.

10 Únicamente a modo de ejemplo (no limitativo), el tratamiento de humanos o animales puede suministrarse en dosificación única o periódica de por lo menos un anticuerpo del presente invento de aproximadamente 0,1 a 100 mg/kg o cualquier rango, valor o fracción de los mismos al día, por lo menos uno de los días del 1- 40, o de forma alternativa o adicional, por lo menos una de las semanas de la 1 - 52, o de forma alternativa o adicional, por lo menos uno de los años 1-20, o cualquier combinación de los mismos, usando dosificación única, infusión o dosis repetidas.

15 Las formas de dosificación (composición) adecuadas para la administración interna normalmente contienen desde aproximadamente 0,001 miligramos hasta aproximadamente 500 miligramos de ingrediente activo por unidad o recipiente. En esos compuestos farmacéuticos el ingrediente activo normalmente estará presente en una cantidad de aproximadamente 0,5-99,999 % por peso en base al peso total de la composición.

20 Para administración parenteral, el anticuerpo puede formularse en forma de solución, suspensión, emulsión, partícula, polvo o polvo liofilizado en asociación, o administrado separadamente, con un vehículo parenteral aceptable farmacéuticamente. Entre los ejemplos de dichos vehículos se encuentra el agua, salino, solución de Ringer, solución de dextrosa y aproximadamente 1- 10 % de albúmina de suero humano. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos. El vehículo o polvo liofilizado puede contener aditivos adicionales que mantengan la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol) y estabilidad química (por ejemplo, tampones y conservantes). La formulación se esteriliza por medio de técnicas conocidas o adecuadas.

25 Los portadores farmacéuticos adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences [Ciencia farmacéutica de Remington], A. Osol, texto estándar de referencia en este ámbito.

Vías alternativas de administración

35 Hay muchos modos conocidos y desarrollados de administración de cantidades eficaces farmacéuticamente de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 de acuerdo con el presente invento. Mientras la administración pulmonar se usa en la siguiente descripción, se podrían usar otras vías de administración con resultados adecuados. Los anticuerpos IL-6 del presente invento pueden administrarse en un portador, en forma de solución, emulsión, coloide o suspensión o en forma de polvo seco, usando cualquiera de varios instrumentos y métodos adecuados para la administración por inhalación u otros modos descritos en este documento o conocidos.

Formulaciones y administración parenteral

45 Las formulaciones por administración parenteral pueden contener como excipientes habituales agua estéril o salino, glicoles de polialquileno, como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y similares. Las suspensiones acuosas o aceitosas para su inyección pueden prepararse usando un emulsificador o humidificador adecuado y un agente de suspensión, de acuerdo con métodos conocidos. Los agentes para inyección pueden ser un agente diluyente no tóxico, no administrable oralmente, como solución acuosa, solución inyectable estéril o suspensión en un disolvente. Como vehículo utilizable o disolvente, se permiten agua, solución de Ringer, salino isotónico, etc.; como disolvente normal o en suspensión puede usarse aceite estéril no volátil. Para estos fines, puede usarse cualquier tipo de aceite no volátil y ácido graso, incluidos aceites grasos naturales o sintéticos o semisintéticos o ácidos grasos; mono- o di- o tri-glicéridos naturales o sintéticos. La administración parental es una técnica conocida e incluye, entre otros, medios convencionales de inyección, un instrumento de inyección sin aguja a presión de gas como se describe en la patente de los EE. UU. nº 5.851.198, y un instrumento perforador láser como el descrito en la patente de los EE. UU. nº 5.839.446.

Administración alternativa

60 También se presenta en este documento la administración de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 por vía parenteral, cubcutánea, intramuscular, intravenosa, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocardiaca, intraosteal, intrapélvica, intrapericardiaca, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarectal, intrarenal, intraretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterina, intravesical, intralesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmica. Por lo menos una composición de anticuerpo anti-IL-6 puede prepararse para usarla en administración parenteral (subcutánea, intramuscular o intravenosa) o cualquier otro tipo de administración, concretamente en forma de soluciones o

suspensiones líquidas; para su uso en administración vaginal o rectal, concretamente en formas semisólidas, como, entre otras, cremas y supositorios; para administración bucal o sublingual, como, entre otros, en forma de tabletas o cápsulas; o intranasalmente, como, entre otras, la forma de polvos, gotas nasales o aerosoles o agentes concretos; o transdérmicamente, como, entre otros, un sistema de administración en gel, pomada, loción, suspensión o por parche con mejoras químicas, como dimetilsulfóxido para modificar la estructura cutánea o aumentar la concentración de medicamentos en el parche transdérmico (Junginger, et al. In "Drug Permeation Improvement" ["Mejora de la permeabilidad de los medicamentos"] Hsieh, D. S., Eds., pp. 59-90 (Marcel Dekker, Inc. New York 1994), o con agentes oxidizantes que permiten la aplicación sobre la piel de formulaciones que contienen péptidos (WO 98/53847), o aplicaciones de campos eléctricos para crear vías de transporte transitorias, como electroporación, o para aumentar la movilidad de medicamentos cargados a través de la piel, como iontoforesis, o aplicación de ultrasonidos, como sonoforesis (patentes de los EE. UU. nº 4.309.989 y 4.767.402).

Administración pulmonar/nasal

Para la administración pulmonar, preferiblemente, por lo menos una composición de anticuerpo anti-IL-6 se administra en tamaño de partículas eficaz para alcanzar las vías aéreas bajas del pulmón o senos. De acuerdo con el invento, por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 podría administrarse por cualquiera de varios instrumentos de inhalación o nasales conocidos para la administración de un agente terapéutico por inhalación. Estos instrumentos capaces de depositar formulaciones de depósito por aerosol en la cavidad nasal o los alveolos de un paciente incluyen inhaladores dosificados, nebulizadores, generadores de polvo seco, pulverizadores y similares. También son conocidos otros instrumentos adecuados para dirigir la administración pulmonar o nasal de anticuerpos. Todos dichos instrumentos pueden usar formulaciones adecuadas para la administración de anticuerpos en un aerosol. Dichos aerosoles pueden comprender soluciones (acuosas y no acuosas) o partículas sólidas.

Los dosificadores como el inhalador dosificado Ventolin® normalmente usan un gas propulsor y necesitan que se los accione durante la inspiración (véase, por ejemplo, WO 94/16970, WO 98/35888). Los inhaladores de polvo seco como Turbuhaler™ (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), Spiros™ inhaler (Dura), comercializados por Inhale Therapeutics, y el inhalador en polvo Spinhaler® (Fisons), funcionan por el accionamiento por la respiración de un polvo mezclado (EE. UU. 4668218 Astra, patente europea 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, EE. UU. 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons). Los nebulizadores como AERx™ Aradigm, Ultravent® (Mallinckrodt) y Acorn II® (Marquest Medical Products) (EE. UU. 5404871 Aradigm, WO 97/22376), producen aerosoles a partir de soluciones, mientras que los inhaladores dosificados, inhaladores en polvo seco, etc. Generan aerosoles de pequeñas partículas. Preferiblemente, una composición que incluye por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 se administra por medio de un inhalador de polvo seco o pulverizador. Un instrumento de inhalación para la administración de por lo menos un anticuerpo del presente invento tiene varias características que lo hacen preferible. Por ejemplo, la administración por medio de un instrumento de inhalación es fiable, reproducible y exacta, lo que resulta una ventaja. El inhalador podría también administrar pequeñas partículas secas, por ejemplo, menos de aproximadamente 10 µm, preferiblemente aproximadamente 1-5 µm, para una buena respirabilidad.

Administración de composiciones de anticuerpo IL-6 en forma de aerosol

Un aerosol que incluya una composición de anticuerpo IL-6 puede producirse forzando una suspensión o solución de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 a través de un pulverizador a presión. El tamaño y la configuración del pulverizador, la presión aplicada y la cantidad de administración de líquido puede elegirse para conseguir la salida y el tamaño de partículas que se desee. Se puede producir un electrospray, por ejemplo, por medio de un campo eléctrico en conexión con una capilarización o pulverizador. Las partículas de por lo menos una composición de anticuerpo anti-IL-6 administradas por aerosol tienen un tamaño de partículas menor de aproximadamente 10 µm, preferiblemente, en el rango entre 1 µm y aproximadamente 5 µm, y todavía mejor entre 2 µm y aproximadamente 3 µm, lo que resulta una ventaja.

Las formulaciones de por lo menos una composición de anticuerpo anti-IL-6 adecuadas para su uso con atomizador normalmente incluyen composiciones de anticuerpo en solución acuosa a una concentración de aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 100 mg de por lo menos una composición de anticuerpo anti-IL-6 por ml de solución de mg/gm, o cualquier rango, valor o fracción de los mismos. La formulación puede incluir agentes como un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un tensoactivo, y preferiblemente, zinc. La formulación también puede incluir un excipiente o agente para la estabilización de la composición del anticuerpo, como un tampón, un agente reductor, una proteína a granel o un carbohidrato. Las proteínas a granel útiles a la hora de formular composiciones de anticuerpo incluyen albúmina, protamina o similares. Los carbohidratos habituales que son útiles a la hora de formular composiciones de anticuerpo incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa o similares. La formulación de composición de anticuerpos también puede incluir un tensoactivo, que puede reducir o evitar la agregación inducida por la superficie de la composición del anticuerpo provocada por la atomización de la solución en la formación de un aerosol. Se pueden usar varios tensoactivos convencionales, como ésteres y alcoles de polioxietileno de ácido graso y ésteres de polioxietileno de sorbitol de ácido graso. Las cantidades generalmente variarán en un rango de entre 0,001 y 14 % por el peso de la formulación. Los tensoactivos que se prefieren para el objeto de este invento son el monooleato de sorbitán polioxietileno, polisorbato 80, polisorbato 20 y similares.

También se pueden incluir en la formulación otros agentes conocidos para la formulación de una proteína, como anticuerpos IL-6, o porciones o variantes especificadas.

Administración de composiciones de anticuerpo IL-6 por nebulizador

5 Las composiciones de anticuerpo del invento pueden administrarse por un nebulizador, como un nebulizador de chorro o ultrasónico. Normalmente, en un nebulizador de chorro, se usa una fuente de aire comprimido para crear un chorro de aire a alta velocidad a través de un orificio. Al expandirse el gas pasada la boquilla, se crea un área de
10 baja presión, que lanza una solución de composición de anticuerpo a través de un tubo capilar conectado a un reservorio líquido. El caudal líquido del tubo capilar se corta en filamentos y gotas inestables al salir del tubo, creando el aerosol. Se puede usar una gran variedad de configuraciones, tasas de flujo y tipos de deflector para conseguir las características de funcionamiento que se deseen a partir de un determinado nebulizador de chorro. En un nebulizador ultrasónico, se usa energía eléctrica de alta frecuencia para crear energía mecánica de vibración, normalmente usando un transductor piezoeléctrico. Esta energía se transmite a la formulación de la composición del anticuerpo directamente o a través de un fluido acoplante, creando un aerosol que incluye la composición del anticuerpo. Las partículas de la composición de anticuerpo administradas por un nebulizador tienen un tamaño de partícula menor de aproximadamente 10 μm , preferiblemente en el rango de aproximadamente 1 μm a aproximadamente 5 μm , y todavía más preferible, entre 2 μm y aproximadamente 3 μm .

20 Las formulaciones de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 adecuado para su uso con un nebulizador, ya sea de chorro o ultrasónico, normalmente incluyen una concentración de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 100 mg de por lo menos un anticuerpo de proteína anti-IL-6 por ml de solución. La formulación puede incluir agentes como un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un tensoactivo, y preferiblemente, zinc. La formulación también puede incluir un excipiente o agente de estabilización de por lo menos un anticuerpo de composición anti-IL-6, como un tampón, agente reductor, una proteína a granel o un carbohidrato. Las proteínas a granel útiles en la formulación de por lo menos un anticuerpo de composiciones anti-IL-6 incluyen albúmina, protamina o similares. Los carbohidratos habitualmente útiles en la formulación de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa o similares. La por lo menos una formulación de anticuerpo anti-IL-6 también puede incluir un tensoactivo, que puede reducir o evitar la agregación inducida por la superficie de lo menos un anticuerpo anti-IL-6 causada por la atomización de la solución en la formación de un aerosol. Pueden usarse varios tensoactivos convencionales, como ésteres de ácido graso de polioxi-etileno y alcoholes, y ésteres de ácido graso sorbital de polioxi-etileno. Las cantidades generalmente estarán en un rango de entre 0,001 y 4 % por peso de la formulación. Los tensoactivos que se prefieren para el objeto de este son: mono-oleato de sorbitán de polioxi-etileno, polisorbato 80, polisorbato 20 o similares. También pueden incluirse en la formulación otros agentes conocidos para la formulación de una proteína, como proteína de anticuerpo.

Administración de composiciones de anticuerpo IL-6 por inhalador dosificado

40 En un inhalador dosificado (MDI), un propulsor, por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 y cualquier excipiente u otro aditivo se ubican en un depósito como mezcla incluyendo un gas comprimido licuado. La actuación de la válvula dosificadora libera la mezcla en forma de aerosol, preferiblemente con partículas en el rango de menos de unos 10 μm , preferiblemente entre aproximadamente 1 μm hasta unos 5 μm , y más preferible, aproximadamente 2 μm hasta unos 3 μm . El tamaño de partículas del aerosol que se desee puede obtenerse usando una formulación de composición de anticuerpo producida por varios métodos conocidos por los expertos en la materia, incluidos molienda de chorro, secado por pulverización, condensación de punto crítico o similares. Entre los inhaladores dosificados se incluyen los fabricados por 3M o Glaxo que usen un propulsor de hidrofluorocarbono. Las formulaciones de por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 para su uso con un instrumento inhalador o dosificado generalmente incluirán un polvo fino que contenga por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 como suspensión en un medio no acuoso, por ejemplo, suspendido en un propulsor con la ayuda de un tensoactivo. El propulsor puede ser cualquier material convencional utilizado para este objeto, como un clorofluorocarbono, un hidroclorofluorocarbono, un hidrofluorocarbono o un hidrocarbono, incluido triclorofluorometano, diclorofluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, HFA-134a (hidrofluoroalcano-134a), HFA-227 (hidrofluoroalcano-227) o similares. Preferiblemente, el propulsor será un hidrofluorocarbono. El tensoactivo puede elegirse para estabilizar el por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 como suspensión en el propulsor, para proteger el agente activo contra la degradación química y similares. Entre los tensoactivos adecuados se incluye el trioleato de sorbitán, lecitina de soja, ácido oleico o similares. En algunos casos, se prefieren los aerosoles de solución que usan solventes, como el etanol. También se pueden incluir en la formulación otros agentes conocidos para la formulación de una proteína. Alguien que tenga un conocimiento general en esta área reconocerá que los métodos presentados en este documento pueden conseguirse por medio de la administración pulmonar de por lo menos una composición de anticuerpo anti-IL-6 por medio de instrumentos que no están descritos aquí.

Formulaciones y administración oral

65 Las formulaciones para la administración oral se basan en la coadministración de adyuvantes (por ejemplo, resorcinoles y tensoactivos no iónicos, como éter oleico de polioxi-etileno y éter n-hexadecilpolietileno) para aumentar artificialmente la permeabilidad de las paredes intestinales, así como la co-administración de inhibidores enzimáticos

(por ejemplo, inhibidores de la tripsina pancreática, diisopropilfluorofosfato (DFF) y trasilol) para inhibir la degradación enzimática. Las formulaciones para la administración de agentes hidrofílicos, incluidas proteínas y anticuerpos y una combinación de por lo menos dos tensoactivos destinados a administración oral, bucal, mucosal, nasal, pulmonar, de la transmembrana vaginal o rectal se explican en la patente de los EE. UU. nº 6.309.663. El compuesto constituyente activo de la forma de dosificación de tipo sólido para administración oral puede mezclarse con por lo menos un aditivo, que incluye sacarosa, lactosa, celulosa, manitol, trehalosa, rafinosa, maltitol, dextrano, almidón, agar, arginatos, quitinas, quitosanos, pectinas, goma tragacanto, goma arábica, gelatina, colágeno, caseína, albúmina, polímero sintético o semisintético y glicérido. Estas forma de dosificación también pueden contener otros tipos de aditivos, por ejemplo, agente de dilución inactivo, lubricante, como estearato de magnesio, parabeno, agente conservante, como ácido sórbico, ácido ascórbico, .alfa.-tocoferol, antioxidante como cisteína, desintegrador, aglutinante, espesante, agente tamponador, agente edulcorante, agente saborizante, agente perfumante, etc.

Los comprimidos y pastillas también se pueden procesar en preparaciones con cubierta protectora. Entre las preparaciones líquidas para su administración oral se incluyen: preparados en emulsión, sirope, elixir, suspensión y solución aceptables para uso médico. Estos preparados pueden contener agentes de dilución inactivos que se usan normalmente en dicho ámbito, por ejemplo, agua. Los liposomas también se han descrito como sistemas de administración de medicamentos para insulina y heparina (patente de los EE. UU. nº 4.239.754). Más recientemente se han usado microesferas de polímeros artificiales de aminoácidos mezclados (proteinoideos) para administrar productos farmacéuticos (patente de los EE. UU. nº 4.925.673). Además, los compuestos portadores descritos en la Patente de los EE. UU. nº 5.879.681 y la patente de los EE. UU. nº 5.5871.753 que se usan para administrar agentes biológicamente activos de forma oral son conocidos en este ámbito.

Formulaciones y administración de la mucosa

Una formulación para la administración oral de un agente bioactivo encapsulado en un excipiente o más de polímeros biocompatibles o copolímero, un polímero biodegradable o copolímero, que proporciona microcáptulas que debido al tamaño adecuado de las microcápsulas resultantes tiene como resultado que el agente alcanza y es tomado por el folliculi lymphatic aggregati, conocido también como "placa de Peyer" o "GALT" del animal sin pérdida de efectividad debido a que el agente ha pasado a través del tracto gastrointestinal. Se pueden encontrar folliculi lymphatic aggregati similares en los tubos branquiales (BALT) y el intestino grueso. Los tejidos anteriormente descritos se denominan generalmente tejidos linforeticulares asociados a la mucosa (MALT). Para la absorción a través de superficies mucosas, composiciones y métodos de administración por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 incluye una emulsión que incluye un grupo de partículas de submicrón, una macromolécula mucoadhesiva, un péptido bioactivo y una fase acuosa continua, que promueve la absorción a través de las superficies mucosas consiguiendo la mucoadhesión de las partículas de la emulsión (Patente de los EE. UU. nº 5.514.670). Las superficies mucosas adecuadas para la aplicación de las emulsiones del presente invento pueden incluir rutas de administración corneal, conjuntival, bucal, sublingual, nasal, vaginal, pulmonar, estomacal, intestinal y rectal. Las formulaciones para administración vaginal o rectal, por ejemplo, supositorios, pueden contener como excipientes, por ejemplo, polialquileneglicoles, vaselina, manteca de cacao y similares. Las formulaciones para administración intranasal pueden ser sólidas y contener como excipientes, por ejemplo, lactosa o pueden ser soluciones acuosas o aceitosas de gotas nasales. Para la administración bucal, los excipientes incluyen azúcares, estearato de calcio, estearato de magnesio, almidón pregelatinado y similares (Patente de los EE. UU. nº 5.849.695).

Formulaciones y administración transdérmica

Para su administración transdérmica, el por lo menos un anticuerpo anti-IL-6 se encapsula en un instrumento para su administración, como un liposoma o nanopartículas poliméricas, micropartículas, microcápsulas o microesferas (denominadas globalmente micropartículas, a no ser que se indique lo contrario). Se conocen varios instrumentos adecuados, incluidas micropartículas a base de polímeros sintéticos, como ácidos de polihidroxi, como ácido poliláctico, ácido poliglicólico y copolímeros de los mismos, poliortoésteres, polianhídridos y polifosfacenos y polímeros naturales, como colágeno, poliaminoácidos, albúmina y otras proteínas, alginato y otros polisacáridos y combinaciones de los mismos (patente de los EE. UU. nº 5.814.599).

Formulaciones y administración prolongada

Podría ser preferible administrar los compuestos del presente invento al sujeto en períodos de tiempo prolongado, por ejemplo, durante períodos de una semana a un año a partir de una única administración. Pueden usarse varias formas de dosificación de liberación lenta, por depósito o por implante. Por ejemplo, una forma de dosificación puede contener una sal no tóxica aceptable farmacéuticamente de los compuestos que tiene un nivel bajo de solubilidad en los fluidos corporales, por ejemplo, (a) una sal de adición ácida con un ácido polibásico, como ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido tánico, ácido pamoico, ácido alginico, ácido poliglutamico, ácidos mono- o di-sulfónicos de naftaleno, ácido poligalaturónico y similares; (b) una sal con un catión de metal polivalente, como zinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio y similares, o con un catión orgánico formado a partir de, por ejemplo, N,N'-dibenzilo- etilenediamina o etilenediamina; o (c) combinaciones de (a) y (b), por ejemplo, a una sal de tanato de zinc. Además, los compuestos del presente invento o, preferiblemente, una sal

relativamente insoluble, como las que se acaban de describir, puede formularse en un gel, por ejemplo, un gel de monostearato de aluminio con, por ejemplo, aceite de sésamo, adecuado para inyección. Las sales que se prefieren son sales de zinc, sales de tanato de zinc, sales de pamoato y similares. Otro tipo de formulación de depósito de liberación lenta para inyección contendría el compuesto o sal dispersada para encapsulación en un polímero de degradación lenta, no tóxico, no antígeno, como polímero de ácido poliláctico/ácido poliglicólico, por ejemplo como se describe en la patente de los EE. UU. nº 3.773.919. Los compuestos o, preferiblemente, las sales relativamente insolubles, como las anteriormente descritas, también se pueden formular en gránulos de silástico de matriz de colesterol, especialmente para uso en animales. Se conocen otras formulaciones de liberación lenta, depósito o por implante, por ejemplo, liposomas gaseosos o líquidos (patente de los EE. UU. nº 5.770.222 y "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems" [Sistemas de administración de medicamentos por liberación prolongada], J. R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., N.Y., 1978).

Una vez descrito el invento en términos generales, se entenderá mejor haciendo referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a modo de ejemplo y no son limitativos.

Indicaciones

Artritis reumatoide (RA)

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad sistémica inflamatoria crónica con características autoinmunes. Se explicarán ciertas características de la RA a través de una acción de IL-6 no regulada.

Las acciones de IL-6 que tienen una relevancia potencial en RA incluyen la inducción de hipergammaglobulinemia policlonal y producción de autoanticuerpos (factor reumatoide), a través de las acciones de IL-6 como factor de diferenciación de una célula B; la promoción del desarrollo de una célula T citotóxica, conjuntamente con IL-2; la producción de proteínas de fase aguda (CRP, SAA, fibrinógeno), a través de actividad estimulante de hepatocito; activación osteoclástica, que lleva a osteoporosis periarticular y destrucción ósea; la inducción de trombocitosis, a través de acción como factor de diferenciación de megacariocito; y regulación de VEGF, y por lo tanto angiogénesis potencial, en combinación con IL-1 β y TNF α .

IL-6 se produce por fibroblastos sinoviales de RA estimulados por TNF α o IL-1, y está presente a altos niveles de concentración tanto en el fluido sinovial (SF) como en suero en RA. Existe una correlación entre los niveles de suero y los indicios clínicos / de laboratorio de actividad de enfermedad.

Se ha estudiado Anti-IL-6/IL-6R mAbs en varios estudios clínicos en pacientes con RA activo. Más adelante se describen los resultados actualizados.

Estudios de fase I/II

En el primero de esos estudios, se administró diariamente un murino anti-IL-6 mAb (BE-8) durante 10 días consecutivos en 5 pacientes con RA y se asoció con una mejora clínica transitoria y en laboratorio (9) (Wendling, D; et al. 1993 J. Rheumatol. 20:259). El mAb (MRA; Chugai) anti-IL-6R (80kDa) humanizado se investigó en diversos estudios de fase I/II en pacientes con RA. En el primero, se administró MRA o infusión de IV en dosis de 1-50 mg una o dos veces a la semana, con un tratamiento de mantenimiento de 50 mg por semana hasta 6 meses. Tuvo como resultado una disminución rápida en las mediciones de la fase aguda, proteína C-reactiva (CRP) y fibrinógeno, y en fiebre baja, cansancio y escalas clínicas, como rigidez matutina y recuento de articulaciones hinchadas y dolorosas. También se detectaron mejorías en anemia, trombocitosis e hipergammaglobulinemia. En un estudio posterior, se trató a 45 pacientes con una infusión única de IV MRA en una dosis de 0,1-10 mg/kg, y tuvo como resultado una tendencia de mejora en puntuaciones clínicas a niveles más altos de dosis, más reducción en reactivos de fase aguda.

Estudios de fase II

En el primero de esos estudios, se trató a 15 pacientes con MRA (dosificación de 2, 4 o 8 mg/kg quincenal durante 24 semanas) y dieron respuestas de ACR20 en 13/15 en la semana 24, con normalización de CRP/suero amiloide A (SAA). Aunque no ha habido problemas importantes en cuanto a la seguridad aguda, hasta dos tercios de los pacientes mostraron niveles marcadamente superiores de colesterol LDL. En un segundo estudio de fase II, 164 se trató a pacientes con RA resistente a DMARDs con placebo o MRA por infusión IV (dosificación 4 o 8 mg/kg, cada 4 semanas durante 3 meses) y mostraron tasas de respuesta de ACR20 la semana 12 del 11 %, 57 % y 78 % para placebo, 4 y 8 mg/kg, respectivamente. Finalmente, 359 pacientes con RA activo recibieron únicamente MTX (10-25 mg/semana), solo MRA (niveles de dosificación 2, 4 o 8 mg/kg, administrados mensualmente por medio de infusión IV) o MTX más MRA. MRA y MRA + MTX fueron más eficaces que solo MTX, como determina la respuesta ACR20.

Lupus eritematoso sistémico (LES)

El LES es una enfermedad crónica, potencialmente mortal, autoinmune con múltiples manifestaciones proteicas. Se desconoce la etiología. Una característica de la enfermedad implica hipoproliferación, activación y producción de autoanticuerpo de célula B contra varios auto antígenos.

- 5 IL-6 induce a las células B a diferenciarse en células de formación de anticuerpos. En LES, aumenta la producción de autoanticuerpos (ANA, anti-dsADN) por esas células de formación de anticuerpos y deposición de complejo inmune. IL-6 promueve el desarrollo de célula T citotóxica, aumenta los reactivos de fase aguda hepática, la proliferación de célula mesangial, el crecimiento de queratinocitos, la diferenciación y trombosis de megacariocitos.
- 10 Los niveles de IL-6 se elevan tanto en los pacientes de LES como en los modelos murinos de SLE. Se demostró que la unión de receptores de IL-6 en células B induce la diferenciación terminal de células B en células de producción de autoanticuerpo. Linker-Israeli et al. (Linker-Israeli M et al., 1991 J Immunol 147:117-123) han mostrado disminuciones en la producción espontánea de anticuerpo policlonal cuando se usaron anticuerpos de neutralización en IL-6. Kitani y otros (Kitani A, et al., 1992 Clin Exp Immunol 88: 75-83) respaldaron estos hallazgos demostrando
- 15 que la producción de célula T in vitro de of IL-6 duplicado en cultivos de LES y que las células LES B tenían cinco veces más producción IL-6 que las células B de control. De todas formas, la producción patológica de autoanticuerpos en LES no solo se limita a los efectos de IL-6. También se ha estudiado el papel del receptor de IL-6. Nagafuchi y otros han mostrado receptor IL-6 hasta la regulación en la mayoría de células LES B vs. células B normales. Los anticuerpos de receptor de anti-IL-6 inhibieron la diferenciación terminal de dichas células B en
- 20 células de formación de anticuerpos. El papel del receptor de IL-6 soluble en LES todavía no se ha determinado.

Diabetes Mellitus de Tipo II (T2DM)

- 25 Se cree que la resistencia a la insulina (pérdida de efecto de la insulina) y pérdida de la función de la célula-β (déficit funcional de las células-β pancreáticas en la secreción de insulina) son las causas principales del desarrollo de T2DM. La resistencia a la insulina se manifiesta en forma de incapacidad de los tejidos periféricos de responder adecuadamente la insulina, provocando un aumento de los niveles de glucosa en sangre. Al aumento de la resistencia a la insulina y los niveles de glucosa en la sangre sigue una hipersecreción de insulina por células-β pancreáticas en las primeras fases de la enfermedad. Al progresar T2DM, se deteriora la capacidad de las células-β
- 30 para segregar insulina.

- Los mecanismos subyacentes responsables del desarrollo de la resistencia a la insulina no están claros. La afección asociada más habitualmente al desarrollo de T2DM es la obesidad e incluso una pequeña pérdida de peso mejora de forma significativa los niveles de glucosa en pacientes con T2DM.
- 35

- Tanto la obesidad como la resistencia a la insulina/hiperinsulinemia, en combinación con dislipidemia, disminución de la tolerancia a la glucosa e hipertensión han caracterizado la the afección denominada síndrome metabólico. La progresión natural de síndrome metabólico a T2DM predispone a los individuos al desarrollo de cambios micro- y macro- vasculares que podrían conducir a enfermedad cardiovascular (CV) y en última instancia la muerte. Se ha sugerido que las principales relaciones entre T2DM y la enfermedad CV podrían ser la obesidad, la resistencia a la insulina y la hiper-insulinemia.
- 40

- El tejido adiposo se ha identificado como uno de los órganos principales que regula el metabolismo, y es tanto un depósito de energía como un órgano endocrino que segrega numerosas moléculas implicadas en la regulación de sensibilidad de insulina. Además de leptina, resistina, adiponectina y TNFα, el tejido adiposo segrega IL-6, lo que se ha sugerido que representa la unión entre obesidad, inflamación, T2DM y enfermedad cardiovascular (CV).
- 45

- Se ha documentado una correlación positiva entre la adiposidad y los niveles de IL-6. Es posible que el aumento del tejido adiposo en la obesidad proporcione un aumento prolongado en IL-6 circulante que podría disminuir la sensibilidad a la insulina promoviendo la inflamación en tejidos que responden a la insulina o causan resistencia a la insulina interfiriendo la actividad y la expresión de proteínas implicadas en la cascada de señalización de insulina. Existen datos in vitro e in vivo que apoyan o se oponen al papel potencial de IL-6 en el desarrollo de resistencia a la insulina.
- 50

- Los datos in vitro que usan sistemas celulares bien definidos, incluido hígado (HepG2)(44), grasa (3T3L1) o células de islote pancreático de rata aislado muestran un efecto negativo directo de IL-6 sobre la señalización de insulina, absorción de glucosa y secreción de insulina, respectivamente. Por otro lado, los datos obtenidos a partir de experimentos realizados en biopsias de músculo esquelético sugieren que IL-6 podría aumentar la absorción de glucosa en el músculo que se ejercita.
- 55
- 60

- Los datos in vivo de la asociación entre niveles de IL-6 y sensibilidad de insulina se mezclan de la misma forma. Los modelos de sobre-expresión de IL-6 o de ablación completa sugieren que la inhibición completa de la actividad IL-6 podría no tener un efecto beneficioso. Por ejemplo, en ratones diabéticos no obesos (NOD) transgénicos, la sobre-expresión de IL-6 retrasa la aparición de diabetes y prolonga la supervivencia. Además, los datos de ratones nulos para IL-6 sugieren que IL-6 podría tener un papel en la regulación del equilibrio energético, ya que esos animales desarrollan obesidad de aparición tardía y niveles de glucosa más altos.
- 65

En humanos, una mutación que se produce de forma natural dentro de la región del promotor IL-6 provoca un aumento de la tasa de secreción de IL-6. Esta mutación se ha asociado tanto con un aumento como con una disminución de la sensibilidad a insulina.

5 En otro grupo de experimentos, se ha evaluado el efecto de IL-6 exógeno. En sujetos normales, la administración de IL-6 provocó aumentos en los niveles de glucosa sin afectar a las concentraciones de insulina en plasma, mientras que en los pacientes de cáncer, la adición de IL-6 aumentó el almacenamiento de glucosa. Además, se ha examinado la correlación entre los niveles de IL-6 y la resistencia a la insulina. Los datos de esos experimentos
10 sugieren que tanto en hombres como en mujeres, los altos niveles circulantes de IL-6 se correlacionaron con una resistencia a la insulina más alta aunque todavía no se ha determinado una relación de causa-efecto.

15 Se ha indicado que IL-6 tiene un papel importante en el desarrollo de resistencia a asociado con obesidad. De todas formas, existen datos in vitro e in vivo contradictorios que tanto apoyan o contradicen su papel potencial en la resistencia a la insulina.

Osteoartritis (OA)

20 La OA es un trastorno articular crónico y degenerativo, caracterizado por la pérdida de cartílago articular y cambios relacionados en el hueso subcondral. Aunque se observan grados variables de inflamación en artroscopia o en muestras de biopsia sinovial, la enfermedad no es principalmente inflamatoria. Más bien se cree que se origina a partir de cambios en el condrocito y/o en el metabolismo osteoblástico. TNF, IL-1 e IL-6 son las citoquinas que se asocian más claramente con esos cambios.

25 IL-6 es detectable en el fluido sinovial de pacientes con OA, aunque a niveles que están sustancialmente por debajo de los que se ven en artropatías inflamatorias (Bertazzolo, N. et al. 1994 Agents and Actions [Agentes y acciones] 41: 90-92). Se reconoce que IL-6 es un estímulo principal para la síntesis de proteínas en fase hepática aguda, y los niveles de CRP se asocian con la presencia de OA de rodilla, incluso después de haber tenido en cuenta la asociación conocida entre CRP y obesidad (Mohtai, M. et al. 1996 J Orthopedic Research [Investigación ortopédica] 14: 67-73).
30

35 IL-6 se expresa en condrocitos a partir de cartílago OA, pero no de cartílago normal (Sowers, M. et al. 2002 Osteoarthritis and Cartilage [Osteoartritis y cartílagos] 10: 595-601). En experimentos que investigan los efectos del estrés mecánico sobre la expresión de las citoquinas de condrocito in vitro, la tensión de cizallamiento inducida por fluidos claramente aumentó IL-6 mRNA y la proteína. Esto sugiere que la expresión de IL-6 en cartílago de OA podría ser resultado de una carga mecánica. También podría producirse IL-6 en respuesta a la acción de IL-1 sobre condrocitos (Dozin, B. et al. 2002 Matrix Biology [Biología de matriz] 21:449-459).

40 En otros experimentos, IL-6, en combinación con sIL-6R, provocó la inhibición de síntesis de proteoglicano por condrocitos articulares humanos cultivados ex vivo, aunque el efecto fue modesto en comparación con el de IL-1 (Gueme, P. et al. 1999 Matrix Biology [Biología de matriz] 18: 253-260).

Enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD)

45 La COPD es una enfermedad caracterizada por la limitación del flujo aéreo que no es totalmente reversible. La limitación del flujo aéreo normalmente es progresiva y se asocia con una respuesta inflamatoria anormal de los pulmones a partículas y gases nocivos (Pauwels RA et al. 2001 AmJ.Respir Crit Care Med 163:1256-1276). La COPD se caracteriza por la aceleración en el deterioro normal de la función pulmonar con la edad. La limitación del flujo aéreo lentamente progresiva provoca invalidez y muerte prematura. La COPD es una causa principal de muerte y discapacidad, pero solo se ha explorado recientemente de forma amplia desde una perspectiva celular y molecular (Barnes P. J. et al. 2003 Eur Respir J 22:672-688). En COPD, hay una inflamación crónica que provoca el estrechamiento fijo de pequeñas vías aéreas y la destrucción alveolar (enfisema). La respuesta inflamatoria se caracteriza por un aumento del número de macrófagos alveolares, neutrófilos y linfocitos-T citotóxicos y la liberación de mediadores inflamatorios múltiples (quimioquinas, citoquinas, factores del crecimiento y lípidos). Un nivel más alto de estrés oxidativo podría aumentar la inflamación. También aumenta la elastólisis y los indicios de la implicación de varias enzimas elastolíticas. La inflamación y la proteólisis en COPD es una amplificación de la respuesta inflamatoria normal al humo del tabaco. En contraste con el asma, la inflamación parece ser resistente a los corticosteroides (Barnes P.J. et al. 2003).
50

55 En modelos animales, la exposición a endotoxina bacteriana o liposacáridos (LPS) y al humo del tabaco provocan neutrofilia y un aumento de la producción de IL-6 en el fluido del lavado broncoalveolar (BAL) (Underwood D.C. et al. 2000 AJPLCMP 279:L895-902). La sobre-expresión de IL-6 en pulmones de ratón provoca enfisema (Kuhn III Ch. et al. 2000 AJRCMB 22:289-295). En humanos, el volumen expiratorio forzado en un segundo (FEV1) tiene una correlación inversa con los niveles de IL-6 e IL-8 y con el conteo de células polimorfonucleares en el BAL (Soler N. et al. 1999 Eur Respir J 14:1015-1022). Los niveles de plasma TNF α , IL-6 y CRP aumentan en sujetos con COPD de leve a grave (Yasuda N. et al. 1998 Respir Med 92:993-999).
60
65

El agravamiento agudo de COPD se define como un empeoramiento prolongado de la afección del paciente, desde el estado estable y por más allá de las variaciones normales del día a día, que es agudo a su aparición y necesita un cambio de la medicación normal (Burge S. et al. 2003 Eur Respir J 21: Suppl. 41, 46s-53s). Aunque el aumento de los síntomas y el empeoramiento de la función pulmonar son una causa común de admisión hospitalaria (aproximadamente 500.000 al año en los EE. UU.), los mecanismos subyacentes celular y molecular no se han investigado ampliamente y apenas se comprenden (Wedzicha, J.A. 2002 Chest 121: 136S-141S). Los agravamientos agudos pueden ser prolongados y tener un efecto profundo sobre la calidad de vida, y podrían acelerar la progresión de COPD (Soto F.J. et al. 2003 Pulm Med 9:117-124). Las afecciones respiratorias son las causas más comunes de agravamientos de COPD. La mayoría de esas infecciones son provocadas por bacterias, pero muchas de ellas son debidas a infecciones víricas, especialmente rinovirus (Soto F.J. et al. 2003). Los factores medioambientales, los contaminantes atmosféricos y la temperatura también podrían tener un papel.

Durante el agravamiento, se produce un aumento en los neutrófilos y las concentraciones de IL-6, IL-8, TNF α y LTB4 en el esputo de pacientes con COPD. Algunos pacientes con COPD entre moderado y grave son propensos a agravamientos frecuentes (tres o más agravamientos al año). Este grupo de pacientes ("agravadores frecuentes") tiene un nivel más alto de IL-6 y un nivel más bajo de inhibidor de proteasa leucocitaria secretora incluso cuando COPD es estable (Bhowmik A. et al. 2000 Thorax 55: 114-120; Gompertz S. et al. 2001 Thorax 56: 36-41; Gompertz S. et al. 2001 EurRespirJ 17: 1112-1119).

Hay otros mecanismos, como estrés oxidativo y colonización bacteriana, también implicados en la patofisiología del agravamiento de COPD.

Ejemplo 1: Clonación y expresión de los anticuerpos IL-6 en células de mamíferos

Un vector de expresión de mamífero típico contiene por lo menos un elemento promotor, que media la iniciación de la transcripción de mRNA, la secuencia de codificación del anticuerpo, y las señales necesarias para la terminación de la transcripción y poliadenilación de la transcripción. Otros elementos son mejoradores, secuencias Kozak y secuencias de intervención flanqueadas por ubicaciones de donante y de aceptador para la unión de ARN. La transcripción altamente eficaz puede conseguirse con los promotores iniciales y tardíos de SV40, las repeticiones terminales largas (LTRS) de retrovirus, por ejemplo, RSV, HTLVI, HI VI y el promotor inicial del citomegalovirus (CMV). De todas formas, también se pueden usar elementos celulares (por ejemplo, el promotor de actina humana). Los vectores de expresión adecuados para su uso en la práctica del presente invento incluyen, por ejemplo, vectores, como as pIRESneo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN, o pLNCX (Clonetech Labs, Palo Alto, CA), pcADN3.1 (+/-), pcADN/Zeo (+/-) o pcADN3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVL y PMSG (Farmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) y pBC12MI (ATCC 67109). Las células de mamíferos adecuados y otras células hospedadoras incluyen Hela, 293, H9 humanas y células Jurkat, NIH3T3 de ratón y células Cl27, Cos 1, Cos 7 y CV 1, células QC1-3 de codorniz, células L de ratón y células de ovario de hámster chino (CHO). De forma alternativa, el gen puede expresarse en líneas celulares estables que contienen el gen integrado en un cromosoma. La co-transfección con un marcador seleccionable, como dhfr, gpt, neomicina o higromicina permite la identificación y aislamiento de las células transfectadas.

El gen transfectado también se puede amplificar para expresar grandes cantidades del anticuerpo codificado. El marcador DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil para desarrollar líneas celulares que portan varios cientos o incluso varios miles de copias del gen de interés. Otra selección útil de marcadores es la sintasa de glutamina de enzima (GS) (Murphy, et al., Biochem. J. 227:277-279 (1991); Bebbington, et al., Bio/Technology 10:169-175 (1992)). Usando esos marcadores, las células de mamífero se cultivan en un medio selectivo y se seleccionan las células con la mayor resistencia. Estas líneas celulares contienen los genes amplificados integrados en un cromosoma. Las células de ovario de hámster chino (CHO) y NSO con frecuencia se usan para la producción de anticuerpos.

Los vectores de expresión pC1 y pC4 contienen el promotor fuerte (LTR) del virus Rous Sarcoma (Cullen, et al., Mol. Cell. Biol. 5:438-447 (1985)) más un fragmento del mejorador CMV (Boshart, et al., Cell 41:521-530 (1985)). Las ubicaciones de clonación múltiple, por ejemplo, con las ubicaciones de división de enzima de restricción BamHI, XbaI y Asp718, facilitan la clonación del gen de interés. Los vectores contienen, además del 3' intron, la señal de poliadenilación y terminación del gen de preproinsulina de rata.

Clonación y expresión de células CHO

El vector pC4 puede usarse para la expresión de anticuerpo de IL-6. El plásmido pC4 es un derivado del plásmido pSV2-dhfr (ATCC nº de acceso 37146). El plásmido contiene el gen de ratón DHFR bajo el control del promotor inicial de SV40. El ovario de hámster chino u otras células que no tienen actividad de hidrofolato que se transfectan con esos plásmidos pueden seleccionarse cultivando las células en un medio selectivo (por ejemplo, alpha minus MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD) complementado con el agente quimioterapéutico metotrexato. La amplificación de los genes DHFR en células resistentes a metotrexato (MTX) se ha documentado ampliamente (véase, por ejemplo, F. W. Alt, et al., J. Biol. Chem. 253:1357-1370 (1978); J. L. Hamlin and C. Ma, Biochem. et Biophys. Acta 1097:107-143 (1990); y M. J. Page y M. A. Sydenham, Biotechnology [Biotecnología] 9:64-68 (1991)). Las células cultivadas en concentraciones de MTX en aumento desarrollan resistencia al medicamento sobre-

produciendo la enzima objetivo, DHFR, como resultado de la amplificación del gen de DHFR. Si un segundo gen está unido al gen DHFR, normalmente se co-amplifica y sobre-expresa. Se conoce que este enfoque puede usarse para desarrollar líneas celulares que portan más de 1.000 copias de los genes amplificados. Posteriormente, cuando se retira el metotrexato, se obtienen líneas celulares que contienen el gen amplificado integrado en un cromosoma o más de la célula hospedadora.

También se pueden usar para la expresión promotores de alta eficacia distintos del promotor fuerte de la repetición terminal larga (LTR) del Virus Rous Sarcoma, por ejemplo, el promotor de β -actina humana, el promotor SV40 inicial o promotores tardíos de las repeticiones terminales largas de otros retrovirus, por ejemplo, HIV y HTLV1. Los sistemas de expresión genética de Clontech Tet-Off y Tet-On y otros sistemas similares pueden usarse para expresar el anticuerpo IL-6 en una forma regulada de células de mamífero (M. Gossen y H. Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 5547-5551 (1992)). Para la poliadenación de mRNA, también se pueden usar otras señales, por ejemplo, a partir de la hormona de crecimiento humana o genes de globina. Las líneas celulares estables que portan un gen de interés integrado en los cromosomas también se pueden seleccionar a la co-transfección con un marcador seleccionable, como gpt, G418 o higromicina. Es conveniente usar más de un marcador seleccionable al inicio, por ejemplo, G418 más metotrexato. El plásmido pC4 se digiere con las enzimas de restricción y a continuación se desfosforila usando fosfatasa intestinal de becerro por procedimientos conocidos. El vector entonces se aísla a partir de un 1 % de gel de agarosa.

Se usa la secuencia de ADN que codifica el anticuerpo IL-6 completo, por ejemplo, como se presenta en la SEC ID N°: 98 y 96, que corresponde a las regiones variables HC y LC de un anticuerpo IL-6 del presente invento, respectivamente, de acuerdo con los pasos de métodos conocidos. El ácido nucleico aislado que codifica una región constante humana adecuada (por ejemplo, regiones HC y LC) también se usa en este constructo.

Las regiones variable aislada y constante que codifican ADN y el vector desfosforilado entonces se ligan a la ligasa T4 de ADN. A continuación se transforman células de E. coli HB101 o azules XL-1 y se identifican las bacterias que contienen el fragmento insertado en plásmido pC4 que usa, por ejemplo, análisis de enzima de restricción.

Las células de ovario de hámster chino (CHO) que no tienen un gen de DHFR activo se usan para la transfección. 5 microgramos de la expresión de plásmido pC4 se cotransfectan con 0,5 microgramos del plásmido pSV2-neo usando lipofectina. El plásmido pSV2neo contiene un marcador seleccionable dominante, el neo gen a de Tn5 que codifica una enzima que confiere resistencia a un grupo de antibióticos, incluido G418. Las células se cultivan en alfa menos MEM complementado con 1 microgramo/ml G418. Tras 2 días, las células se tripsinizan y cultivan en placas de clonación de hibridoma (Greiner, Alemania) en alfa menos MEM complementada con 10, 25, o 50 ng/ml de metotrexato más 1 microgramo/ml G418. Tras aproximadamente 10-14 días, se tripsinizan clones sencillos y a continuación se cultivan en placas petri de 6 recipientes en matraces de 10 ml que usan diferentes concentraciones de metotrexato (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). Los clones que crecen a las concentraciones más altas de metotrexato a continuación se transfieren a nuevas placas de 6 recipientes que contienen incluso mayores concentraciones de metotrexato (1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM). El mismo procedimiento se repite hasta que se obtienen clones que crecen a una concentración de 100 - 200 mM. Se analiza la expresión del producto genético deseado, por ejemplo, por SDS-PAGE y Western blot o por análisis de HPLC de fase inversa.

Ejemplo 2 – Construcción y examen de anticuerpo anti-IL-6

Se construyeron y se analizó la actividad de variantes del anticuerpo IL-6 (clon AME-A9). En este ejemplo y en otros puntos de este documento, los CDRs son como ha definido Kabat con la excepción de CDRH1, que es la suma de las definiciones de Rabat y Chothia. La longitud de CDRH2 hizo necesario construir dos bibliotecas independientes para cubrir el área completa. Los clones de interés se secuenciaron y se caracterizaron con ELISA y se determinaron en un ensayo de base celular y constantes cinéticas.

En la Figura 9 se muestra un ejemplo de una ELISA realizado con los IgGs purificados. ELISA generalmente usó placas de microtitulación Costar 3366 recubiertas con un anticuerpo kappa de cabra antihumano. Se incubaron diluciones de Fab (o IgG) en los recipientes recubiertos durante 1 hr a 22° C. Los recipientes se lavaron a continuación con PBS, 0,1 % Tween 20 y se añadió IL-6 biotilado a 200 ng/ml durante 1 hora. Tras el lavado, se añadió un conjugado de fosfatasa alcalina de NeutrAvidin y se incubó durante 1 hora a 22° C. Se añadió un sustrato colorimétrico tras lavado extensivo y se determinó la unión con IL-6. Una variación de este ELISA incluyó un paso de lavado extendido en un vaso de PBS, 0,01 % de BSA a 37° C tras la incubación biotilada de IL-6, por ejemplo, un paso de lavado extendido de 18 horas.

Varios de los reactivos IL-6 de ingeniería humana generados de anticuerpos monoclonales IgG del invento tienen constantes de afinidad entre 1×10^9 y 9×10^{12} . Los altos niveles de afinidad de esos anticuerpos monoclonales de ingeniería humana los hacen adecuados para aplicaciones terapéuticas en enfermedades dependientes de IL-6, patologías o afecciones relacionadas.

Se obtuvieron múltiples variantes de anticuerpo anti-IL6 de ingeniería humana modificando una o más de las regiones CDR del anticuerpo. La siguiente Tabla 3 muestra un resumen de las mutaciones beneficiosas que se encontraron en las bibliotecas CDR individuales (los cambios en los aminoácidos son relativos a la variante AME-

A9). Además, la Tabla 13 muestra las secuencias de aminoácido para las CDRs de cadena ligera y pesada con las posibles posiciones de sustitución (marcadas con "X").

5 Se construyó una biblioteca "combinatorial" en base a los mejores clones (por ejemplo, variantes) que se encontraron en las bibliotecas CDR individuales. La Tabla 4 muestra las mutaciones que se incluyeron en la biblioteca "combinatorial". La biblioteca combinatorial se evaluó y caracterizó como se ha descrito. Las mutaciones que se encontraron en seis de los mejores clones se muestran en la siguiente Tabla 5A, mientras que los números de ID de la secuencia de los CDRs de esos clones se muestran en la Tabla 5B.

10 Ensayos de anti-IL-6 IgGs en un ensayo de base celular

15 Se estudió la capacidad de los anticuerpos anti-IL-6 quiméricos y anti-IL-6 de ingeniería humana (clon AME-19a) para evitar el crecimiento de una línea celular dependiente de IL-6. Las células 7TD1 se prensaron en una placa Costar 3610 96 a 200 células por recipiente. Se añadieron a las placas anticuerpos, diluidos en un medio de IMDM, seguido de la adición de IL-6 humano a una concentración final de 500 pg/ml y se incubaron placas en un incubador de cultivo de tejido durante 64-72 horas. En ese momento, se añadieron 50 µl de tampón de lisis celular a partir del kit ATPlite (Packard Bioscience) a todos los recipientes y las placas se agitaron durante 3 minutos. Se añadieron 50 µl de sustrato ATPlite y las placas cubiertas se agitaron 1 minuto. Se determinó la quimioluminiscencia en un luminómetro.

20 Los resultados de un ensayo de base celular se muestran en la Figura 10, y los valores EC50 calculados se muestran en la Tabla 6. El valor EC50 de los anticuerpos quiméricos anti-IL-6 es $2,7 \times 10^{-11}$ M (4,09 ng/ml) y el anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 (clon AME-19a) es $2,7 \times 10^{-12}$ M (0,41 ng/ml). El valor EC50 del anticuerpo de ingeniería humana muestra una mejora de un aumento de aproximadamente 10, aunque podría ser posible obtener una mejora de aproximadamente 10 a 60, incluidos los valores que intervienen en el valor EC₅₀.

25 **Ejemplo 3 – Cinética de unión de los anticuerpos anti-humanos IL-6 de ingeniería humana.**

30 El análisis de ELISA confirma que el anticuerpo purificado a partir de esas células hospedadoras unen IL-6 en una forma dependiente de la concentración. En este caso, se mide la afinidad del anticuerpo para este cognato antígeno (epítipo). Se obtienen las constantes de unión cuantitativa usando análisis por BIAcore y el instrumento KinExA 3000. Los resultados indican que varios de los anticuerpos monoclonales de ingeniería humana tienen muy alta afinidad con Kd en el rango de 1×10^{-9} a 3×10^{-14} .

35 Se llevó a cabo un inmuno ensayo de enzima (ELA) que usa anticuerpos monoclonales anti-humanos IL-6 (AME-A9, AME-A16, AME-18a, AME-20b, AME-22a y AME-23a) y CNTO 328 usado como control positivo para detectar la unión de IL-6 al receptor soluble IL-6, sIL-6R. El receptor humano soluble IL-6, sIL-6R, y IL-6 humano recombinante se obtuvieron a partir de sistemas R&D (Minneapolis, MN) (Catálogo#227-SR-025 y 206-IL-010, respectivamente). Se obtuvo peroxidasa de unión de IgG de rábano con cabra anti-humana (cadena H+L) de Jackson Immunoresearch (West Grove, PA) (Catálogo # 109-035-003). Se obtuvieron comprimidos de peróxido de hidrógeno y OPD de Sigma (St. Louis, MO) (Catálogo #H-1009 y P-8287, respectivamente).

40 Inmunoensayo de unión de enzima para formación de complejo sgp80/IL-6/anti-IL-6 mAb

45 Se recubieron placas Costar EIA (Coming/Costar, Acton, MA) (Catálogo #9018) con sIL-6R (10 µg/ml en PBS, 100 µl/recipiente) durante la noche a 4° C. Las placas se lavaron en 0,15 M de salino con 0,02 % (w/v) Tween 20 y las placas se bloquearon con 1 % (w/v) de BSA en PBS, 200 µl/recipiente durante una hora a temperatura ambiente. Los recipientes se volvieron a lavar en formato secuencial incubado con 200 ng/ml de IL-6 humano (100 µl/recipiente) en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Se añadió anticuerpo a todos los recipientes en diluciones seriales en aumentos de 10 a partir de una concentración de inicio de 10 µg/ml en 100 µl/recipiente durante una hora a temperatura ambiente. Tras el lavado, los recipientes se incubaron con cabra con IgG anti-humano de unión de (H+L)-HRP, (10 µg/ml en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los recipientes se lavaron y se añadió una solución de 100 µl/recipiente de sustratos de citrato-fosfato (0,1 M de ácido cítrico y 0,2 M de fosfato de sodio, 0,01 % H₂O₂ y 1 mg/ml de OPD) durante 15 minutos a temperatura ambiente. La reacción se paró al añadir 25 µl/recipiente de 4 N de ácido sulfúrico y el OD490 se leyó por medio de un lector de placa ELISA automatizado (Molecular Devices Spectromax Plus, Sunnyvale, CA).

50 Para testar el efecto de la preincubación de IL-6 con anticuerpos anti hIL-6 monoclonales o CNTO 328, se incubaron 200 ng/ml IL-6 (100 µl) con diluciones en diez aumentos de anticuerpo (100 µl), comenzando por 10 µg/ml durante una hora a temperatura ambiente. Esta mezcla pre-incubada a continuación se incubó con sIL-6R durante una hora a temperatura ambiente y se detectó el complejo sIL-6R/IL-6/anti humano IL-6 usando IgG anti-humano de cabra unido con (H+L)-HRP, (10 µg/ml en PBS) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las afecciones del ensayo restantes fueron las mismas descritas en el párrafo anterior.

65 Los estudios previos han mostrado que CNTO 328 puede detectar IL-6 cuando se captura por sIL-6R recubierto una placa EIA. Además, AME-A9, AME-A16, AME-18a, AME-20b, AME-22a y AME-23a pueden detectar IL-6 unido a

sgp80 (sIL-6R) de forma dependiente de la dosis usando EIA. Cada anticuerpo anti-IL-6 de ingeniería humana se evaluó en referencia a CNTO 328. De todas formas, la preincubación de IL-6 y de cualquiera de los anticuerpos monoclonales anti hIL-6 incluye la capacidad de sIL-6R de unir a IL-6.

5 Medición de constantes cinéticas para anti-IL-6 IgGs

El instrumento KinExA 3000, fabricado por Sapidyne, se utilizó para medir la cinética de la unión. Brevemente, IL-6 humana se acopló de forma covalente a gotas de alzacotona y la unión de IgG libres a las gotas se detectó en el instrumento. Para medir el KD, se incubaron tubos individuales que contenían una concentración constante de 0,5, 1 o 5 pM de IgG con IL-6 humano diluido serialmente de forma decreciente durante 3-4 días a 20° C en 0,1 % de BSA, PBS. Se usó un total de 13 tubos para cada determinación de Kd. Por ejemplo, los anticuerpos quiméricos anti-IL-6 se usaron a una concentración constante de 5 pM y se incubaron tubos individuales con 0-200 pM de IL-6. Se configuraron de forma similar incubaciones para los otros IgGs. Tras la incubación, se determinó el IgG libre para cada ejemplo equilibrado en el instrumento KinExA 3000 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los valores de Kd se determinaron por medio del software KinExA 3000 usando el equipo KinExA 3000, como se describe a continuación más detalladamente.

Para medir k_{on} , se mezclaron IgGs individuales a 200 pM con 100-200 pM de IL-6 humano y se detectó el IgG no ligado uniendo a IL-6 humano acoplado de forma covalente a gotas de alzacotona en el equipo KinExA 3000. Se realizaron varias mediciones temporales. Los datos resultantes se usaron para calcular el k_{on} con el software KinExA 3000. Se calculó k_{off} usando la fórmula $KD = k_{off}/k_{on}$. En la Tabla 7 se muestra un resumen de las constantes cinéticas de anti-IL-6 IgGs.

5 Ejemplo 4: caracterización in vitro de anticuerpo anti-IL-6

Se llevaron a cabo estudios in vitro para caracterizar la secuencia, especificidad del epítipo, afinidad y actividad biológica del anticuerpo anti-IL-6.

30 mAb de ingeniería humana

El análisis de secuencia confirma que el anticuerpo anti-IL-6 del presente invento (representado en diferentes variantes/clones) contiene marcos completamente humanos. La Tabla 5a muestra un total de 10 residuos de aminoácidos cambiados tanto en la cadena ligera como la pesada de CDR1, 2, y 3 en el anticuerpo anti-IL-6 del presente invento (en diferentes variantes del anticuerpo) en comparación con los anticuerpos quiméricos anti-IL-6 (descritos en PCT WO 04/039826).

35 Especificidad de epítipo

El anticuerpo anti-IL-6 del presente invento y los anticuerpos quiméricos anti-IL-6 reconocen un epítipo similar en IL-6 humano. Estos anticuerpos no compiten con el ratón comercial anti-humano IL-6 mAb de R&D Systems #MAB-206, lo que sugiere que reconocen un epítipo que es diferente del de R&D anti-IL-6 mAb. El anticuerpo anti-IL-6 del presente invento y los anticuerpos quiméricos anti-IL-6 no compiten con la rata anti-humana IL-6 mAb de R&D.

Se capturó IL-6 humano (200 ng/ml) por medio de anti-IL-6 mAb unido por placa (ratón anti-humano IL-6 mAb, MAB-206, que se ha usado solo como mAb unido por placa para capturar IL-6 humano) (10 µg/ml) y diluciones seriales del anticuerpo anti-IL-6 del presente invento y los anticuerpos quiméricos anti-IL-6 se añadieron entonces a la placa, como se indica a lo largo del eje X. La unión a IL-6 se midió en forma de aumento en OD490 junto con el eje Y. Tanto el anticuerpo anti-IL-6 del presente invento como los anticuerpos quiméricos anti-IL-6 muestran una unión dependiente a la dosis a IL-6.

Inversamente, el anticuerpo anti-IL-6 del presente invento y los anticuerpos quiméricos anti-IL-6 se unen competitivamente al IL-6 humano, sugiriendo que las dos moléculas comparten un epítipo de unión similar sobre IL-6. La IL-6 humana (200 ng/ml) fue capturada por MAB-206 de unión por placa (10 µg/ml). A continuación, se añadieron a la placa diluciones seriales del anticuerpo anti-IL-6 del presente invento como se indica a lo largo del eje X y 50 ng/ml de anticuerpos anti-IL-6 quiméricos biotinilados. La unión de anticuerpos anti-IL-6 quiméricos biotinilados a IL-6 se detectó por streptavidina-HRP y se midió con lecturas OD₄₉₀ a lo largo del eje Y.

Además, los anticuerpos de ingeniería humana y quiméricos muestran propiedades similares para la unión al complejo sIL-6/sIL-6R (Figura 1). El anticuerpo anti-IL-6 del presente invento une a complejo sIL-6/sIL-6R. El receptor IL-6 soluble (sIL-6R) se recubrió en la placa a concentración de 10 µg/ml. A continuación se añadió IL-6 humano a la placa a concentración de 200 ng/ml. A continuación se añadieron a la placa diluciones seriales del anticuerpo anti-IL-6 del presente invento o del anticuerpo quimérico anti-IL-6, como se indica a lo largo del eje X y la unión al complejo IL-6/sIL-6R se detectó usando IgG HRP-anti-humano y se midió con lecturas OD₄₉₀ a lo largo del eje Y.

65

Para confirmar mejor las conclusiones anteriores, se llevó a cabo una inspección de reactividad por especies cruzadas usando sobrenadante condicional que contenía IL-6 generado a partir de LPS y PBMCs estimulados por IFN γ de diferentes especies en un ensayo de proliferación de base celular 7TD1 (línea celular de hibridoma murino dependiente de IL-6). Se ha demostrado que el anticuerpo de ingeniería humana del invento neutraliza la actividad del sobrenadante condicionado en la estimulación de proliferación de células 7TD1 a partir de varias especies de primates, entre las que se incluyen los humanos, tití, macaco cangrejero, chimpancé, macaco Rhesus, babuino, macaco cola de cerdo sureño y tití cabeza blanca, y mostraron un patrón de reactividad de cruce de especies similar en comparación al anticuerpo quimérico (Tabla 8).

5
10
15 Finalmente, cuando el mapeamiento de epítomos se llevó a cabo usando el método de digesto trípico, se observó el mismo epítomo de unión para los anticuerpos de ingeniería humana y quiméricos en IL-6 humano y está situado en los residuo de expansión de los aminoácidos Helix D 168-184 (Figure 3). Análisis de mutación recientes han confirmado que los residuos 179 y 182 son esenciales para que el anticuerpo del invento se una a IL-6. El epítomo (residuos de aminoácido 168-184) se identificó como la superficie de IL-6 que retenía deuterio en presencia del anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6.

Actividad biológica

20
25 La potencia de neutralización de IL-6 del anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 se determinó por medio de un bioensayo 7TD1 de base celular. El anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 demostró una potencia de neutralización de 10 aumentos mayor que el anticuerpo quimérico anti-IL-6 en el ensayo de proliferación celular 7TD1. Las células 7TD1 se estimularon con 500 pg/ml de hIL-6 en presencia de diluciones seriales de anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 o anticuerpos quiméricos anti-IL-6 o control de isotipo mAb durante 72 horas. La proliferación celular se midió en conteos por segundo, como indica el eje Y. Las barras de erro indican el SD de muestras duplicadas. Un círculo cerrado indica células sin IL-6; un círculo abierto indica células estimuladas con 500 pg/ml de hIL-6.

30 El anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 también inhibe la producción de proteína-1 (MCP-1) de monocito inducido por IL-6 a partir de células U937 (Figura 3) y la producción de suero amiloide A (SAAO inducido por IL-6/IL-1 β a partir de células de hepatoma humano HepG2 (Figura 4). La Figura 3 demuestra que el anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 inhibe la secreción de MCP-1 estimulado por IL-6 a partir de células U937. Se trataron 5×10^5 células/recipiente con 1 ng/ml de hIL-6 y diluciones seriales de anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 durante 72 horas. Se analizaron los supernadantes de cultivo celular en triplicados por ELISA para ver la presencia de MCP-1.

35
40 La Figura 4 muestra que el anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 inhibe la secreción de AAA estimulada por IL-1 β e IL-6 a partir de células HepG2. $2,25 \times 10^5$ células se estimularon con 100 ng/ml de hIL-6, 200 ng/ml de sIL-6R y 1 ng/ml de IL-1 β en presencia de diluciones seriales de anticuerpos de ingeniería humana anti-IL-6 durante 24 horas. A continuación se analizaron los supernadantes de cultivo celular en duplicados por medio de ELISA para ver la presencia de SAA.

Fosforilación de Stat3 dependiente de IL-6

45 Para evaluar la capacidad del anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 para bloquear la cascada de señalización resultante de la unión de IL-6 a IL-6R y gp130, se llevó a cabo un ensayo de inmuno-precipitación para testar el efecto de fosforilación de STAT3 dependiente de IL-6 sobre células THP-1, que expresan gp130 en la superficie celular.

50 Los mAbs se filtraron y se esterilizaron y almacenaron en PBS a 4° C. Se usaron IL-6 humano recombinante (206-IL-010) y sIL-6R (227-SR-025) a partir de sistemas R&D (Minneapolis, MN). Se obtuvieron medios de RPMI (11875-085), suero bovino fetal inactivado por calor (16000-069), L-Glutamina (25030-081), aminoácidos no esenciales (11140-050) y piruvato de sodio (11360-070) a partir de Invitrogen (Carlsbad, CA). También se usó TBS (10 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl).

55 Se testó THP-1, una línea celular de leucemia monocítica aguda humana recibida de bancos celulares de investigación, y resultó ser negativa para micoplasma y libre de bacterias. Estas células se cultivaron en un medio de RPMI con un 10 % de suero bovino fetal, 2mM de glutamina y 1 mM de piruvato de sodio. Las células se subcultivaron o recogieron cuando los cultivos alcanzaron una confluencia de aproximadamente el 85 %. Las células se dividieron rutinariamente 1:5 cada tres días.

60 Para fosforilación de tirosina se cultivaron células hasta una confluencia del 80-90 % en matraces T- 225. El medio se retiró y se sustituyó con otro frescon sin suero e incubado toda la noche. Tras la falta de suero, se recogieron las células de cada matraz, se granularon y se volvió a suspender una concentración final de 20×10^6 células por afección en un medio de 0,5 ml sin suero.

65 Se preincubó RhIL-6 (0,1 μ g/ml) a 37° C durante 15 minutos con los siguientes reactivos: medio de 0,5 ml solo, anti-IL-6 Ab (10 μ g/ml); y sIL-6R (0,2 μ g/ml). A continuación se añadieron sIL-6R (0,2 μ g/ml) y anti-IL-6 Ab (10 μ g/ml) a

células preincubadas con anti-IL-6 Ab y sIL-6R, respectivamente, para incubación a 37° C durante 15 minutos. A continuación se combinaron las células con un medio como control negativo y el complejo IL-6/Ab/sIL-6R y se incubaron a 37° C durante 6 minutos. Las células se lavaron dos veces en TBS helado y los gránulos celulares se procesaron como se ha descrito en la Sección 5.4 o se almacenaron a -70° C.

5 Para inmunoprecipitación, se lisaron los gránulos celulares en 1 ml de tampón de lisis (50 mM Tris, pH 7.5, 300 mM NaCl, 0,5 % Triton-X-100) (T-9284, Sigma, St. Louis, MO) que contienen comprimido de cóctel de inhibidor de proteasa completo (1697498, Roche, Basilea, Suiza). Las células se agitaron 30 segundos y se incubaron a -70° C durante 20-60 minutos. Se retiraron los residuos celulares por centrifugación a 13.000 rpm durante 20 minutos. Para reducir el tintado de entorno no específico, las muestras se pre-aclararon por incubación con 2 IgG de conejo pg (I5006, Sigma, St. Louis, MO) más 50 µl de agarosa de proteína A (SC-2001, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) durante 1 hr a 4° C en un mezclador orbital. Las gotas de agarosa se retiraron por centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos. Los lisados aclarados se transfirieron a tubos e micro-centrifugado y se incubaron con anti-STAT3 (2 µg/ml) (SC-7179, Santa Cruz Biotechnology) toda la noche a 4° C en un mezclador orbital, seguido de la adición de 50 µ de gotas de agarosa de proteína A y se incubaron durante 2 horas a 4° C en un agitador orbital. Las gotas de agarosa se recogieron por un centrifugado a 2500 rpm durante 5 minutos y se lavaron 5 veces en TBS congelado a 4° C. A continuación se volvió a suspender las gotas de agarosa en 40 µl de tampón de muestra de Laemmli más DTT (NP0007-465030, Invitrogen, Carlsbad, CA) y se calentaron a 95° C durante 5 minutos.

20 Las muestras se resolvieron en un gel de 3-8 % de NuPage Bis-Tris (EA0375BOX, Invitrogen, Carlsbad, CA) con un tampón (NP0002-465026, Invitrogen, Carlsbad, CA) a 100 V durante 1 hora. Las proteínas se transfirieron a una membrana Nitrocellulose (LC2001, Invitrogen, Carlsbad, CA) usando un tampón de transferencia (NP0006-465029, Invitrogen, Carlsbad, CA) a 30 V durante 1 hora. Las membranas se bloquearon en leche en polvo libre de grasa al 10 % (Nestle, Glendale, California) en TBS-T durante la noche a 4° C. Tras varios lavados en TBS-T a temperatura ambiente, las membranas se incubaron con ratón monoclonal anti-p-STAT3 Ab (SC-8059, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), que se diluyó 1:1000 en TBS-T durante 4 horas a 4° C en un agitador orbital. Tras varios lavados, las membranas se incubaron con IgG-HRP de mono anti-ratón (1:1000) (SC-2318, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) a temperatura ambiente durante 2 horas en un mezclador orbital. Tras varios lavados, se detectaron las muestras usando Reactivos para detección ECLplus de Western Blot y un kit de análisis (RPN2108, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) tras el protocolo del fabricante y visualización por exposición a film ECL. Las membranas se retiraron de Ab sumergiéndolas en 100 mM de DTT, 2 % de SDS, 62,5 % de mM Tris-HCl, pH 6.7 a 100° C durante 30 minutos con agitación. A continuación, se lavaron las membranas en TBS-T y se bloquearon durante la noche con la leche en polvo libre de grasa al 10 %. Las membranas se lavaron e incubaron con anti-STAT3 (1:1000) (SC-7179, Santa Cruz Biotechnology) en TBS-T durante 2 horas a 4° C, se lavaron 5 veces seguido de incubación de 1 hora con IgG-HRP de cabra anti-ratón (1:1000) (SC2030, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y se detectaron usando ECLplus. Todas las membranas se retiraron de forma rutinaria y se volvieron a sondear con STAT3 para demostrar la presencia de proteína STAT3.

40 Los resultados mostraron que el anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 bloquearon la fosforilación mediada por IL-6 de stat3, un componente clave en la vía de señalización de IL-6 (Figuras 5A y 5B). El anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 (AME-19A) inhibe la fosforilación de stat3 inducida por IL-6/sIL-6R. La fosforilación de stat3 inducida por IL-6/sIL-6R recombinante humana se detectó en células THP-1 (Figura 5B). La adición de 10 µg/ml de anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 (AME-19A) o anticuerpos quiméricos anti-IL-6 inhibió por completo la fosforilación de stat3 (Figura 5B). La Figura 5A muestra la presencia de una cantidad similar de proteína stat3 no fosforilada e todas las muestras, correspondiendo a los diferentes clones de anti-il-6 de ingeniería humana. En este documento, CNT0328 (o 328) designa los anticuerpos quiméricos, humano-murino (también denominados tipo silvestre (WT)), 150 designa clon AME-22a, 143 designa clon AME-23a, 140 designa clon AME-20b, 136 designa clon AME-19a, 130 designa clon AME-18a, 106 designa clon AME-A16, 104 designa clon AME-A9.

50 **Eficacia *in vivo* de anticuerpo anti-IL-6 de ingeniería humana**

La eficacia del anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 se evaluó en dos modelos *in vivo* diferentes. Primero, se testaron los efectos del anticuerpo IL-6 de ingeniería humana y quimérico y se compararon en un ensayo de angiogénesis en Matrigel de inducción de IL-6 humano en ratones. En el tampón de Matrigel se incluyeron 200 ng/ml de IL-6 humano. A cada uno de los ratones se inyectaron dos tampones Matrigel. Grupos de seis ratones recibieron una inyección *i.v* de 1, 3, o 6 mg/kg de anticuerpo anti-IL-6 de ingeniería humana o quiméricos. Se administró PBS o un isotipo de control mAb también a los grupos de control. Se retiraron los tampones el día 7 y se midió la angiogénesis en base al contenido de hemoglobina, longitud de microvasos, y número de microvasos en los tampones. Los resultados demostraron que el IL-6 humano (grupo PBS) estimulaba la angiogénesis en el modelo de tampón de Matrigel según las medidas de los tres parámetros.

65 El anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 (AME-19A) inhibe el número medio de microvasos en tampones de Matrigel. Además, el anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 (AME-19A) inhibe la longitud media de los microvasos en tampones de Matrigel. Además, el anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 (AME-19A) inhibe el nivel de hemoglobina en tampones de Matrigel.

Además, tanto los anticuerpos anti-IL-6 de ingeniería humana (AME-19A) como quiméricos inhibieron de forma dependiente de la dosis la angiogénesis mediada por IL-6 en ratones. Finalmente, los anticuerpos anti-IL-6 de ingeniería humana y quiméricos exhibieron una actividad comparable en la inhibición de angiogénesis inducida por IL-6 a 6 mg/kg, la mayor dosis testada. Aunque los anticuerpos anti-IL6 quiméricos inhibieron de forma significativa la angiogénesis humana inducida por IL-6 a 3 mg/kg de la forma medida por la longitud de los vasos y el número de vasos, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los anticuerpos anti-IL-6 de ingeniería humana y quiméricos en esas dosis.

Se desarrolló otro modelo in vivo para evaluar en mayor medida el efecto del anticuerpo anti-IL-6 de ingeniería humana sobre la producción en ratones Balb/C de proteína A amiloide de suero (SAA) en un reactivo de fase aguda inducido por IL-6 humano. Los ratones recibieron una administración i.p. 0,01, 0,5 o 5 mg/kg de anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 4 horas antes de la administración i.v. de 5 µg/kg de IL-6 humano (Figure 6). Se usó como control PBS y control mAb de isotipo. Los niveles de suero SAA se determinaron a 16 horas tras la inyección de IL-6. Tanto los anticuerpos anti-IL-6 de ingeniería humana como los quiméricos inhibieron de forma significativa la producción de SAA humano inducido por IL-6 en ratones Balb/C a 0,5 y 5 mg/kg, y el anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 inhibió de forma significativa la producción de SAA a la dosis más baja testada. De todas formas, no se observaron diferencias estadísticas significativas entre los anticuerpos anti-IL-6 de ingeniería humana y quiméricos en las tres dosis testadas (Figura 6).

La Figura 6 muestra que el anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 inhibe la producción de SAA humano inducido por IL-6. Cada punto representa el valor medio de SAA para cada animal y la línea representa la media de todos los puntos de datos para cada grupo. Se llevó a cabo la comparación por pares y se usaron intervalos de confianza de Tukey simultáneos al 95 % para controlar el error tipo I general. (** p<0,001, *p<0,05).

25 Ejemplo 5 – Razones terapéuticas para mAb anti-IL-6

Artritis reumatoide. Efecto de mAb anti-IL-6 sobre artritis inducida por colágeno (CIA) – modelo animal de artritis reumatoide

Modelos de enfermedad in vivo preclínicos

Se ha buscado IL-6 en varios modelos in vivo. O bien se usó el anticuerpo anti-ratón IL-6 en modelos murinos estándar o anti-IL-6R humanizado (80kDa) mAb (MRA; Chugai) en modelos de primates y en el modelo SCID humano/ratón. En artritis murina inducida por colágeno (CIA), anti-IL-6 fue eficaz en la prevención de la enfermedad si se usó de forma temprana (día 0 o 3 tras la inmunización por colágeno), pero no en puntos más tardíos. En el modelo de trasplante humano/ratón SCID, en el que se transplanta tejido sinovial humano a ratones inmunodeficientes, el tratamiento por MRA produjo una contracción de implantes del tejido y redujo las células inflamatorias y osteoclastos. En CIA en monos cynomolgus, MRA inhibió el desarrollo de artritis y mejoró las medidas en fase aguda.

El efecto de un anti-ratón IL-6 mAb sustituto sobre el desarrollo de la enfermedad se ha evaluado en un modelo de CIA. Los resultados indican que la administración i.p. del anti ratón IL-6 a 1 mg/ratón/semana antes de la inducción de la enfermedad suprimió de forma significativa el desarrollo de la artritis inducida por colágeno como refleja la clara reducción en la gravedad de la enfermedad. Se indujo artritis a ratones d 8 semanas de edad tipo DBA/1 LacJ con 100 µg de colágeno bovino tipo II en adyuvante de Freund completo (FCA) de forma intradérmica en la base de la cola. Se monitorizó clínicamente a los ratones diariamente durante la aparición de la enfermedad. Se administró anti-IL-6 mAb o control de isotipo mAb i.p. 2 días antes de la inducción de CIA y a continuación semanalmente 1 mg/ratón. Los marcadores de artritis se determinaron en base a la inflamación, eritema y desfiguración articular.

Los datos histopatológicos confirmaron la observación clínica de que la inyección semanal i.p. de mAb anti-ratón IL-6 mejoraron de forma significativa los parámetros de artritis inducida por colágeno. Todos los parámetros de artritis que se examinaron, incluida la respuesta inflamatoria (sinovitis y formación de pannus) y los cambios erosivos (erosiones y estructura articular general) mejoraron de forma significativa en ratones tratados con IL-6 anti-ratón en comparación con los animales de control tratados con mAb. El mAb anti-IL-6 suprimió la artritis a un nivel histopatológico. La sinovitis se marcó en base al espesor de la membrana sinovial; la formación de pannus se marcó en base al alcance del pannus en relación con el espacio articular; y las erosiones se marcaron en base al alcance en el cartílago y el hueso subcondral.

La pérdida de proteínas de matriz del cartílago se redujo de forma significativa en ratones tratados con IL-6 mAb anti-ratón. Se examinaron secciones articulares representativas obtenidas a partir de animales de control y tratados con anti-IL-6 mAb al final del estudio (día 53) por medio de Toluidine Blue con tinte para la matriz del cartílago.

El análisis por Micro-CT apoyó la observación clínica de que el efecto de la terapia anti ratón IL-6 se ejerció a nivel de la progresión de la enfermedad dentro de la articulación individual. La inspección visual de imágenes típicas 3D CT indica el marcado grado de cambios erosivos que se producen en el grupo tratado por mAb del control de isotipo en comparación con los cambios inflamatorios del tejido blando predominantemente leve. Los experimentos se llevaron a cabo con animales representativos tratados con mAb de control y animales tratados con IL-6 mAb anti-ratón.

Lupus. Efecto de anti-IL-6 sobre ratones NZBAV F1

Modelos de enfermedad pre-clínicos *in vivo*

5 Existen modelos murinos para SLE y tienen estrechas similitudes con la enfermedad humana. Los estudios de cadenas de MRL/*lpr* y NZB/W F1 han demostrado hiperproliferación de células B, producción de anticuerpos y deposición de complejos inmunes que tienen un gran parecido con la enfermedad humana. Se ha demostrado que anti-IL-6 mAb es eficaz en la inhibición de la producción de autoanticuerpos, reduciendo la proteinuria y mejorando la supervivencia animal en ratones NZBAV F1.

10 Se ha estudiado en ratones NZB/W F1 el efecto de un anti-ratón IL-6 mAb sustituto sobre el desarrollo de la enfermedad del lupus. Los resultados preliminares han demostrado que la administración i.p. del IL-6 mAb anti-ratón a 1 mg/ratón/semana for 22 semanas ha suprimido la producción de autoanticuerpos anti-dsADN, un autoanticuerpo patógeno principal en este modelo de enfermedad (Figura 7). Los niveles de autoanticuerpo anti-dsADN en animales tratados con anti-IL-6 mAb fueron más bajos de forma uniforme a lo largo de todo el estudio en comparación con los animales tratados con salino y Ab de control.

15 Como se ha indicado, la Figura 7 muestra la inhibición de la producción de anticuerpos anti-dsADN por anti-IL-6 mAb en ratones NZBAY F1. Un valor Individual de O.D. para cada una de las muestras se normalizó a un suero de control positivo y se presentó en forma de % de control positivo. Cada uno de los grupos representa el % de control positivo de cada muestra y la línea representa la media de todos los puntos de datos de cada uno de los grupos. Una diferencia significativa se indica en forma de * $p < 0,01$.

20 Además, el mAb anti-IL-6 inhibió la proliferación de células B y redujeron los daños renales cuando se examinó un pequeño subconjunto de los animales. Mientras que no hubo diferencias significativas en la proliferación de células T entre los diferentes grupos de tratamiento al final del estudio, la proliferación de células B inducida por anti-IgM y anti-CD40 fue más baja en ratones tratados con anti-IL-6 mAb en comparación con los tratados con salino en el tiempo, específicamente, tras 34 semanas. Este resultado es coherente con la reducción de la producción de anticuerpos anti-dsADN que se han informado anteriormente y sugiere que las células B auto reactivas podrían ser los objetivos directo y dominante del tratamiento anti-IL-6 mAb.

25 El análisis histopatológico indicó que los animales del estudio podrían categorizarse en 3 grupos de gravedad de la enfermedad renal (leve, moderada y grave) (Tabla 9). La patología de enfermedad renal en ratones NZB/W F1 indican hiperplasia linfoide mezclada y deposición de complejo inmune en la membrana de base glomerular.

30 Los animales tratados con anti-IL-6 mAb desarrollaron enfermedad renal menos grave. La hiperplasia linfoide mezclada perivascular y la deposición de proteínas estaban ausentes en los animales tratados con anti-IL-6 mAb mientras que los animales tratados con salino Ab de control desarrollaron hiperplasia linfoide mixta perivascular moderada y grave. Además, la deposición de complejo inmune en la membrana de base glomerular fue leve en los animales tratados con anti-IL-6 mAb en comparación con los de los otros dos grupos de tratamiento. La disección del mecanismo de acción de anti-IL-6 mAb sobre B, T y funciones de célula macrófaga se lleva a cabo porque estas células juegan un papel fundamental en la patogénesis de SLE.

35 Diabetes Mellitus de Tipo II

40 Se ha indicado que IL-6 juega un papel importante en el desarrollo de resistencia a la insulina asociada con obesidad. De todas formas, los datos *in vitro* e *in vivo* generados hasta el momento tanto apoyan como contradicen su papel potencial en la resistencia a la insulina.

Experimentos *in vitro*

45 Se han llevado a cabo experimentos para entender mejor los efectos que podría tener IL-6 sobre la señalización de insulina y sobre los efectos y función biológica de la insulina, como la absorción de glucosa, regulación genética y mecanismos relacionados usando modelos *in vitro* de tejidos que respondan a la insulina (células 3T3 LI para tejido adiposo, células HepG2 para células hepáticas, células C2C12 para músculo esquelético) y modelos *in vivo* de resistencia a la insulina y T2DM, como ratones db/db.

50 Los datos *in vitro* sugieren que IL-6 ejerce su efecto principal en la señalización de insulina en el hígado. El tratamiento con IL-6 de las células HepG2 produce la inhibición de fosforilación de Akt inducida por insulina. Este efecto inhibitorio de IL-6 sobre la señalización de insulina se ve bloqueado por un anticuerpo anti-IL-6. Los cambios del metabolismo de glucosa y los efectos de la insulina en el hígado se ha sugerido que son los factores del desarrollo de la resistencia a la insulina y el T2D. Los efectos de IL-6 sobre la señalización de insulina en células 3T3 LI (línea celular de adipocito) y C2C12 (líneas celulares de músculo esquelético) se examinan para determinar los mecanismos de IL-6 sobre T2D.

3T3 L1. Se llevaron a cabo experimentos usando línea celular de adipocito de ratón 3T3 L1. Se evaluó en células 3T3 L1 diferenciadas al 90 %, el efecto de IL-6 sobre la absorción de glucosa inducida por insulina. En estos experimentos, el tratamiento con 10 ng/ml of TNF α durante 24 horas inhibe de forma constante la absorción de glucosa inducida por insulina, mientras que 20 ng/ml de IL-6 no tuvieron efecto. Estos datos sugieren que la actividad de IL-6 sobre el tejido adiposo no es el mecanismo principal de la resistencia a la insulina mediada por IL-6, sino que el tejido adiposo podría ser una fuente principal de IL-6 que interfiere con la sensibilidad a la insulina en el hígado y el músculo. Se obtuvieron los mismos datos usando adipocitos humanos primarios diferenciados a partir de depósitos subcutáneos. Los efectos de IL-6 sobre la absorción de glucosa usando adipocitos primarios humanos a partir de un depósito de grasa visceral se investigan porque dicho depósito podría ser más relevante para la resistencia a la insulina asociada a la obesidad.

HepG2. Las células HepG2 se eligieron como representante in vitro del tejido del hígado. Las células HepG2 son líneas celulares de hepatoma humano de las que se ha mostrado previamente el efecto de IL-6 sobre la señalización de insulina. En los experimentos, 20 ng/ml de IL-6 bloquearon la fosforilación de Akt inducida por insulina, una quinasa crucial en la vía de señalización de la insulina, y el efecto máximo se observó tras 60 minutos de incubación; esto es coherente con los resultados informados en la bibliografía científica.

La fosforilación de Akt sobre células HepG2 sub-confluentes en placas de 10 cm se midió tras incubación de rh IL-6 (20 ng/ml) durante 30, 60, 90 y 120 minutos. Durante los últimos 5 minutos de incubación, se añadieron 0,5 nM, 1 nM y 5 nM de insulina para inducir la fosforilación de Akt. Las células se lisaron usando tampón de lisado RIPA modificado y la fosforilación de Akt se midió usando ELISA Ser-Fosfo-Akt. Se obtuvieron resultados usando kits ELISA pAkt y Akt (BioSource). Pasados 60 minutos de tratamiento IL-6, en presencia de una concentración fisiológica de insulina (0,5-1 nM), se inhibió la fosforilación de Akt -50 % en comparación con el grupo de control. Las concentraciones de proteínas se cuantificaron con el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA.

Efectos del anticuerpo IL-6

Se midió la capacidad del anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 para inhibir los efectos de IL-6 sobre la fosforilación de Akt inducida por insulina. 20 μ g/ml de anticuerpos de ingeniería humana anti-IL-6 pudieron inhibir los efectos de IL-6 en células HepG2. Las Figuras 8A y 8B muestran el efecto de IL-6 en presencia y ausencia del anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 sobre la fosforilación de Akt inducida por insulina.

En la imagen superior, (Figura 8A), los datos representan la media \pm SEM. (* Significativo en comparación (+) insulina, IL-6, P=0,029; ** Significativo en comparación con (+) insulina +IL-6, P= 0,02). Las células HepG2 sub-confluentes se trataron con 20 ng/ml de IL-6 durante 60 minutos. Durante los últimos 5 minutos de tratamiento, se añadió 1 nM de insulina y las células se lisaron usando tampón RIPA modificado. Las muestras se analizaron por ELISA que detecta la fosforilación a Ser 473 de Akt. Todos los datos se normalizaron a Akt total medido por ELISA. El tratamiento AME-19a pudo restaurar la señalización de Akt normal.

En la imagen inferior (Figura 8B), se muestra un western blot representativo. Las bandas superiores incluyen muestras tratadas con IL-6 (20 ng/ml, 60 min, 5 min con 1 nM de insulina), AME-19a (20 μ g/ml +/- IL-6 a 20 ng/ml durante 60 minutos, 5 minutos con 1 nM de insulina) o tampón. Se sondó el blot con anticuerpo anti-fosfo Ser/Akt (panel superior) (pS473, Biosource). Las bandas inferiores (el mismo blot se retiró y re-sondó con anti-Akt de Bio Source) demuestran que se cargó por cada carril una proteína equivalente.

Método: se cultivaron células HEPG2 en 100 mm de placas de cultivo de tejido hasta su confluencia. Las células se dejaron durante la noche en DMEM-1 % BSA. AME-19a (20 μ g/ml) se incubó en células durante ~30 minutos antes de la adición de IL-6. IL-6 (20 ng/ml) +/- AME-19a (20 μ g/ml) se incubaron durante ~30 minutos antes de la adición a las células. Las muestras se incubaron en células durante 60 minutos, a 37° C; a continuación se añadió 1 nM de insulina (concentración final) a las células durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Las células se lavaron inmediatamente con 3 enjuagues de PBS helado. Las placas se congelaron hasta el lisado. El Fosfo Akt y el Akt total se determinaron usando kits ELISA (BioSource y Sigma). **Referencia:** JJ Senn, PJ Kover, IA Nowak y RA Mooney. Interleukin 6 induces cellular insulin resistance in hepatocytes. *Diabetes*. [La interleuquina 6 induce la resistencia celular a la insulina en hepatocitos. *Diabetes*] 51:3391-3399, 2002.

Hepatocitos primarios en ratas

Los hepatocitos primarios representan un sistema in vitro más relevante adecuado para inspeccionar el efecto de IL-6 y anticuerpos anti-IL-6 (u otros antagonistas de IL-6) sobre la señalización de insulina y el efecto de la insulina sobre la producción de glucosa en hígado. Para determinar la activación de cinasa PI3 (PI3K) en hepatocitos de rata tratados con insulina, se trataron células aisladas IL-6 y/o IL-6 mAh con insulina en presencia y ausencia de 5 ng/ml IL-6 y la fosforilación del receptor de insulina, IRS-1 (Figura 12A), y Akt (Figura 12B) se determinaron usando ensayos ELISA y análisis Western blot. Además, se examinaron los efectos de IL-6 sobre asociación estimulada por insulina IRS1/p85 (Figuras 11A y B). Los experimentos se llevaron a cabo de la siguiente manera:

Se equilibraron hepatocitos primarios de rata (de ~2 meses) en 6 placas recubiertas con colágeno durante la noche en un medio de Hepatocima. El día siguiente, se mantuvieron las células durante 6 horas en un estrepococo DMEM-

1 % BSA-penn; a continuación se incubaron con hIL-6 (5 ng/ml); anticuerpo anti-IL-6 (AME-19a) (20 ng/ml) o anticuerpo anti-IL-6 (AME-19a) +hIL-6 durante 90 minutos a 37° C. Las células se pretrataron durante 1 hora con anticuerpo anti-IL-6 (AME-19a) antes de añadir la combinación. La combinación también se preincubó antes de añadirla a las células. Se añadieron 5 nM de insulina (de BioSource) a las células durante 5 minutos; a continuación se aspiraron las células y se lisaron inmediatamente con tampón de extracción BioSource + inhibidores de proteasa. Los lisados se centrifugaron y los supernadantes se diluyeron 1:10 y se inspeccionaron en ELISAs (de Biosource).

Asociación IRS1/p85:

Se incubaron durante la noche cantidades equivalentes de proteína (45 µg) con 2 µg de anticuerpo policlonal anti-IRS-1 (de Upstate, Elemento #06-248). A continuación se inmunoprecipitaron las muestras con gotas de proteína A durante 1 hora y se eluyeron con 3x de tampón de muestra para SDS-PAGE. Las muestras IP se pusieron en 4-12 % de gel SDS-Page y a continuación se transfirieron a membrana para análisis por Western blot. Las membranas se sondaron con: (1) 1:100 dilución de p85 mAb (de Upstate, Elemento #05-217) para p85 asociado con IRS-1, por ejemplo, el PI3K activo (como se muestra en la FIG. 11 A); y (2) 1:600 de dilución de IRS-1 mAb (de BD Biosciences, Elemento #611395) para IRS-1 total como control de carga (como se ve en la FIG. 11B).

Los datos indican que el tratamiento IL-6 provoca una disminución de la fosforilación inducida por insulina de IR, IRS-1 y Akt. Este efecto de IL-6 se abolió cuando las el anticuerpo anti-IL-6 (clone AME-19a) penetró las células. Además, IL-6 inhibió la asociación de p85 (subunidades de PI3K) inducida por insulina con IRS-1. Again, this effect of IL-6 was inhibited by pretratamiento with anticuerpo anti-IL-6.

Experimentos in vivo

Los efectos de IL-6 sobre la sensibilidad a la insulina no se han experimentado ampliamente en animales. Para evaluar si la terapia anti-IL-6 mejoraría la sensibilidad a la insulina y T2DM, se trataron ratones db/db y machos C57/B16 con dieta con altos niveles de grasa con anticuerpo comercial anti-ratón IL-6 (obtenido de R&D Systems).

Ratones db/db

Los efectos del tratamiento anti IL-6 se inspeccionan usando ratones db/db de diferentes edades. Los ratones entre 8-10 semanas de edad se caracterizan por hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, representando los estadios iniciales de la enfermedad, mientras que los ratones de 12-14 semanas de edad se caracterizan por niveles de glucosa elevados, además de hiperinsulinemia, representando los estadios avanzados de T2DM. Ambos grupos de edad de los ratones se usan para investigar la capacidad de la terapia anti IL-6 para mejorar la sensibilidad a la insulina y el control glucémico en test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ipGTT).

Los ratones db/db tienen señalización de leptina no funcional debido a la mutación dentro del receptor de leptina. Estos ratones desarrollan obesidad, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina al envejecer los ratones, y los primeros síntomas se detectarían cuando los ratones tuviesen 6-8 semanas. Se trataron dos grupos de ratones de diferentes edades - 8 y 12 semanas – con 5 mg/kg de anti IL-6 mAb y se llevó a cabo un test de tolerancia a la glucosa intraperitoneal (ipGTT) un día y 7 días tras el tratamiento. El calendario de tratamiento se ve en la Figura 15.

En animales de 8 semanas de edad, el tratamiento con anti IL-6 mAb no tuvo efecto sobre la eliminación de glucosa durante GTT. El tratamiento anti IL-6 mAb provocó una mejora en la tolerancia a la glucosa (GT) en animales de 12 semanas de edad, aunque el efecto no fue significativo estadísticamente (p=0,063). Esta mejora en GTT se vio el día 7 tras el tratamiento. Además, se analizaron muestras de suero antes y después de completar el estudio para ver sus perfiles de adipocina y adiponectina. Los niveles de IL-6, TNFα y MCP-1 estaban por debajo de los niveles de detección. Estos datos, conjuntamente con los resultados de ipGTT podrían sugerir que: los animales db/db no son un buen modelo para el estudio de los efectos de anti IL-6 sobre la resistencia a la insulina; y los niveles de tejido IL-6 son más relevantes para un posible papel de IL-6 en el desarrollo de T2DM resistente a la insulina.

Obesidad inducida por la dieta (DIO) – Modelo animal para resistencia a la insulina y obesidad

Se alimentó a ratones macho C57/B1 con una dieta que incluye un 60 % de grasa durante 20-35 semanas. Desarrollaron obesidad (el peso corporal medio era de 50,5 gramos) y un aumento en los niveles de glucosa de en ayunas (FBG >145 mg/dl). Además, se deterioró su GT. Los animales DIO se trataron con 10 mg/kg de anti IL-6 Ab murino (R&D Systems). Globalmente, recibieron 50 mg/kg de anti IL-6 mAb durante 3 semanas. Se llevó a cabo ipGTT tras las 2 primeras dosis (día 5), tras la 4ª dosis (días 12 y 16) y tras la 5ª dosis (día 23). Al mismo tiempo, se obtuvo sangre para medir las adipocitoquinas y adiponectina.

El tratamiento anti IL-6 no mejoró los niveles de tolerancia de glucosa los días 5 y 12; pero cuando se llevó a cabo los días 16 y 23, se observó una mejora en la eliminación de glucosa así como en la excursión de niveles de glucosa. Esta mejora alcanzó significación estadística a 39, 60 y 90 minutos durante GTT.

En otro grupo de experimentos, se trató a animales DIO semanalmente (2 dosis durante la primera semana y 1 dosis cada semana durante las 4 semanas siguientes) con 10 y 20 mg/kg de anti IL-6 Ab y 20 mg/kg de IgG de control de isotipo vía ruta i.p. Se llevaron a cabo perfiles HOMA-IR (tras 2, 4 y 6 semanas de tratamiento), ipGTT, ipITT y adipocina (tras 6 semanas de tratamiento).

5

Análisis HOMA-IR sobre animales DIO tratados con anti-IL-6 Ab:

En estos estudios, hubo una disminución en los niveles de insulina y glucosa en ayunas en animales DIO tratados con 10 y 20 mg/kg de anti-IL-6 Ab murino y control de isotipo. Los animales se purgaron y los niveles de insulina y glucosa en ayunas se determinaron usando glucosa Trace/DMA (ox) (thermo Electron Corp) y ELISA de insulina de rata ultra sensible (Crystal Chem), respectivamente. Estos valores se usaron para determinar HOMA-IR. El índice HOMA-IR refleja el estado de la sensibilidad a la insulina y se correlaciona bien con las conclusiones del estudio de sujeción. HOMA-IR se calcula por medio de la fórmula: (glucosa en ayunas (mM) X Insulina en ayunas (mIU/Lit))/22,5 (Figuras 13 A, B y C).

15

Las mejoras en HOMA-IR se observaron tras 2, 4 y 6 semanas de tratamiento (las Figuras 13A-C muestran los datos tras 6 semanas de tratamiento). Al final del estudio, se llevaron a cabo ipGTT y ipITT. En ambos estudios, el tratamiento anti-IL-6 (20 mg/ml) mejoró de forma significativa la excursión y la eliminación de glucosa en comparación con animales tratados con el isotipo.

20

Los análisis de adipocina y citoquina de muestras de suero a partir de animales de control y tratados con anti-IL-6 indicaron que la neutralización de IL-6 provocó un descenso en los niveles de IL-6 circulante y TNFa junto con la tendencia de disminución de MCP-1 y niveles de resistina. En otro grupo de datos, los niveles de adiponectina aumentaron con el tratamiento anti-IL-6.

25

Se llevó a cabo el análisis histológico de muestras de hígado a partir de los grupos de tratamiento y control. Las muestras se tintaron con tinte Oil Red O para determinar el contenido lípido de las parénquimas del hígado. El contenido lípido del hígado en los animales DIO se redujo en respuesta al tratamiento con anticuerpo murino anti-IL-6.

30

El tintado revela que el 34 % de las muestras de hígado tratadas con el vehículo estaban relacionadas con lípidos en animales no tratados y solo un 8 % en 20 mg/kg de animales tratados con anti-IL-6 (Figuras 14A-F). Las Figuras 14A y D representan el grupo de control; Las Figuras 14B y E representan los animales DIO no tratados; y las Figuras 14C y F representan los animales tratados con anti-IL-6. El aumento de contenido lípido en el hígado se ha asociado con el desarrollo de resistencia a la insulina y Diabetes Mellitus Tipo 2. Así, es posible que la neutralización de IL-6 provoque la mejora de la sensibilidad a la insulina y T2DM afectando al metabolismo lípido del hígado. Estos datos conjuntamente sugieren claramente el papel de IL-6 en la patología de la Diabetes Tipo 2 y que la neutralización de IL-6 podría mejorar la sensibilidad a la insulina.

35

40

Estudios adicionales

Se monitorizan los efectos de IL-6 en presencia o ausencia del anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 sobre la fosforilación IRS1 estimulada por insulina, asociación con p85/PI3K, receptores de insulina (IR) fosforilación, síntesis de glucógeno y la implicación de señalización SOCS3 y STAT en células HepG2. Otros experimentos adicionales examinan el efecto de IL-6 sobre la secreción de insulina inducida por glucosa a partir de islotes pancreáticos. Los datos publicados hasta la fecha describen tanto el efecto inhibitorio como estimulante de IL-6 sobre la secreción de insulina a partir de islotes de rata. Islotes de rata recientemente aislados (de Liefscann) se tratan con IL-6 y anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 (AME-19a) en presencia o ausencia de glucosa. Se miden los niveles de insulina segregados a partir de islotes en varios tratamientos.

45

50

C2C12. Las células C2C12 se usan para estudiar el efecto de la insulina sobre el músculo esquelético. Se llevan a cabo experimentos para examinar la expresión de IRS1 y Glut4, fosforilación IRS 1 inducida por insulina y los efectos de IL-6 sobre la acción de la adiponectina.

55

Ventajas:

La inhibición de la actividad de IL-6 por parte del anticuerpo IL-6 del presente invento podría representar un avance terapéutico significativo porque podrá mejorar la sensibilidad a la insulina y el control metabólico sin los efectos secundarios de los productos existentes. Además, las terapias actuales apenas controlan la inflamación sistémica, que se sugiere que podría ser la causa subyacente de T2DM, y complicaciones diabéticas asociadas. Una terapia como el anticuerpo IL-6 del presente invento, además del aumento de la sensibilidad a insulina, se esperaría que inhibiese la inflamación sistémica y evitase el desarrollo de complicaciones diabéticas.

60

65

El número de pacientes afectados por T2DM está aumentando y se estima que en 2025 llegará a 300 millones de individuos. Podría usarse un anticuerpo anti IL-6 como monoterapia o en combinación con otras OAD ya existentes, como sulfonilureas, biguanidas (por ejemplo, Metphormin), tiazolidinediones, meglitinida (por ejemplo, repaglinida), inhibidores de alfa-glucosidasa (por ejemplo, acarbosa). Además, podría usarse en combinación con insulina u otras

5 terapias, para mejorar la sensibilidad a insulina y control glucémico y para evitar los casos de hipoglucemia
 asociados con el tratamiento por insulina. También se espera que además de la mejora de la sensibilidad a insulina
 y la regulación de los niveles de glucosa en T2D y pacientes de síndrome metabólico, la terapia anti IL-6 tuviera un
 efecto beneficioso sobre los cambios de CV que se observan con frecuencia en esos pacientes. Véase: Sattiel, AR, y
 Kahn, CR. 2001. *Nature* 414:799-806; Hansen, BC., 1995. *Diabetes Care* [Cuidado de la diabetes] 18:A2-A9;
 Diabetes Prevention Program research group [Grupo de investigación del programa de prevención de la diabetes].
 10 2002. *New Engl. J Med.*, 346:393-403; Hansen, BC., 2000, *Ann New York Academy of Science*, 892:1-24; Hsueh,
 WA., y Quinones, MJ., 2003, *Am. J. Cardiology* [Cardiología], 93: 10J-17J; Resnick, HE and Howard, BV., 2002, *Ann.*
Rev. Med., 53:245-267; Komer, J. and Aronne, L., 2003, *J Clin. Invest.*, 111(5):565-570; Skoog, T., et al., 2001.
 15 *Diabetology* [Diabetología], 44:654:655; Fernandez-Real, JM., y Ricart W., 2003, *Endocrine Reviews*, 24(3):278-301;
 Fernandez-Real, JM., et al., 2001, *J Clin Endocrinol Metab.*, 86:1154-1159.; 10a. Fried, S., et al., 1998. *J Clin*
Endocrinol Metab., 83:847-850; Senn, JJ., et al., 2002, *Diabetes*, 51:3391-3399; Rotter, V., et al, 2003, *JBC* in press,
 Manus.#301977200; 12a. Stouthard, JM., et al., 1996, *BBRC*, 220:241-245; Southern, C., et al., 1990, *Biochem J.*,
 272:243-245; Sandler, S., et al., 1990, *Endocrinology* [Endocrinología], 126:1288-1294; Pedersen, BK., et al., 2001, *J*
 20 *Physiol.*, 536:329-337; DiCosmo, BF, et al., 1994, *Int. Immunol.*, 6:1829-1837; Wallenius, V., et al., 2002, *Nature*
Medicine, 8:75-79; Vozarova , B., et al., 2003, *Human Genetic*, 112:409-413; Kubaszek, A., et al., 2003, *Diabetes*,
 52:558-461; Tsigos, C., et al., 1997, *J Clin Endocrinol Metab*, 82:4167-4170; Stoutharad, JM., et al., 1995, *Am J*
Physiol., 268:E813-E819; Kern, PA., et al., 2001, *Am J Physiol Endocrinol Metab.*, 280:E745-E751; Bastard, JP., et
 al., 2000, *J Cion Endocrinol Metab.*, 85:3338-3342; and Bastard, JP., et al, 2002, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*,
 87:2084-2089.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

TABLA 1 –CDRs de cadena ligera

Nº DE ID DE SEC	Nombre CDR*	Clon	Secuencia
Nº DE ID DE SEC:1	CDRLI	33	SASHSVSYMY
Nº DE ID DE SEC:2	CDRL1	33	AGTGCCAGCCATAGTGTAAGTTACATGTAC
Nº DE ID DE SEC: 3	CDRLI	34	SASISVSYMY
Nº DE ID DE SEC:4	CDRLI	34	AGTGCCAGCAT TAGTGTAAGT TACATGTAC
Nº DE ID DE SEC:5	CDRLI	35	SARSSVSYMY
Nº DE ID DE SEC: 6	CDRLI	35	AGTGCCCGGTCAAGTGTAAGTTACATGTAC
Nº DE ID DE SEC::7	CDRLI	36	SASYSVSYMY
Nº DE ID DE SEC: 8	CDRLI	36	AGTGCCAGC TATAGT GTAAGT TACATGTAC
Nº DE ID DE SEC:9	CDRLI	37	SASSSVFYMY
Nº DE ID DE SEC: 10	CDRLI	37	AGTGCCAGCTCAAGTGTAATTTACATGTAC

ES 2 551 985 T3

	Nº DE ID DE SEC	Nombre CDR*	Clon	Secuencia
5				
10	Nº DE ID DE SEC: 11	CDRLI	39	SGSSYVSYMY
15	Nº DE ID DE SEC: 12	CDRL1	39	AGTGGCAGCTCATATGTAAGTTACATGTAC
20	Nº DE ID DE SEC: 13	CDRLI	40	SALSSVSYMY
25	Nº DE ID DE SEC: 14	CDRLI	40	AGTGCCCTGTCAAGTGTAAGTTACATGTAC
30	Nº DE ID DE SEC: 15	CDRLI	A9	SASSSVSYMY
35	Nº DE ID DE SEC: 16	CDRLI	A9	AGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGTAC
40	Nº DE ID DE SEC: 17	CDRL2	41	DFSNLAS
45	Nº DE ID DE SEC: 18	CDRL2	41	GACTTTTCCAACCTGGCTTCT
50	Nº DE ID DE SEC: 19	CDRL2	43	DLSNLAS
55	Nº DE ID DE SEC: 20	CDRL2	43	GACCTGTCCAACCTGGCTTCT

55

60

65

	Nº DE ID DE SEC	Nombre CDR*	Clon	Secuencia
5				
10	Nº DE ID DE SEC:21	CDRL2	44	DMSNLAS
15	Nº DE ID DE SEC: 22	CDRL2	44	GACATGTCCAACCTGGCTTCT
20	Nº DE ID DE SEC:23	CDRL2	46	DTSNLTS
25	Nº DE ID DE SEC:24	CDRL2	46	GACACATCCAACCTGACGTCT
30	Nº DE ID DE SEC: 25	CDRL2	48	DTSELAS
35	Nº DE ID DE SEC: 2 6	CDRL2	48	GACACATCCGAGCTGGCTTCT
40	Nº DE ID DE SEC:27	CDRL2	A9	DTSNLAS
45	Nº DE ID DE SEC:28	CDRL2	A9	GACACATCCAACCTGGCTTCT
50	Nº DE ID DE SEC:29	CDRL3	49	MQWSGYPYT
55	Nº DE ID DE SEC: 30	CDRL3	49	ATGCAGTGGAGTGGTTACCCATACACG

55

60

65

	Nº DE ID DE SEC	Nombre CDR*	Clon	Secuencia
5				
	Nº DE ID DE SEC: 31	CDRL3	50	CQWSGYPYT
10				
	Nº DE ID DE SEC:32	CDRL3	50	TGTCAGTGGAGTGGTTACCCATACACG
15				
	Nº DE ID DE SEC:33	CDRL3	52	SCWSGYPYT
20				
	Nº DE ID DE SEC: 34	CDRL3	52	TCTGTGTGGAGTGGTTACCCATACACG
25				
	Nº DE ID DE SEC: 3 5	CDRL3	A9	SQWSGYPYT
30				
	Nº DE ID DE SEC:36	CDRL3	A9	TCTCAGTGGAGTGGTTACCCATACACG
35				
	Nº DE ID DE SEC:138	CDRL3	Alt.	QQWSGYPYT
	*CDRs como los definidos por Kabat con la excepción del CDRH1, que es la suma de las definiciones de Rabat y Chothia.			

40

45

50

55

60

65

TABLA 2 - Cadena pesada CDRs

	Nº DE ID DE SEC	Nombre CDR*	Clon	Secuencia
5	Nº DE ID DE SEC:37	CDRHI	4	GFTFSSFALS
10	Nº DE ID DE SEC: 38	CDRHI	4	GGATTCACCTTTAGTAGCTTTGCCCTTTCT
	Nº DE ID DE SEC:39	CDRH1	5	GFTFSPFAMS
15	Nº DE ID DE SEC:40	CDRHI	5	GGATTCACCTTTAGTCCTTTTGCCATGTCT
	Nº DE ID DE SEC:41	CDRHI	6	GFQFSSFAMS
	Nº DE ID DE SEC: 42	CDRHI	6	GGATTCCAGTTTAGTAGCTTTGCCATGTCT
20	Nº DE ID DE SEC:43	CDRHI	8	GFTTSSFAMS
	Nº DE ID DE SEC:44	CDRHI	8	GGATTCACCACTAGTAGCTTTGCCATGTCT
	Nº DE ID DE SEC:45	CDRHI	Q + P	GFQFSPFAMS
25	Nº DE ID DE SEC:46	CDRHI	Q + P	GGATTCCAGTTTAGTCCTTTTGCCATGTCT
	Nº DE ID DE SEC:47	CDRHI	A9	GFTFSSFAMS
	Nº DE ID DE SEC:48	CDRHI	A9	GGATTCACCTTTAGTAGCTTTGCCATGTCT
30	Nº DE ID DE SEC:49	CDRH2	10	KASSGGSYTYYPDTVIG
	Nº DE ID DE SEC:50	CDRH2	10	AAAGCGAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGA CACTGTGACGGGC
	Nº DE ID DE SEC: 51	CDRH2	11	KISSGGSYEYYPDTVIG
35	Nº DE ID DE SEC: 52	CDRH2	11	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACGAGTACTATCCTGA CACTGTGACGGGC

40

45

50

55

60

65

ES 2 551 985 T3

	Nº DE ID DE SEC	Nombre CDR*	Clon	Secuencia
5				
	Nº DE ID DE SEC: 53	CDRH2	12	KISSGGSYYYYPDTVGTG
10	Nº DE ID DE SEC: 54	CDRH2	12	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACTATTACTATCCT GA CACTGTGACGGGC
15	Nº DE ID DE SEC: 55	CDRH2	14	KISSGGSWTYYPDVTG
	Nº DE ID DE SEC: 56	CDRH2	14	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTGGACCTACTATCCT GA CACTGTGACGGGC
20				
	Nº DE ID DE SEC: 57	CDRH2	16	KISPGGSYTYYPDTVGTG
25	Nº DE ID DE SEC: 58	CDRH2	16	AAAATTAGTCCGGGTGGGAGTTACACCTACTATCCT GA CACTGTGACGGGC
30	Nº DE ID DE SEC:59	CDRH2		KISPGGSWTYYSDTVGTG
			P +W + S (18a, 19a)	
35				
	Nº DE ID DE SEC: 60	CDRH2		AAAATTAGTCCGGGTGGGAGTTGGACCTACTATTCT GA CACTGTGACGGGC
40			P +W + S (18a, 19a)	
45				
	Nº DE ID DE SEC: 61	CDRH2	A9	KISSGGSYTYYPDTVGTG
50	Nº DE ID DE SEC: 62	CDRH2	A9	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATCCT GA CACTGTGACGGGC

55

60

65

ES 2 551 985 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Nº DE ID DE SEC	Nombre CDR*	Clon	Secuencia
Nº DE ID DE SEC: 113	CDRH2	Alt.	EISSGGSYTYYPDTVTVG
Nº DE ID DE SEC: 63	CDRH2	17	KISSGGSYTYFPDTVTVG
Nº DE ID DE SEC: 64	CDRH2	17	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTTTCTGA CACTGTGACGGGC
Nº DE ID DE SEC: 65	CDRH2	19	KISSGGSYTYYPDTVAG
Nº DE ID DE SEC: 66	CDRH2	19	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGA CACTGTGGCTGGC
Nº DE ID DE SEC: 67	CDRH2	20	KISSGGSYTYDDTVTVG
Nº DE ID DE SEC: 68	CDRH2	20	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATGATGA CACTGTGACGGGC
Nº DE ID DE SEC: 69	CDRH2	21	KISSGGSYTYYSDTVTVG
Nº DE ID DE SEC: 70	CDRH2	21	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATTCTGA CACTGTGACGGGC
Nº DE ID DE SEC: 71	CDRH2	22	KISSGGSYTYYPDTVTP
Nº DE ID DE SEC: 72	CDRH2	22	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGA CACTGTGACGCCG
Nº DE ID DE SEC: 73	CDRH2	23	KISSGGSYTYYPDPTDTG
Nº DE ID DE SEC: 74	CDRH2	23	AAAATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGA CACTGATACGGGC

ES 2 551 985 T3

	Nº DE ID DE SEC	Nombre CDR*	Clon	Secuencia
5				
10	Nº DE ID DE SEC: 75	CDRH2	P + S (20b, 23a)	KISPGGSYTYYSDTVGTG
15	Nº DE ID DE SEC: 76	CDRH2	P + S (20b, 23 a)	AAAATTAGTCCGGGTGGGAGTTACACCTACTATTCTGA CACTGTGACGGGC
20				
25	Nº DE ID DE SEC: 77	CDRH2	P + W + D (22a)	KISPGGSWTYYDDTVTG
30	Nº DE ID DE SEC: 78	CDRH2	P + W + D (22a)	AAAATTAGTCCGGGTGGGAGTTGGACCTACTATGATGA CACTGTGACGGGC
35	Nº DE ID DE SEC: 79	CDRH3	25	QLWGSYALDY
40	Nº DE ID DE SEC: 80	CDRH3	25	CAGTTATGGGGGTCGTATGCTCTTGACTAC
	Nº DE ID DE SEC: 81	CDRH3	26	QLWGYALDT
45	Nº DE ID DE SEC: 82	CDRH3	26	CAGTTATGGGGGTACTATGCTCTTGACACG
	Nº DE ID DE SEC: 83	CDRH3	29	QLWGTALDY
50	Nº DE ID DE SEC: 84	CDRH3	29	CAGT TATGGGGGAC T TAT GC TCT T GAC TAC
	Nº DE ID DE SEC: 85	CDRH3	30	QLWGNALDY
55	Nº DE ID DE SEC: 86	CDRH3	30	CAGTTATGGGGGAATTATGCTCTTGACTAC

60

65

ES 2 551 985 T3

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Nº DE ID DE SEC	Nombre CDR*	Clon	Secuencia
Nº DE ID DE SEC: 87	CDRH3	31	QLWGYALDF
Nº DE ID DE SEC: 88	CDRH3	31	CAGTTATGGGGGTACTATGCTCTTGACTTT
Nº DE ID DE SEC: 89	CDRH3	32	QLWGYALDI
Nº DE ID DE SEC: 90	CDRH3	32	CAGTTATGGGGGTACTATGCTCTTGACATT
Nº DE ID DE SEC: 91	CDRH3	A9	QLWGYALDY
Nº DE ID DE SEC: 92	CDRH3	A9	CAGTTATGGGGGTACTATGCTCTTGACTAC
Nº DE ID DE SEC: 114	CDRH3	Alt.	GLWGYALDY
*CDRs según la definición de Kabat con la excepción de CDRH1, que es la suma de las definiciones de Kabat y Chothia			

TABLA 3 - Mutaciones a partir de bibliotecas de CDR individual

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Clon	CDRH1		Clon	CDRL1
4	M34L		33	S27H
5	S31P		34	S27I
6	T28Q		35	S26R
8	F29T		36	S27Y
			37	S30F
Clone	CDRH2		38	S27I
10	151A		39	A25G.S28Y
11	T57E		40	S26L
12	T57Y			
14	Y56W		Clone	CDRL2
16	S52aP		41	T51F
17	Y59F		43	T51L
19	T64A		44	T51M
20	P60D		46	A55T
21	P60S		47	T51L
22	G65P		48	N53E

5

10

15

20

25

30

35

23	V63D			
			Clon	CDRL3
	CDRH3		49	Q89M
25	Y99S		50	Q89C
26	Y102T		52	Q90C
27	Y99S			
29	Y99T			
30	Y99N			
31	Y102F			
32	Y102I			
			Clon	CDRL3

40

TABLA 4 – Mutaciones incluidas en la biblioteca combinatoria

45

50

55

60

65

CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3
T28Q	S52aP	Y102F	S27I	T51F	Q89M
S31P	Y56W	Y102I	S27Y	T51M	
	P60S				
	V63D				

TABLA 5A

Clones de biblioteca positiva												
	Ligero					Pesado						
CDR-->	L1	L2	L3	H1	H2	H3						
WT--> CNT0328	S	T	Q	T	S	ES	Y	P	V	G	Y	
Clon	27	51	89	28	31	50	52a	56	60	63	95	102
AME-A9			S			K					Q	
AME-16			S			K	P				Q	
AME-18a		F	M	Q	P	K	P	W	S		Q	I
AME-19a	I	M	M		P	K	P	W	S		Q	I
AME-20b	I	M	M	Q		K	P		S		Q	I
AME-22a	Y	F	M	Q	P	K	P	W		D	Q	F
AME-23a	Y	M	M	Q		K	P		S		Q	F

35

40

45

50

55

60

65

TABLA 5B – clones de anticuerpo de ingeniería humana anti-IL-6 y CDRs correspondientes

CDR-->	LI	L2	L3	HI	H2	H3
AME-A9	ID DE SEC: 15	ID DE SEC:27	ID DE SEC:35	ID DE SEC:47	ID DE SEC: 61	ID DE SEC:91
AME-16	ID DE SEC: 15	ID DE SEC:27	ID DE SEC: 3 5	ID DE SEC: 47	ID DE SEC:57	ID DE SEC:91
AME-18a	ID DE SEC: 15	ID DE SEC: 17	ID DE SEC:29	ID DE SEC:45	ID DE SEC:59	ID DE SEC: 89
AME-19a	ID DE SEC: 3	ID DE SEC:21	ID DE SEC: 29	ID DE SEC: 39	ID DE SEC: 59	ID DE SEC: 89
AME-20b	ID DE SEC: 3	ID DE SEC: 21	ID DE SEC:29	ID DE SEC:41	ID DE SEC:75	ID DE SEC: 89
AME-22a	ID DE SEC: 7	ID DE SEC: 17	ID DE SEC: 29	ID DE SEC:45	ID DE SEC: 77	ID DE SEC: 87
AME-23a	ID DE SEC: 7	ID DE SEC: 21	ID DE SEC: 29	ID DE SEC:41	ID DE SEC: 75	ID DE SEC: 87

Tabla 6 – Valores EC₅₀

Clon	EC ₅₀
CNT0328	2,7 x 10 ⁻¹¹ M
AME-19a	2,7 x 10 ⁻¹² M (mejora en aumentos de 10)

TABLA 7 – Constantes cinéticas para IgGs de Anti-IL-6

Clon	Concentración de anticuerpos (pM)	K_D (pM)	Tasa de mejora (en comparación con los ab quiméricos)	k_{on} ($M^{-1} Sec^{-1}$)	Tasa de mejora	k_{off} (sec^{-1}) (calculado)	Tasa de mejora
Anticuerpos numéricos	5	3	1	$4,4 \times 10^6$	1	$1,3 \times 10^{-5}$	1
AME-16	1	0,83	3,6	1×10^6	0,22	$8,3 \times 10^{-7}$	15,7
AME-18a	0,5	0,12	25	2×10^7	4,4	$2,4 \times 10^{-6}$	5,4
AME-19a	0,5	0,037	81,1	$5,5 \times 10^6$	1,2	2×10^{-7}	65
AME-20b	1	0,78	3,8	$4,7 \times 10^6$	1	$3,7 \times 10^{-6}$	3,5
AME-22a	1	0,18	16,7	6×10^6	1,3	$1,1 \times 10^{-6}$	11,8
AME-23a	1	0,006	500	$7,4 \times 10^6$	1,6	$4,4 \times 10^{-8}$	295

Tabla 8 – Reactividad de cruce de especies de anticuerpos de ingeniería humana y quiméricos

5		Inhibición (Quiméricos y de ingeniería humana)
	Especies	
10	Humana	+
	Tití	+
15	Cynomolgous	+
20	Chimpancé	+
	Rhesus	+
25	Babuino	+
30	Cola de cerdo sureño	+
	Cabeza blanca	+
35	Reacción cruzada	
	Desconocido	Conejo
		N/D
40	Perro	-
	Ratón	-
45	Rata	-
50	Cobaya	-
55	No reactivas	Cerdo enano de Yucatán
		-

Reactividad de especies cruzadas del anticuerpo de ingeniería humana y quimérico. Los anticuerpos de ingeniería humana y quiméricos son capaces de neutralizar la proliferación de células 7TD1 estimuladas por supernadantes condicionados a partir de PBMCs de humanos, títis, mono cynomolgus, chimpancé, mono rhesus, babuino, mono cola de cerdo sureño y titi cabeza blanca. «+» positivo en ensayo de neutralización; «-» negativo en ensayo de neutralización; N/D, sin determinar.

Tabla 9 – Impacto del tratamiento con anti-IL-6 mAb sobre patología renal en ratones NZB/W F1

Grupo de tratamiento	Grave*	Moderado*	Leve*
Salino (n=10)	60 % o 6/10	20 % o 2/10	20 % o 2/10
IgG de rata (n=10)	70 % o 7/10	30 % o 3/10	0 o 0/10
R&D IL-6anti-ratón (n=10)	10 % o 1/10	30 % o 3/10	60 % o 6/10

* Grave – Hiperplasia linfoide mixta perivascular, hipercelularidad mesangial, deposición proteica, deposición de complejo inmune de membrana de base glomerular.
 Moderado – Hiperplasia linfoide mixta perivascular moderada, hipercelularidad mesangial moderada, deposición de complejo inmune de membrana de base glomerular, deposición no proteica.
 Leve – Hipercelularidad mesangial leve, deposición de complejo inmune de membrana de base glomerular, hiperplasia linfoide mixta no perivascular, deposición no proteica.

5
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

Tabla 10 – Secuencias de región variable de clones

Nº DE ID DE SEC	Clon	Región V de Cadena Pesada (H) o ligera (L)	Secuencia
93	A9	Cadena AA	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVS YMYWYQQKPGQAPRLIYDTSNLAGIPAR FSGSGSGTDFLTITSSLEPEDFAVYYCSQW SGYPYTFGGGTKVEIK
94		Nucleótido de cadena L	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCC AGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTAC ATGTACT GGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTA TGACACA TCCAACCTGGCTTCTGGCATCCCAGCCAGTTTCAGTGGCAGTG GGTCTGG GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATT TTGCAG TTTATTACTGTTCTCAGTGGAGTGGTTACCCATACACGTTCCGGC GGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA
95		AA de cadena H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRSLSCAASGFTFS SFAMSWVRQAPGKGLEWVAKISSGGSYTTY PDTVTGRFTISRADNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARQLWGYYALDYWGQGTITVTVSS
96		Nucleótido de cadena H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCT GGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGTAGCT TTGCCA TGTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG TGGCCAAA ATTAGTAGTGGTGGGAGTTACACCTACTATCCTGACACTGTGAC GGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGC AAATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAG ACAGTTA TGGGGTACTATGCTCTTGACTACTGGGGCCAAGGGACCACGG TCACCGT CTCCTCA

5	97	19A	AA de cadena L	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASISVS YMYWYQQKPGQAPRLLIYDMSNLAGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCMQW SGYPYTFGGGTKVEIK
10	98		Nucleótido de cadena L	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCC AGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGCCAGCATTAGTGTAAGTTACA TGACT GGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTA TGACATG TCCAACCTGGCTTCTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTG GGTCTGG GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATT TTGCAG TTTATTACTGTATGCAGTGGAGTGGTTACCCATACACGTTCCGGC GGAGGG
15	99		AA de cadena H	EVOLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS PFAMSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYY SDTVTGRFTISRADNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARQLWGYYALDIWGQGTITVTVSS
20	100		Nucleótido de cadena H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCT GGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTTAGTCCTT TTGCCA TGTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGG TGGCCAAA ATTAGTCCGGGTGGGAGTTGGACCTACTATTCTGACACTGTGAC GGGCCG ATTCACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTATCTGC AAATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAG ACAGTTA TGGGGTACTATGCTCTTGACATTTGGGGCCAAGGGACCACGG TCACCGT CTCCTCA
25	101	23A	AA de cadena L	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASYSVS YMYWYQQKPGQAPRLLIYDMSNLAGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCMQW SGYPYTFGGGTKVEIK
30	102		Nucleótido de cadena L	GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTTTGTCTCC AGGGGA AAGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGCCAGCTATAGTGTAAGTTACA TGACT GGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTA TGACATG TCCAACCTGGCTTCTGGCATCCCAGCCAGGTTCAAGTGGCAGTG GGTCTGG GACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGAGCCTGAAGATT TTGCAG TTTATTACTGTATGCAGTGGAGTGGTTACCCATACACGTTCCGGC GGAGGG ACCAAGGTGGAGATCAAA
35				
40				
45				
50				
55				
60				
65				

5	103		AA de cadena H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFQFS SFAMSWVRQAPGKGLEWVAKIS PGGSYTTY SDTVTGRFTISRADNKNSLYLQ MNSLRAED TAVYYCARQLWGYYALDFWGGQ TTVTVSS
10	104		Nucleótido de cadena H	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTG GGGGGAGGCTTGGTCCAGCCT GGGGGGTC CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCCAGTTTAGTAGCT TTGCCA TGTCTTGGGTCCGCCAGGCTCC AGGGAAGGGGCTGGAGTGGG TGGCCAAA ATTAGTCCGGGTGGGAGTTACAC CTACTATTCTGACACTGTGAC GGCCG ATTACCATCTCCAGAGACAACGCC AAGAACTCACTGTATCTGC AAATGA ACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGG CTGTGTATTACTGTGCGAG ACAGTTA TGGGGGTACTATGCTCTTGACTTT TGGGGCCAAGGGACCACGG TCACCGT CTCCTCA
25	116	AME-16	AA de cadena L	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCS ASSSVS YMYWYQQKPGQAPRLLIYDTSNL ASGIPAR FSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVY YCSQW SGYPYTFGGGTKVEIK
30	117		Nucleótido de cadena L	ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCT CTTCTCCTCCTGCTACTCTGGC TCCCAGA TACCACCGGAGAAATTGTGTTGAC ACAGTCTCCAGCCACCCTG TCTTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCT CCTGCAGTGCCAGCTCAAG TGTAAGT TACATGTAAGTACCAACAGAAACCT GGCCAGGCTCCCAGGC TCCTCAT CTATGACACATCCAACCTGGCTTCT GGCATCCCAGCCAGGTT AGTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCT CACCATCAGCAGCCTAGA GCCTGAA GATTTTGCAGTTTATTACTGTTCTC AGTGAGTGGTTACCCATAC ACGTT CGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGAT CAAA
45	118		AA de cadena H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFQFS SFAMSWVRQAPGKGLEWVAKIS PGGSYTTY PDTVTGRFTISRADNKNSLYLQ MNSLRAED TAVYYCARQLWGYYALDYWGQ TTVTVSS
50	119		Nucleótido de cadena H	ATGGAGTTTGGCCTGAGCTGGGTT TTCCTTGTTGCTATTTTAGA AGGTGT CCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGG AGTCTGGGGGAGGCTTGGT CCAGCCTG GGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGT GCAGCCTCTGGATTACCTT TAGTAGC TTTGCCATGTCTTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGGT GGCCAAAATTAGTCCCGGTGGGAG TTACACCTACTATCCTGAC ACTGTGA CGGGCCGATTACCATCTCCAGAGAC AACGCCAAGAACTCACT GTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAG GACACGGCTGTGTATTACT GTGCGAG ACAGTTATGGGGTACTATGCTCTT GACTACTGGGGCCAAGGG ACCACGG TCACCGTCTCCTCA
65				

5	120	AME-18a	AA de cadena L	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVS YMYWYQQKPGQAPRLLIYDFSNLASGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCMQW SGYPYTFGGGKVEIK
10	121		Nucleótido de cadena L	ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTTCTCCTCCTGCTACTCTGGC TCCCAGA TACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGT CTTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGCCAGCTCAAG TGTAAGT TACATGTACTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGC TCCTCAT CTATGACTTCTCCAACCTGGCTTCTGGCATCCCAGCCAGGTTCA GTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGA
20	122		AA de cadena H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFS PFAMSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTTY SDTVTGRFTISRADNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARQLWGYYALDIWGQGTITVTVSS
25	123		Nucleótido de cadena H	ATGGAGTTTGGCCTGAGCTGGGTTTTCTTGTGCTATTTTAGA AGGTGT CCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT CCAGCCTG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCAGTT TAGTCCC TTTGCCATGTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGGT GGCCAAAATTAGTCCCGGTGGGAGTTGGACCTACTATAGCGAC ACTGTGA CGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACT GTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACT GTGCGAG ACAGTTATGGGGTACTATGCTCTTGACATTTGGGGCCAAGGG ACCACGG TCACCGTCTCCTCA
45	124	AME-20b	AA de cadena L	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASISVS YMYWYQQKPGQAPRLLIYDMSNLASGIPAR FSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCMQW SGYPYTFGGGKVEIK
50	125		Nucleótido de cadena L	ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTTCTCCTCCTGCTACTCTGGC TCCCAGA TACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGT CTTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGCCAGCATTAG TGTAAGT TACATGTACTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGC TCCTCAT CTATGACATGTCCAACCTGGCTTCTGGCATCCCAGCCAGGTTCA GTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGA GCCTGAA GATTTTGCAGTTTATTACTGTATGCAGTGGAGTGGTTACCCATA CACGTT CGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
55				
60				
65				

		AA de cadena H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFS SFAMSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSYTY SDTDTGRFTISRADNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARQLWGYYALDFWQGTTVTVSS
5		Nucleótido de cadena H	ATGGAGTTTGGCCTGAGCTGGGTTTTCTTGTGCTATTTTAGA AGGTGT CCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT CCAGCCTG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCAGTT TAGTAGC TTTGCCATGTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGGT GGCCAAAATTAGTCCCGGTGGGAGTTACACCTACTATAGCGAC ACTGTGA CGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACT GTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACT GTGCGAG ACAGTTATGGGGTACTATGCTCTTGACATTTGGGGCCAAGGG ACCACGG TCACCGTCTCCTCA
10			
15			
20			
25	AME-22a	AA de cadena L	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASYSVS YMYWYQQKPGQAPRLLIYDFSNLASGIPAR FSGSGSGTDFLTISLLEPEDFAVYYCMQW SGYPYTFGGGTKVEIK
30		Nucleótido de cadena L	ATGGAAGCCCCAGCGCAGCTTCTTCTCCTCCTGCTACTCTGGC TCCCAGA TACCACCGGAGAAATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTG TCTTTGT CTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGTGCCAGCTACAG TGTAAGT TACATGTACTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGC TCCTCAT CTATGACTTCTCCAACCTGGCTTCTGGCATCCCAGCCAGGTTCA GTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTAGA GCCTGAA GATTTTGCAGTTTATTACTGTATGCAGTGGAGTGGTTACCCATA CACGTT CGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA
35			
40			
45		AA de cadena H	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFQFS PFAMSWVRQAPGKGLEWVAKISPGGSWTYY PDDTGRFTISRADNKNSLYLQMNSLRAED TAVYYCARQLWGYYALDFWQGTTVTVSS
50		Nucleótido de cadena H	ATGGAGTTTGGCCTGAGCTGGGTTTTCTTGTGCTATTTTAGA AGGTGT CCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGT CCAGCCTG GGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCCAGTT TAGTCCC TTTGCCATGTCTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGGT GGCCAAAATTAGTCCCGGTGGGAGTTGGACCTACTATCCTGAC ACTGACA CGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCACT GTATCTG CAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACT GTGCGAG ACAGTTATGGGGTACTATGCTCTTGACTTCTGGGGCCAAGGG ACCACGG TCACCGTCTCCTCA
55			
60			
65			

Tabla 11 – Secuencia de aminoácido de una región marco de L6 de cadena ligera humana con secuencias CDR etiquetadas intercaladas

(FRL1 - Nº DE ID DE SEC: 105)

CDRL1 (FRL2 - Nº DE ID DE SEC: 106)

CDRL2

5 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCXXXXXXXXXXWYQQKPGQAPRLLIYXXXXXX

(FRL3 - Nº DE ID DE SEC: 107)

CDRL3 (FRL4 - Nº DE ID DE SEC: 108)

GIPARFSGSGSGTDFLTISLSEPEDFAVYYCXXXXXXXXXXFGGGTKVEIK

Tabla 12 – Secuencia de aminoácidos de una región marco de VH3-3 de pesada con secuencias CDR etiquetadas intercaladas

(FRH1 - Nº DE ID DE SEC: 109)

CDRH1 (FRH2 - Nº DE ID DE SEC: 110)

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASXXXXXXXXXXWVRQAPGKGLEWVA

CDRH2

(FRH3 - Nº DE ID DE SEC: 111)

XXXXXXXXXXXXXXXXXXRFTISRADNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

15 CDRH3 (FRH4 - Nº DE ID DE SEC: 112)

XXXXXXXXXXWGQGTTVTVSS

Tabla 13 - Secuencias CDR

Nº DE ID DE SEC	CDR	Secuencia AA*
132	CDRL1	S _{X1} X ₂ X ₃ X ₄ VX ₅ YMY
133	CDRL2	DX ₆ SX ₇ LX ₈ S
134	CDRL3	X ₉ X ₁₀ WSGYPYT
135	CDRH1	GF _{X11} X ₁₂ SX ₁₃ FAX ₁₄ S
136	CDRH2	KX ₁₅ SX ₁₆ GGSX ₁₇ X ₁₈ YX ₁₉ X ₂₀ DTX ₂₁ X ₂₂ X ₂₃
137	CDRH3	QLWGX ₂₄ YALDX ₂₅
<p>*X indica cualquier aminoácido adecuado con sustituciones de aminoácidos no limitativas y a modo de ejemplo que se muestran en las secuencias presentadas en Nº DE ID DE SEC: 1-92 de las Tablas 1 y 2 y en las Tablas 3, 4, 5A y 8. Además, X puede tener los siguientes valores:</p> <p>X₁ = A o G X₂ = S o R X₃ = H, I, S, o Y X₄ = S o Y X₅ = S o F X₆ = F, L, M, o T X₇ = N o E X₈ = A o T X₉ = M, C, o S X₁₀ = Q o C X₁₁ = T or Q X₁₂ = F, S, o T X₁₃ = S o P X₁₄ = L o M X₁₅ = A o I X₁₆ = S o P X₁₇ = Y o W X₁₈ = T, E, o Y X₁₉ = Y o F X₂₀ = P, S, D, o F X₂₁ = V o D X₂₂ = T o A X₂₃ = G o P X₂₄ = S, Y, T, o N X₂₅ = Y, T, F, o I</p> <p>Nº DE ID DE SEC:115 – SECUENCIA DE AMINOÁCIDO DE LA PROTEÍNA IL-6 MNSFSTSAFGPVAFSLGLLLVLPAAFPAPVPPGEDSKDVAAPHRQPLTSSERIDKQ IRYILDGIALRKETCNKSNMCESSKEALAENNLNLPKMAEKDGCFCQSGFNEETCL VKIITGLLEFEVYLEYLQNRFEESSEEQARAVQMSTKVLIQFLQKKAKNLDAITPD PTTNASLLTKLQAQNQLQDMTTHLILRSFKEFLQSSLRALRQM</p>		

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Centocor, Inc.
Applied Molecular Evolution, Inc.
- <120> Anticuerpos Anti-IL-6, compuestos,
métodos y usos
- 10 <130> CEN5094 PCT
- <140> PCT/US2006/016457
- <141> 2006-04-28
- 15 <150> 60/676,498
- <151> 2005-04-29
- <150> 60/677,319
- <151> 2005-05-03
- 20 <160> 138
- <170> FastSEQ para Windows versión 4.0
- 25 <210> 1
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 30 <400> 1
- Ser Ala Ser His Ser Val Ser Tyr Met Tyr
- 1 5 10
- 35 <210> 2
- <211> 30
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- 40 <400> 2
- agtgccagcc atagtgaag ttacatgtac 30
- <210> 3
- <211> 10
- 45 <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 3
- 50 Ser Ala Ser Ile Ser Val Ser Tyr Met Tyr
- 1 5 10
- <210> 4
- <211> 30
- 55 <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 4
- agtgccagca ttagtgaag ttacatgtac 30
- 60 <210> 5
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- 65 <400> 5

ES 2 551 985 T3

		Ser	Ala	Arg	Ser	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Tyr
		1				5					10
5	<210> 6										
	<211> 30										
	<212> ADN										
	<213> Homo sapiens										
10	<400> 6										
	agtgcccggg caagtgaag ttacatgtac									30	
	<210> 7										
	<211> 10										
15	<212> PRT										
	<213> Homo sapiens										
	<400> 7										
20		Ser	Ala	Ser	Tyr	Ser	Val	Ser	Tyr	Met	Tyr
		1				5					10
	<210> 8										
	<211> 30										
25	<212> ADN										
	<213> Homo sapiens										
	<400> 8										
	agtgccagct atagtgaag ttacatgtac									30	
30	<210> 9										
	<211> 10										
	<212> PRT										
	<213> Homo sapiens										
35	<400> 9										
		Ser	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Phe	Tyr	Met	Tyr
		1				5					10
40	<210> 10										
	<211> 30										
	<212> ADN										
	<213> Homo sapiens										
45	<400> 10										
	agtgccagct caagtgtatt ttacatgtac									30	
	<210> 11										
	<211> 10										
	<212> PRT										
	<213> Homo sapiens										
	<400> 11										
55		Ser	Gly	Ser	Ser	Tyr	Val	Ser	Tyr	Met	Tyr
		1				5					10
	<210> 12										
	<211> 30										
	<212> ADN										
	<213> Homo sapiens										
	<400> 12										
65	agtgccagct catatgaag ttacatgtac									30	

ES 2 551 985 T3

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5
 <400> 13

 Ser Ala Leu Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
 1 5 10
 10
 <210> 14
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 15
 <400> 14
 agtgcctgt caagtgaag ttacatgtac 30

 <210> 15
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 15
 25
 Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
 1 5 10
 30
 <210> 16
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 35
 <400> 16
 agtgcagct caagtgaag ttacatgtac 30

 <210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 17
 45
 Asp Phe Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5

 <210> 18
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 18
 gactttcca acctggcttc t 21
 55
 <210> 19
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60
 <400> 19
 65
 Asp Leu Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 20

ES 2 551 985 T3

<211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

5 <400> 20
 gacctgtcca acctggcttc t 21

<210> 21
 <211> 7
 10 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 21

15 **Asp Met Ser Asn Leu Ala Ser**
1 5

<210> 22
 <211> 21
 20 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 22
 25 gacatgtcca acctggcttc t 21

<210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 30 <213> Homo sapiens

<400> 23

35 **Asp Thr Ser Asn Leu Thr Ser**
1 5

<210> 24
 <211> 21
 40 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 gacacatcca acctgacgtc t 21

45 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <400> 25

55 **Asp Thr Ser Glu Leu Ala Ser**
1 5

<210> 26
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

60 <400> 26
 gacacatccg agctggcttc t 21

<210> 27
 <211> 7
 65 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

ES 2 551 985 T3

<400> 27

5 Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

10 <210> 28
<211> 21
<212> ADN
<213> Homo sapiens

15 <400> 28
gacacatcca acctggcttc t 21

<210> 29
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 29

25 Met Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
1 5

30 <210> 30
<211> 27
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 30
atgcagtgga gtggttacc atacacg 27

35 <210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

40 <400> 31

Cys Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
1 5

45 <210> 32
<211> 27
<212> ADN
<213> Homo sapiens

50 <400> 32
tgtcagtgga gtggttacc atacacg 27

55 <210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 33

60 Ser Cys Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
1 5

65 <210> 34
<211> 27
<212> ADN

ES 2 551 985 T3

<213> Homo sapiens

<400> 34
 5 tctgtgtgga gtggttacc atacacg 27

<210> 35
 <211> 9
 <212> PRT
 10 <213> Homo sapiens

<400> 35

Ser Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

15 <210> 36
 <211> 27
 <212> ADN
 20 <213> Homo sapiens

<400> 36
 tctcagtgga gtggttacc atacacg 27

25 <210> 37
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 37

30 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala Leu Ser
 1 5 10

<210> 38
 35 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 38
 40 ggattcacct ttagtagctt tgcccttct 30

<210> 39
 <211> 10
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens

<400> 39

Gly Phe Thr Phe Ser Pro Phe Ala Met Ser
 1 5 10

50 <210> 40
 <211> 30
 <212> ADN
 55 <213> Homo sapiens

<400> 40
 ggattcacct ttagtcctt tgccatgtct 30

60 <210> 41
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

65 <400> 41

ES 2 551 985 T3

5
 <210> 42
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 10
 <400> 42
 ggattccagt ttagtagctt tgccatgtct 30
 15
 <210> 43
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 20
 <400> 43
 Gly Phe Gln Phe Ser Ser Phe Ala Met Ser
 1 5 10
 25
 <210> 44
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 30
 <400> 44
 ggattcacca cttagtagctt tgccatgtct 30
 35
 <210> 45
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40
 <400> 45
 Gly Phe Gln Phe Ser Pro Phe Ala Met Ser
 1 5 10
 45
 <210> 46
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 46
 ggattccagt ttagtccttt tgccatgtct 30
 55
 <210> 47
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 60
 <400> 47
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Ala Met Ser
 1 5 10
 65
 <210> 48
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 551 985 T3

<400> 48
 ggattcacct ttagtagctt tgccatgtct 30

5 <210> 49
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 49
 Lys Ala Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly

15 <210> 50
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20 <400> 50
 aaagcgagta gtggtgggag ttacacctac tatcctgaca ctgtgacggg c 51

25 <210> 51
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 51
 Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Tyr Glu Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly

35 <210> 52
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40 <400> 52
 aaaattagta gtggtgggag ttacgagtac tatcctgaca ctgtgacggg c 51

45 <210> 53
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50 <400> 53
 Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly

55 <210> 54
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

60 <400> 54
 aaaattagta gtggtgggag ttactattac tatcctgaca ctgtgacggg c 51

65 <210> 55
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

65 <400> 55

ES 2 551 985 T3

Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly
 5 <210> 56
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 56
 10 aaaattagta gtggtgggag ttggacctac tctctgaca ctgtgacggg c 51
 <210> 57
 <211> 17
 <212> PRT
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 57
 Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 20 Gly
 <210> 58
 <211> 51
 <212> ADN
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 58
 aaaattagtc cgggtgggag ttacacctac tctctgaca ctgtgacggg c 51
 30 <210> 59
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 35 <400> 59
 Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly
 40 <210> 60
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 45 <400> 60
 aaaattagtc cgggtgggag ttggacctac tctctgaca ctgtgacggg c 51
 <210> 61
 <211> 17
 50 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 61
 Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 55 Gly
 <210> 62
 <211> 51
 60 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 62
 65 aaaattagta gtggtgggag ttacacctac tctctgaca ctgtgacggg c 51
 <210> 63

ES 2 551 985 T3

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 63
 Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Phe Pro Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly

10 <210> 64
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

15 <400> 64
 aaaattagta gtggtgggag ttacacctac tttcctgaca ctgtgacggg c 51

<210> 65
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20 <400> 65

25 Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Ala
 1 5 10 15
 Gly

<210> 66
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

30 <400> 66
 aaaattagta gtggtgggag ttacacctac tatcctgaca ctgtggctgg c 51

35 <210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 67
 Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Asp Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Glv

45 <210> 68
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

50 <400> 68
 aaaattagta gtggtgggag ttacacctac tatgatgaca ctgtgacggg c 51

<210> 69
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

55 <400> 69
 Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly

60 <210> 70
 <211> 51
 <212> ADN

65

ES 2 551 985 T3

<213> Homo sapiens

<400> 70
 aaaattagta gtggtgggag ttacacctac tattctgaca ctgtgacggg c 51

5

<210> 71
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10

<400> 71
 Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Pro

15

<210> 72
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20

<400> 72
 aaaattagta gtggtgggag ttacacctac tatkctgaca ctgtgacgcc g 51

25

<210> 73
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30

<400> 73
 Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Asp Thr
 1 5 10 15
 Gly

35

<210> 74
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

40

<400> 74
 aaaattagta gtggtgggag ttacacctac tatkctgaca ctgataggg c 51

<210> 75
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45

<400> 75

50

Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly

55

<210> 76
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

60

<400> 76
 aaaattagtc cgggtgggag ttacacctac tattctgaca ctgtgacggg c 51

<210> 77
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

65

<400> 77
 Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Asp Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 5 Gly

 <210> 78
 <211> 51
 <212> ADN
 10 <213> Homo sapiens

 <400> 78
 aaaattagtc cgggtgggag ttggacctac tatgatgaca ctgtgacggg c 51

 15 <210> 79
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 20 <400> 79
 Gln Leu Trp Gly Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10

 25 <210> 80
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 30 <400> 80
 cagttatggg ggtcgtatgc tcttgactac 30

 <210> 81
 <211> 10
 <212> PRT
 35 <213> Homo sapiens

 <400> 81
 Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Thr
 1 5 10
 40
 <210> 82
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 45
 <400> 82
 cagttatggg ggtactatgc tcttgacacg 30

 <210> 83
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 50
 <400> 83
 Gln Leu Trp Gly Thr Tyr Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10
 55
 <210> 84
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 60
 <400> 84
 cagttatggg ggacttatgc tcttgactac 30
 65
 <210> 85

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 5 <400> 85
 Gln Leu Trp Gly Asn Tyr Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10
 <210> 86
 10 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo Sapiens
 <400> 86
 15 cagttatggg ggaattatgc tcttgactac 30
 <210> 87
 <210> 10
 <212> PRT
 20 <213> Homo sapiens
 <400> 87
 Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Phe
 25 1 5 10
 <210> 88
 <211> 30
 <212> ADN
 30 <213> Homo sapiens
 <400> 88
 cagttatggg ggtactatgc tcttgacttt 30
 35 <210> 89
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 40 <400> 89
 Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Ile
 1 5 10
 <210> 90
 45 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 <400> 90
 50 cagttatggg ggtactatgc tcttgacatt 30
 <210> 91
 <211> 10
 <212> PRT
 55 <213> Homo sapiens
 <400> 91
 Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10
 60 <210> 92
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens
 65 <400> 92

ES 2 551 985 T3

cagttatggg ggtactatgc tcttgactac 30

<210> 93
 <211> 106
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 93

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

20 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 94
 <211> 318
 25 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 94

30 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgtact ggtaccaaca gaaacctggc 120
 caggctccca ggctctcat ctatgacaca tccaacctgg cttctggcat cccagccagg 180
 ttcagtgcca gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcagcagcct agagcctgaa 240
 gattttgcag tttattactg ttctcagtg agtggttacc catacacgtt cggcggaggg 300
 accaaggtgg agatcaaa 318

35 <210> 95
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

40 <400> 95

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 Ser Phe
 20 25 30
 45 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Lys Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80

50 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

55 <210> 96
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

60 <400> 96

65 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt agctttgcca tgtcttgggt ccgccaggct 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtggccaaa attagtagtg gtgggagtta cacctactat 180
 cctgacactg tgacgggccc attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagacagtta 300
 tgggggtact atgctcttga ctactggggc caagggacca cggtcaccgt ctctca 357

ES 2 551 985 T3

<210> 97
 <211> 106
 5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 97
 10 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ile Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 15 Asp Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80

 20 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

 <210> 98
 25 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 98
 30 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gtgccagcat tagtgaagt tacatgtact ggtaccaaca gaaacctggc 120
 caggctccca ggctcctcat ctatgacatg tccaacctgg cttctggcat cccagccagg 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcagcagcct agagcctgaa 240
 35 gattttgcag ttattactg tatgcagtgg agtggttacc catacacggt cggcggaggg 300
 accaaggtag agatcaaa 318

 <210> 99
 40 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <400> 99
 45 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 Pro Phe
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 50 Ala Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 55 Ala Arg Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Ile Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

 <210> 100
 60 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

 <400> 100
 65

ES 2 551 985 T3

5 gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtccagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cacctttagt ccttttgcca tgtcttgggt cgcaggct 120
 ccaggaagg ggctggagtg ggtggcctaa attagtccgg gtgggagttg gacactactat 180
 tctgacactg tgacgggccc attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagacagtta 300
 tgggggtact atgctcttga catttggggc caagggacca cggtcaccgt ctcctca 357

<210> 101
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 101
 15 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Tyr Ser Val Ser Tyr Met
 20 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 20 Asp Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 25 Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Met Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 102
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 102
 35 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gtgccagcta tagtgaagt tacatgtact ggtaccaaca gaaacctggc 120
 caggtccca ggctcctcat ctatgacatg tccaacctgg cttctggcat cccagccagg 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctacca tcagcagcct agagcctgaa 240
 gattttgcag tttattactg tatgcagtgg agtggttacc catacacggt cggcggaggg 300
 40 accaaggtgg agatcaaa 318

<210> 103
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 103
 50 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 Gln Phe Ser Ser Phe
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60
 55 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 60 Ala Arg Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 104
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

ES 2 551 985 T3

<400> 104
 gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttgggtccagc ctgggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt ccagtttagt agctttgcca tgtcttgggt ccgccaggct 120
 ccaggaaggg ggctggagtg ggtggcctaaa attagtccgg gtggggagtta cacctactat 180
 5 cctgacactg tgacggggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctactgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagacagtta 300
 tgggggtact atgctcttga cttttggggc caagggacca cggtcaccgt ctctca 357

<210> 105
 <211> 23
 10 <212> PORT
 <213> Homo sapiens

<400> 105
 15 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
 20

<210> 106
 <211> 15
 20 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 106
 25 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 107
 <211> 32
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 107
 35 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 108
 <211> 10
 <212> PRT
 40 <213> Homo sapiens

<400> 108
 45 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 109
 <211> 25
 <212> PRT
 50 <213> Homo sapiens

<400> 109
 55 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
 20 25

<210> 110
 <211> 14
 <212> PRT
 60 <213> Homo sapiens

<400> 110
 65 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
 1 5 10

<210> 111
 <211> 32
 <212> PRT

ES 2 551 985 T3

<213> Homo sapiens

<400> 111

5 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 112
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 112

15 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 113
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 113

25 Glu Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Thr
 1 5 10 15
 Gly

<210> 114
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 114

35 Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr
 1 5 10

<210> 115
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 115

45 Met Asn Ser Phe Ser Thr Ser Ala Phe Gly Pro Val Ala Phe Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Leu Leu Leu Val Leu Pro Ala Ala Phe Pro Ala Pro Val Pro Pro
 20 25 30
 Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr
 35 40 45
 Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile
 50 55 60
 Ser Ala Leu Arg Lys Glu Thr Cys Asn Lys Ser Asn Met Cys Glu Ser
 65 70 75 80
 Ser Lys Glu Ala Leu Ala Glu Asn Asn Leu Asn Leu Pro Lys Met Ala
 85 90 95
 Glu Lys Asp Gly Cys Phe Gln Ser Gly Phe Asn Glu Glu Thr Cys Leu
 100 105 110
 Val Lys Ile Ile Thr Gly Leu Leu Glu Phe Glu Val Tyr Leu Glu Tyr
 115 120 125
 Leu Gln Asn Arg Phe Glu Ser Ser Glu Glu Gln Ala Arg Ala Val Gln
 130 135 140
 Met Ser Thr Lys Val Leu Ile Gln Phe Leu Gln Lys Lys Ala Lys Asn
 145 150 155 160
 Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu
 165 170 175
 Thr Lys Leu Gln Ala Gln Asn Gln Trp Leu Gln Asp Met Thr Thr His
 180 185 190
 Leu Ile Leu Arg Ser Phe Lys Glu Phe Leu Gln Ser Ser Leu Arg Ala
 195 200 205
 Leu Arg Gln Met
 210

50
 55
 60
 65

<210> 116
 <211> 106

ES 2 551 985 T3

<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 116

5
 10
 15
 20
 25
 30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105

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

<210> 117
<211> 378
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 117

25 atggaagccc cagcgcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60

30
 35
 40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115
 120
 125
 130
 135
 140
 145
 150
 155
 160
 165
 170
 175
 180
 185
 190
 195
 200
 205
 210
 215
 220
 225
 230
 235
 240
 245
 250
 255
 260
 265
 270
 275
 280
 285
 290
 295
 300
 305
 310
 315
 320
 325
 330
 335
 340
 345
 350
 355
 360
 365
 370
 375
 378

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgtact ggtaccaaca gaaacctggc 180
 caggtcctcca ggctcctcat ctatgacaca tccaacctgg cttctggcat cccagccagg 240
 ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcagcagcct agagcctgaa 300
 gattttgcag tttattactg ttctcagtggt agtggttacc catacacggt cggcggaggg 360
 accaaggtgg agatcaaa 378

<210> 118
<211> 119
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 118

40
 45
 50
 55
 60
 65
 70
 75
 80
 85
 90
 95
 100
 105
 110
 115

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

<210> 119
<211> 414
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 119

60
 65

atggagtttg gcctgagctg ggttttccct gttgctatgt tagaaggtgt ccagtgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggagcttg gtccagctg gggggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcac ctttagtagc tttgccatgt cttgggtccg ccaggctcca 180
 gggaaagggc tggagtgggt ggccaaaatt agtcccgggt ggagttacac ctactatcct 240
 gacactgtga cgggcccatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc actgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag acagttatgg 360
 ggggtactatg ctcttgacta ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 414

ES 2 551 985 T3

<210> 120
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 120

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

<210> 121
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

25

<400> 121

30 atggaagccc cagcgcagct tctcttctc ctgctactct ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgtact ggtaccaaca gaaacctggc 180
 caggctcca ggctcctcat ctatgacttc tccaacctgg cttctggcat cccagccagg 240
 ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcagcagcct agagcctgaa 300
 gattttgcag ttattactg tatgcagtgg agtgggttacc catacacggt cggcggaggg 360
 accaaggtgg agatcaaa 378

<210> 122
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35

<400> 122

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

<210> 123
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

55

<400> 123

60

65 atggagtttg gcctgagctg ggttttctct gttgctattt tagaaggtgt ccagtgtgag 60
 gtgcagctgg tggagcttgg gggaggcttg gtcagcctg ggggtccct gagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcca gtttagtccc tttgccatgt ctgggtccg ccaggctcca 180
 gggaaagggg tggagtgggt ggccaaaatt agtcccgtg ggagttggac ctactatagc 240
 gacactgtga cgggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc actgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgcgag acagttatgg 360
 gggactatg ctcttgacat ttggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 414

ES 2 551 985 T3

<210> 124
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 124

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

<210> 125
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 125

atggaagccc cagcgcagct tctcttctc ctgtactctt ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctcctgca gtgccagcat tagtgaagt tacatgtact ggtaccaaca gaaacctggc 180
 caggctccca ggctcctcat ctatgacatg tccaacctgg cttctggcat cccagccagg 240
 ttcagtggca gtgggtctgg gacagacttc actctcacca tcagcagcct agagcctgaa 300
 gattttgcag tttattactg tatgcagtgg agtgggtacc catacacggt cggcgggagg 360
 accaaggtgg agatcaaaa 378

<210> 126
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 126

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

<210> 127
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 127

atggagtttg gcttgagctg ggttttcctt gttgetattt tagaaggtgt ccagtgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtccagcctg gggggctccct gagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcca gtttagtagc tttgcatgt cttgggtccg ccaggctcca 180
 ggaagggggc tggagtgggt ggccaaaatt agtcccgggt ggagttacac ctactatagc 240
 gacactgtga cgggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc actgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagc acagttatgg 360
 gggactatag ctcttgacat ttggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 414

ES 2 551 985 T3

<210> 128
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 128
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Tyr Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Phe Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
 65 70 75 80
 Asp Phe Ala Val Tyr Cys Met Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 85 90 95
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

10

15

<210> 129
 <211> 378
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

20

<400> 129
 atggaagccc cagcgcagct tctcttctc ctgtactct ggctcccaga taccaccgga 60
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 120
 ctctctcgca gtgccagcta cagtgtaatg tacatgtact ggtaccaaca gaaacctggc 180
 caggctccca ggctcctcat ctatgacttc tccaacctgg cttctggcat cccagccagg 240
 ttcagtggca gtgggtctgg gacagactc actctcacca tcagcagcct agagcctgaa 300
 gattttgcag tttattactg tatgcagtggt agtgggttacc catacacggt cggcggaggg 360
 accaaggtgg agatcaaa 378

25

30

<210> 130
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

35

<400> 130
 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 Gln Phe Ser Pro Phe
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Lys Ile Ser Pro Gly Gly Ser Trp Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Asp
 50 55 60
 Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

40

45

50

<210> 131
 <211> 414
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

55

<400> 131
 atggagtttg gcttgagctg ggttttcctt gttgctatth tagaaggtgt ccagtgtgag 60
 gtgcagctgg tggagtctgg gggaggcttg gtccagcctg gggggtcctt gagactctcc 120
 tgtgcagcct ctggattcca gtttagtccc tttgccatgt cttgggtccg ccaggctcca 180
 gggaaggggc tggagtgggt ggccaaaatt agtcccgggt ggagttggac ctactatcct 240
 gacactgaca cgggccgatt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc actgtatctg 300
 caaatgaaca gcctgagagc cgaggacacg gctgtgtatt actgtgagag acagttatgg 360
 ggggtactatg ctcttgactt ctggggccaa gggaccacgg tcaccgtctc ctca 414

60

65

- <210> 132
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 5
- <220>
 <221> Incierto
 <222> (2) (3) (4) (5) (7)
 <223> Donde Xaa puede ser cualquiera de los aminoácidos que se producen de forma natural.
- 10
- <400> 132
- Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Val Xaa Tyr Met Tyr
 1 5 10
- 15
- <210> 133
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 20
- <220>
 <221> Incierto
 <222> (2) (4) (6)
 <223> Donde Xaa puede ser cualquiera de los veinte aminoácidos que se producen de forma natural.
- 25
- <400> 133
- Asp Xaa Ser Xaa Leu Xaa Ser
 1 5
- 30
- <210> 134
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 35
- <220>
 <221> Incierto
 <222> (1)(2)
 <223> Donde Xaa puede ser cualquiera de los veinte aminoácidos que se producen de forma natural.
 <400> 134
- 40
- Xaa Xaa Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 1 5
- <210> 135
 <211> 10
 <212> PRT
- 45
- <213> Homo sapiens
- <220>
 <221> Incierto
 <222> (3)(4)(6)(9)
 <223> Donde Xaa puede ser cualquiera de los veinte aminoácidos que se producen de forma natural.
- 50
- <400> 135
- Gly Phe Xaa Xaa Ser Xaa Phe Ala Xaa Ser
 1 5 10
- 55
- <210> 136
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
- 60
- <220>
 <221> Incierto
 <222> (2)(4)(8)(9)(11)(12)(15)(16)(17)
 <223> Donde Xaa puede ser cualquiera de los veinte aminoácidos que se producen de forma natural.
- 65
- <400> 136

ES 2 551 985 T3

Lys Xaa Ser Xaa Gly Gly Ser Xaa Xaa Tyr Xaa Xaa Asp Thr Xaa Xaa
 1 5 10 15
 Xaa

5 <210> 137
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <220>
 <221> Incierto
 <222> (5)(10)
 <223> Donde Xaa puede ser cualquiera de los veinte aminoácidos que se producen de forma natural.

15 <400> 137
 Gln Leu Trp Gly Xaa Tyr Ala Leu Asp Xaa
 1 5 10

20 <210> 138
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 138
 Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo IL-6 aislado que incluye:
- 5 (i) Una secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera con N° DE ID DE SEC: 101 y una secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada con N° DE ID DE SEC: 103;
- (ii) Una secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera con N° DE ID DE SEC: 124 y una secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada con N° DE ID DE SEC: 126;
- 10 (iii) Una secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera con N° DE ID DE SEC: 116 y una secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada con N° DE ID DE SEC: 118;
- (iv) Una secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera con N° DE ID DE SEC: 120 y una secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada con N° DE ID DE SEC: 122;
- (v) Una secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera con N° DE ID DE SEC: 128 y una secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada con N° DE ID DE SEC: 130; o
- 15 (vi) una secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera con N° DE ID DE SEC: 97 y una secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada con N° DE ID DE SEC: 99.
2. El anticuerpo IL-6 de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo modula por lo menos una actividad de por lo menos un polipéptido IL-6.
- 20 3. El anticuerpo IL-6 de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde dicho anticuerpo tiene un valor EC50 de aproximadamente $2,7 \times 10^{-11}$ M o menos.
4. El anticuerpo IL-6 de acuerdo con la reivindicación 3, donde el valor de EC50 es de aproximadamente $2,7 \times 10^{-12}$ o menos.
- 25 5. Una molécula de ácido nucleico aislado que codifique por lo menos un anticuerpo aislado IL-6 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
6. Un vector de ácido nucleico aislado que incluya la molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 5.
- 30 7. Una célula hospedadora procariótica o eucariota que incluya la molécula de ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 5.
- 35 8. La célula hospedadora de acuerdo con la reivindicación 7, donde dicha célula hospedadora es por lo menos uno de los siguientes: células COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, de mieloma, de linfoma o cualquier célula derivada, inmortalizada o transformada a partir de ellos.
- 40 9. Un método para la producción de por lo menos un anticuerpo IL-6, que incluye la traslación de la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 5 en condiciones in vitro, in vivo o in situ en no humanos de forma que el anticuerpo IL-6 se expresa en cantidades detectables o recuperables.
10. Un compuesto que incluye por lo menos un anticuerpo IL-6 aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 y por lo menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 45 11. El compuesto de acuerdo con la reivindicación 10, incluido también por lo menos un compuesto o polipéptido seleccionado a partir de un marcador o indicador detectable, un antagonista TNF, un medicamento antiinfeccioso, un medicamento del sistema cardiovascular (CV), un medicamento del sistema nervioso central (CNS), un medicamento del sistema nervioso autónomo (ANS), un medicamento del tracto respiratorio, un medicamento del tracto gastrointestinal (GI), un medicamento hormonal, un medicamento para el equilibrio de fluidos o electrolito, un medicamento hematológico, un antineoplásico, un medicamento de inmunomodulación, un medicamento oftálmico, ótico o nasal, un medicamento tópico, un medicamento nutricional, una citoquina y un antagonista de citoquina.
- 50 12. Un compuesto que incluye por lo menos un anticuerpo IL-6 aislado de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en terapia.
- 55 13. Un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4 para su uso en un método para el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad relacionada con IL-6 en una célula, tejido, órgano o animal, donde la enfermedad relacionada con IL-6 se selecciona a partir del grupo que consta de obesidad, enfermedad de tipo inmune, enfermedad cardiovascular, enfermedad infecciosa, o una enfermedad maligna y enfermedad neurológica.
- 60

- 5 14. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13, donde la enfermedad relacionada con IL-6 se selecciona a partir del grupo que consta de artritis reumatoide, osteoartritis, osteolisis, aflojamiento aséptico de implantes ortopédicos, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso cutáneo, nefritis lúpica, diabetes melitus tipo 2, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y carcinoma de célula renal.
- 10 15. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13, donde dicha cantidad eficaz es de aproximadamente 0,001-50 mg/kilogramo de dichas células, tejidos, órganos o animales.
- 15 16. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13, donde la vía de contacto o administración es por lo menos un modo seleccionado entre los siguientes: parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraosteal, intrapélvico, intrapericardiaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, intralesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmico.
- 20 17. El anticuerpo de acuerdo con la reivindicación 13, que también incluye la administración, previamente, simultánea o tras dicho contacto o administración, de por lo menos un compuesto que incluye una cantidad eficaz de por lo menos un compuesto o polipéptido seleccionado a partir de un marcador o indicador detectable, un medicamento anti-infeccioso, un medicamento del sistema cardiovascular (CV), un medicamento del sistema nervioso central (CNS), un medicamento del sistema nervioso autónomo (ANS), un medicamento del tracto respiratorio, un medicamento del tracto gastrointestinal (GI), un medicamento hormonal, un medicamento para el equilibrio de fluidos o electrolito, un medicamento hematológico, un antineoplásico, un medicamento de inmunomodulación, un medicamento oftálmico, ótico o nasal, un medicamento tópico, un medicamento nutricional, una citoquina y un antagonista de citoquina.
- 25 18. Un instrumento médico, que incluye un anticuerpo IL-6 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, donde dicho instrumento es adecuado para el contacto o la administración de dicho anticuerpo IL-6 por medio de por lo menos una de las siguientes vías: parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraosteal, intrapélvica, intrapericardiaca, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, intralesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmica.
- 30 19. Un artículo manufacturado para uso farmacéutico o diagnóstico, que incluye material de empaquetado y un envase que incluye una solución o forma liofilizada de un anticuerpo IL-6 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4.
- 35 20. El artículo manufacturado de la reivindicación 19, donde dicho envase es un elemento de un instrumento o sistema de administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intrarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitaria, intracelular, intracerebelar, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraosteal, intrapélvica, intrapericardiaca, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, intralesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmica.
- 40 21. El anticuerpo IL-6 aislado de acuerdo con la reivindicación 1, que incluya una secuencia de aminoácido de región variable de cadena ligera codificada por una de las secuencias de nucleótido de las SECS CON N° DE ID: 98, 102, 117, 121, 125 y 129 y una secuencia de aminoácido de región variable de cadena pesada codificada por una de las secuencias de nucleótido con N° DE ID DE SECS: 100, 104, 119, 123, 127 y 131.
- 45
- 50
- 55
- 60

FIG 1

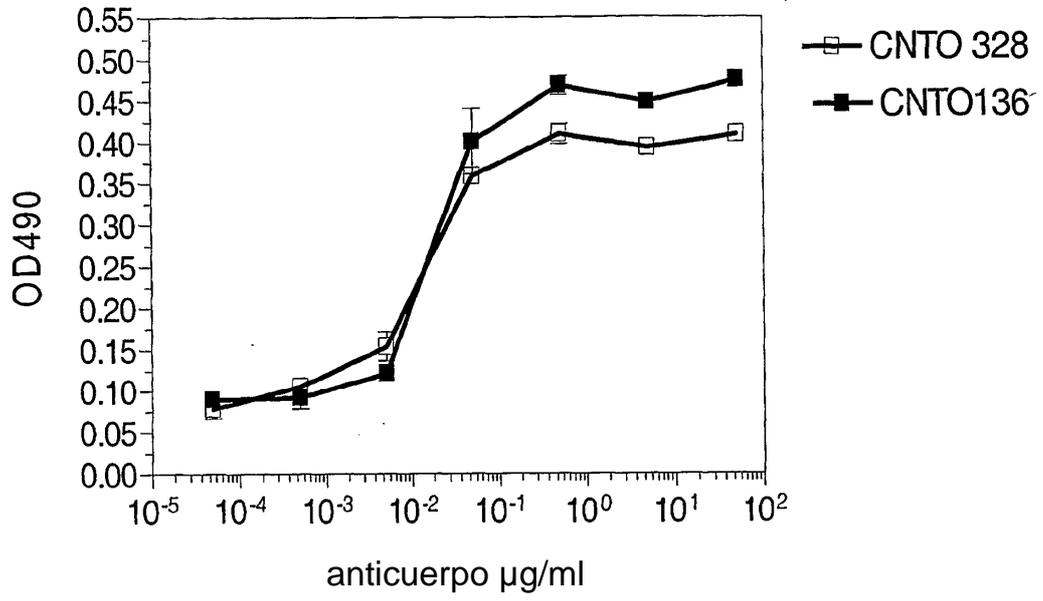
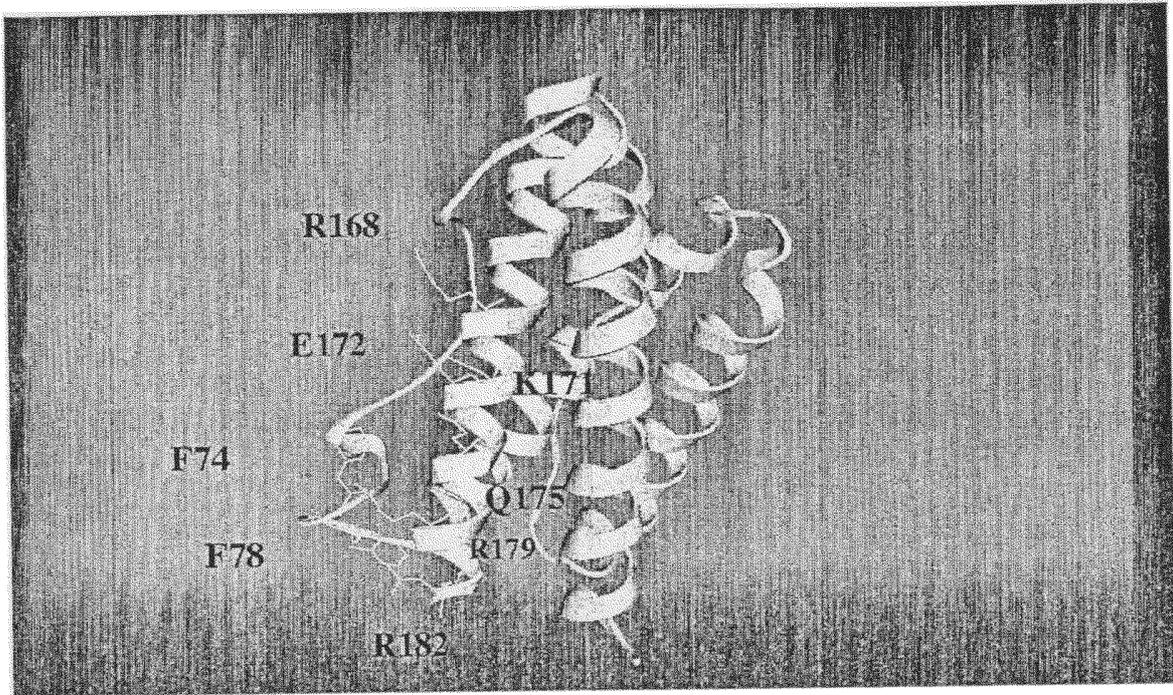


FIG 2



¹⁶⁸**RSFKEFLQSSLRALRQM**₁₈₄

FIG 3

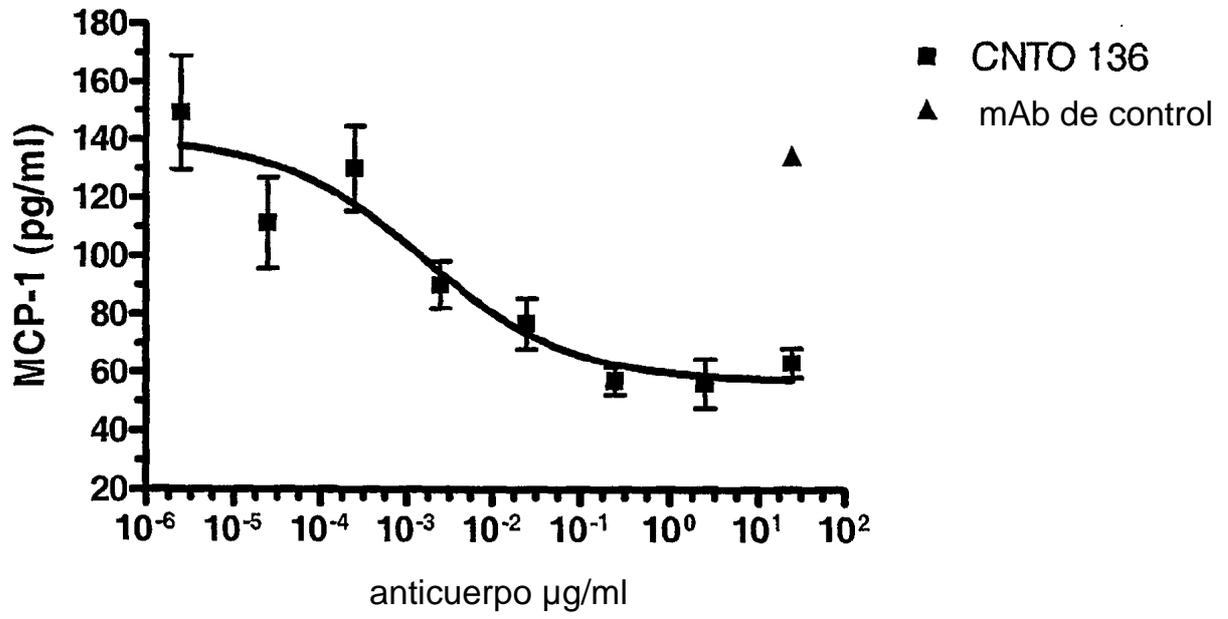


FIG. 4

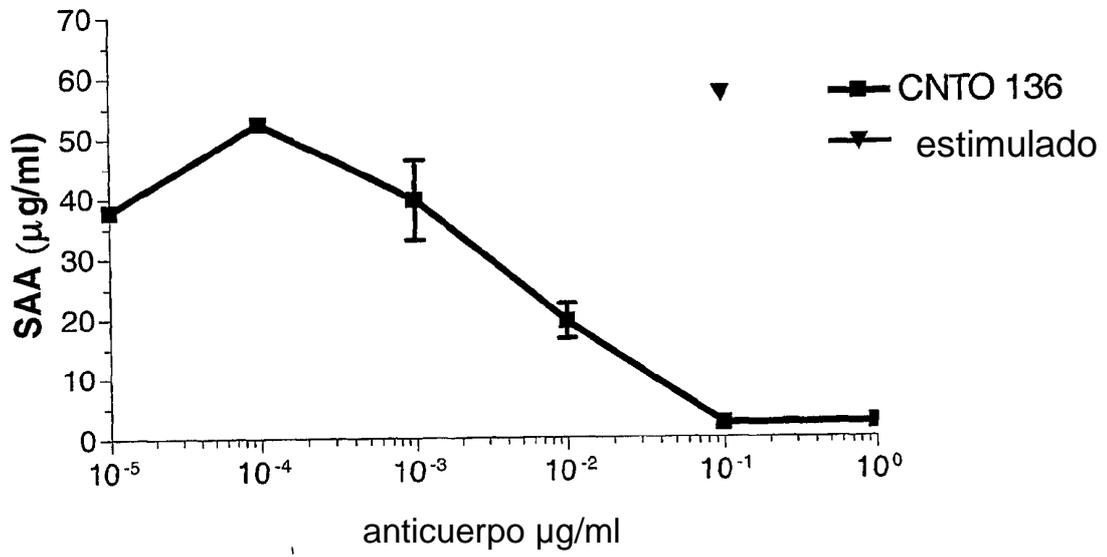


FIG. 5

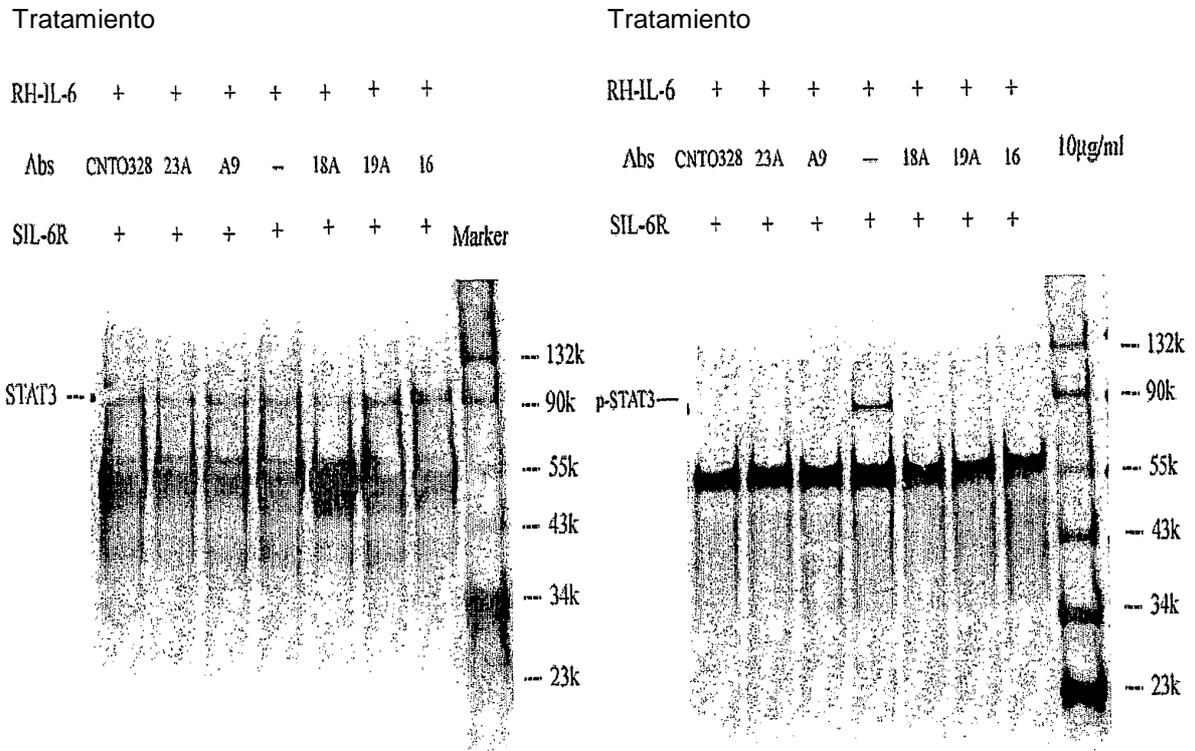


FIG. 6

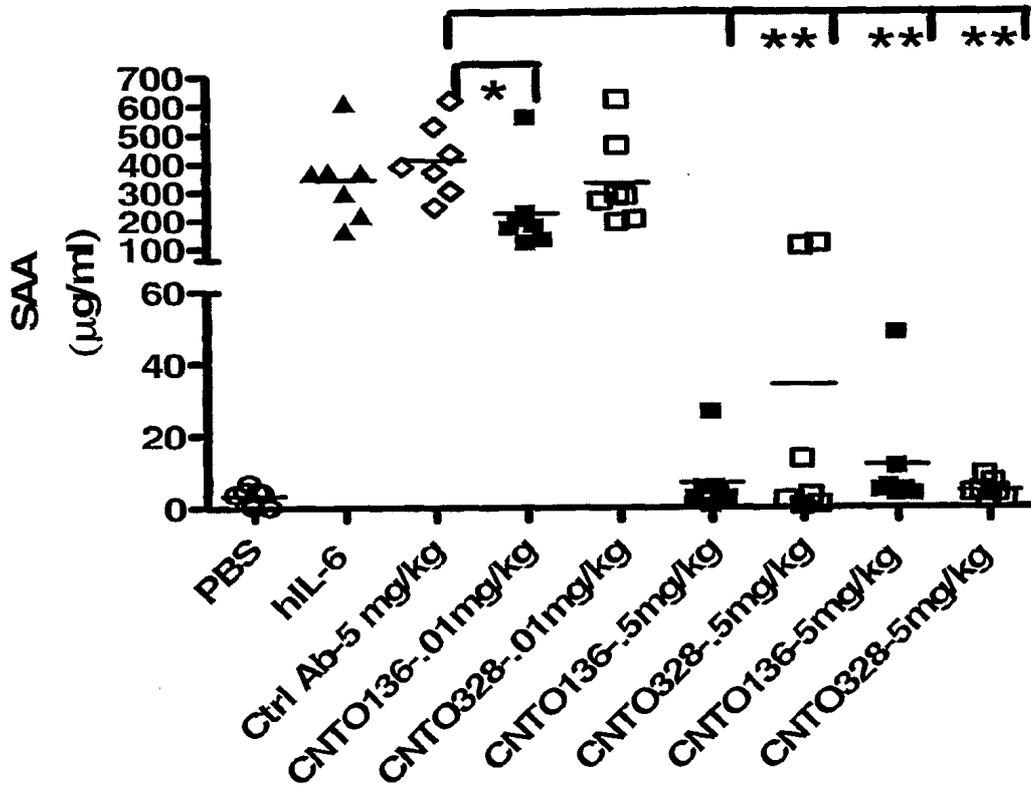


FIG. 7

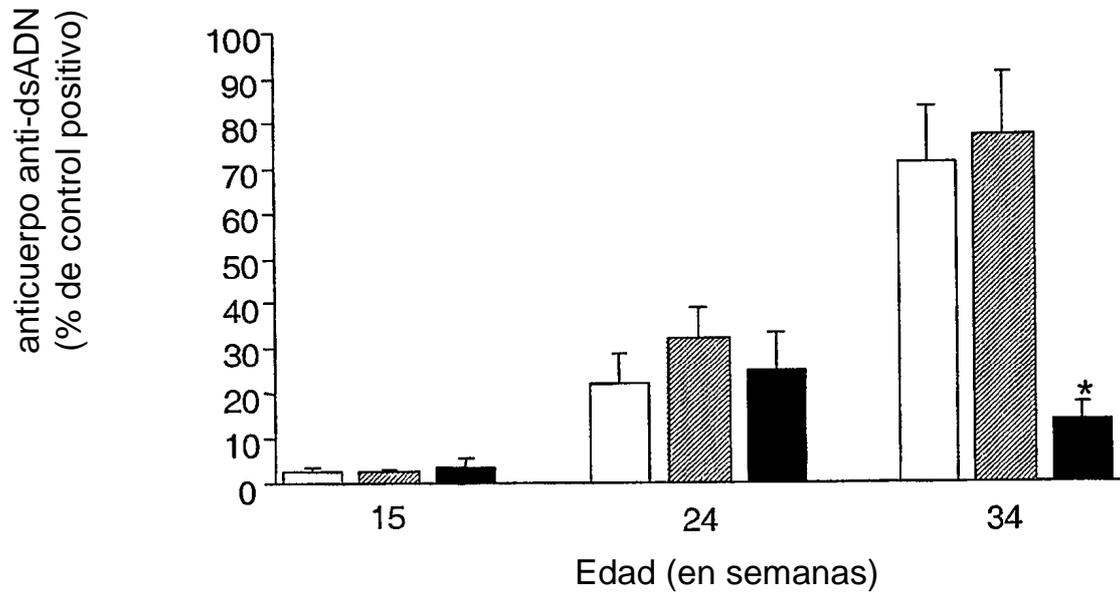


FIG. 8

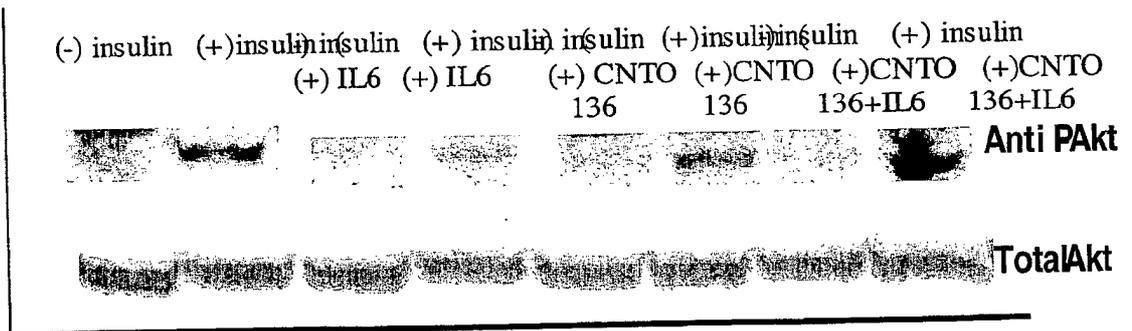
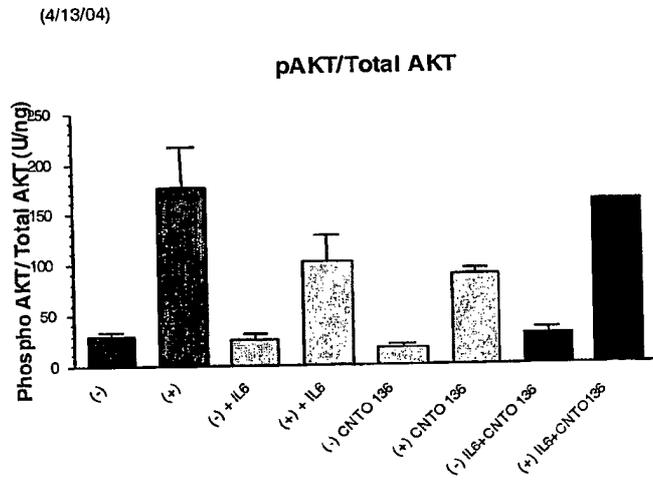


FIG. 9

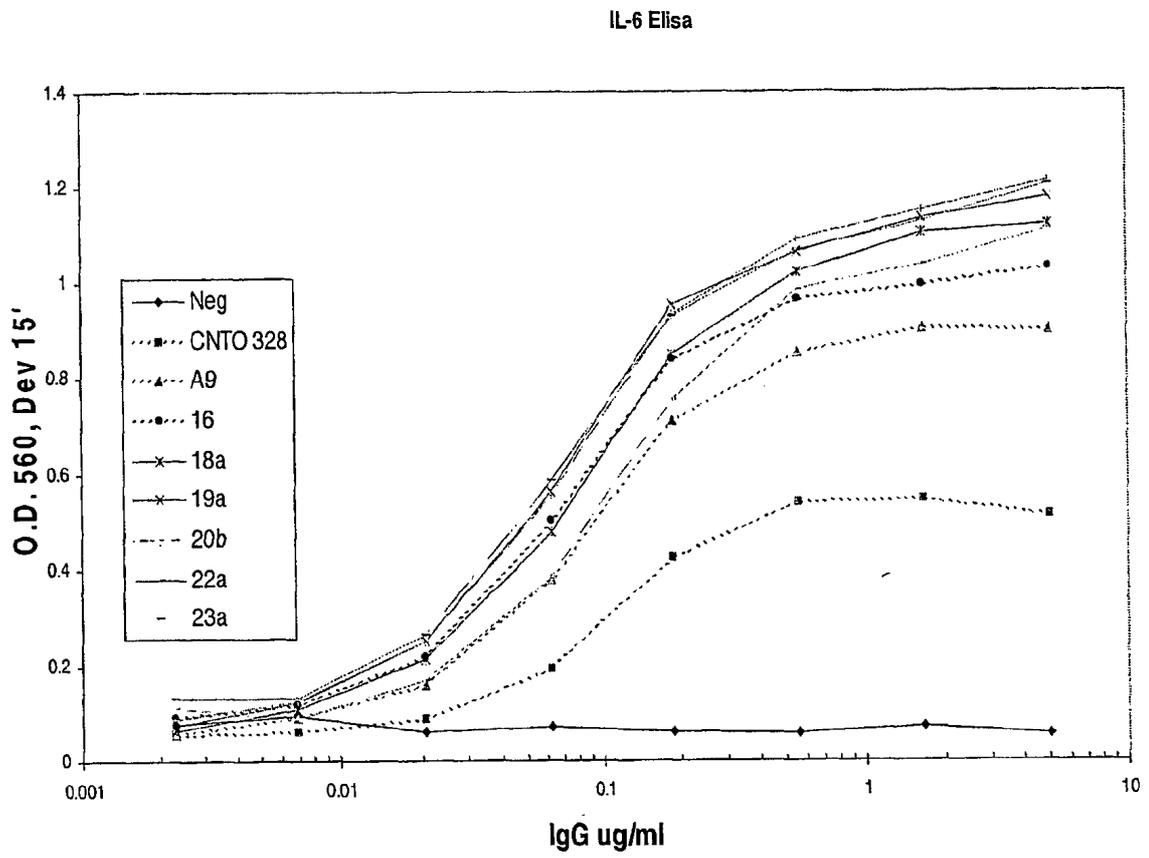


FIG. 10

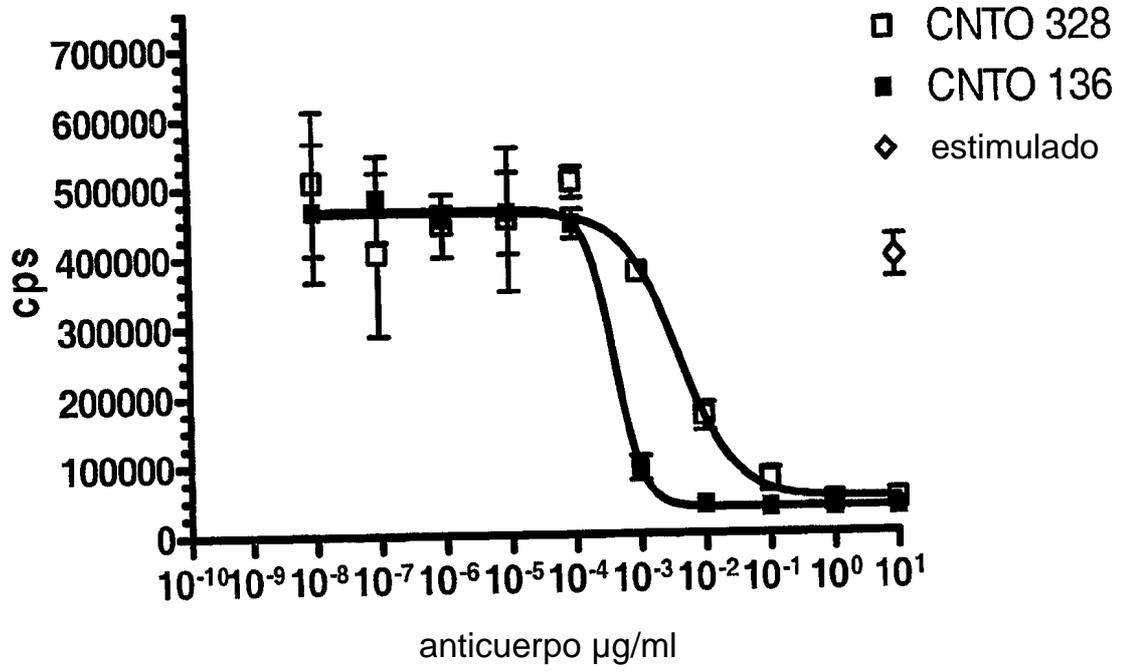
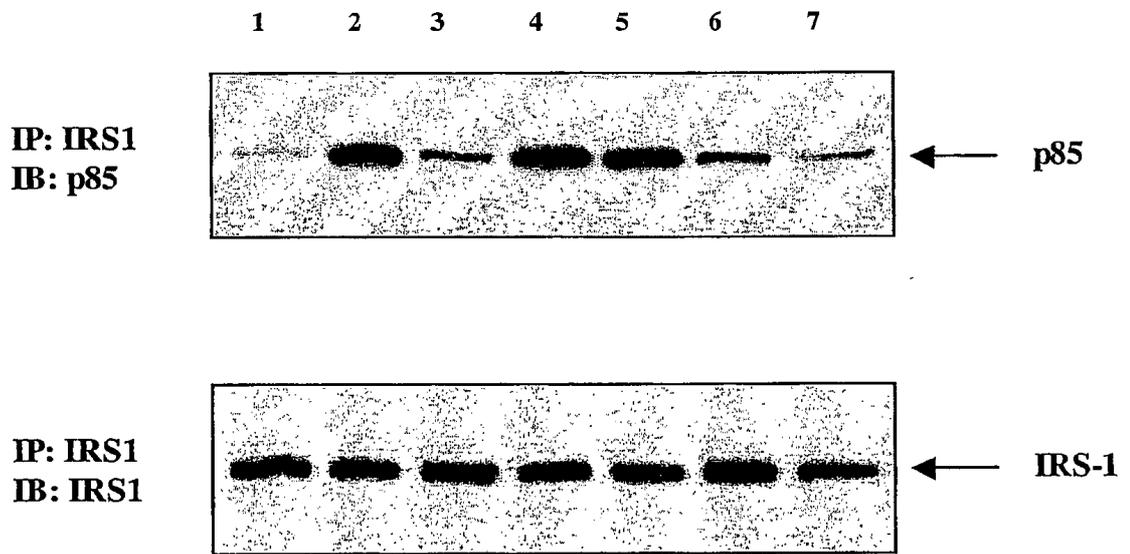


FIG. 11



1	control
2	insulina
3	insulina + IL6
4	insulina + IL6 + IL6 mAb
5	insulina + IL6 mAb
6	IL6
7	IL6 mAb

Efecto de IL-6 sobre la fosforilación de IR
 FIG. 12A

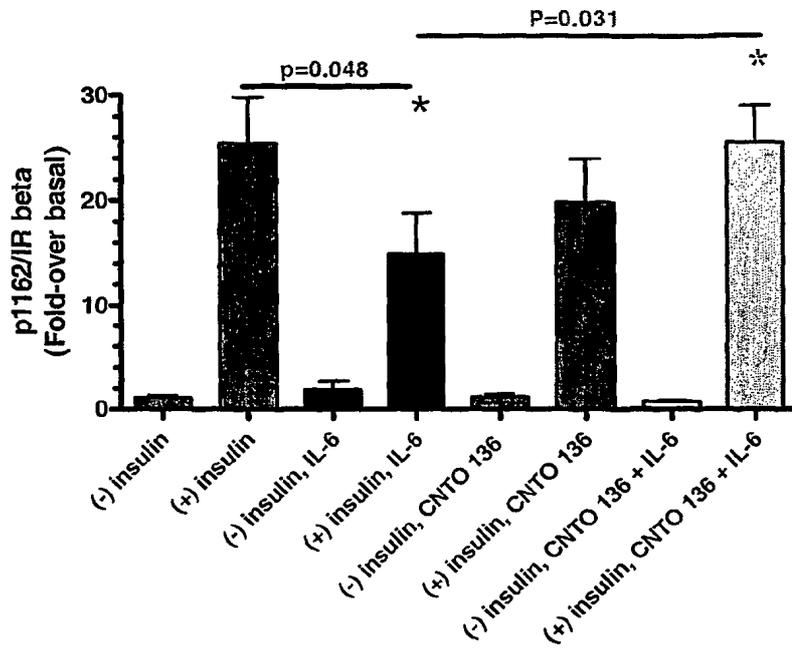
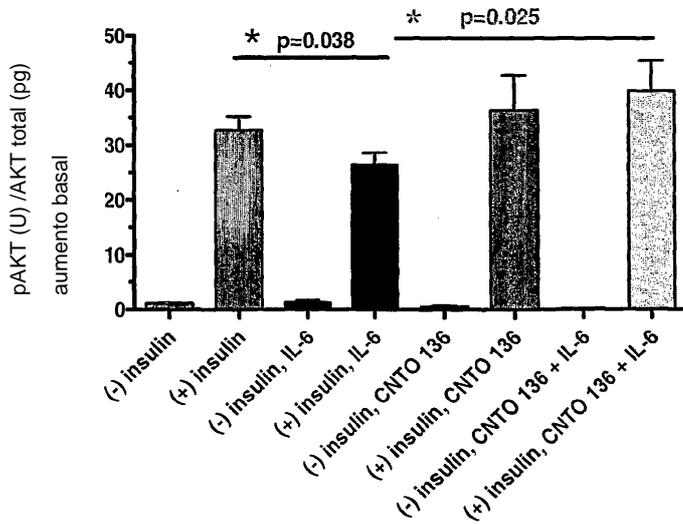
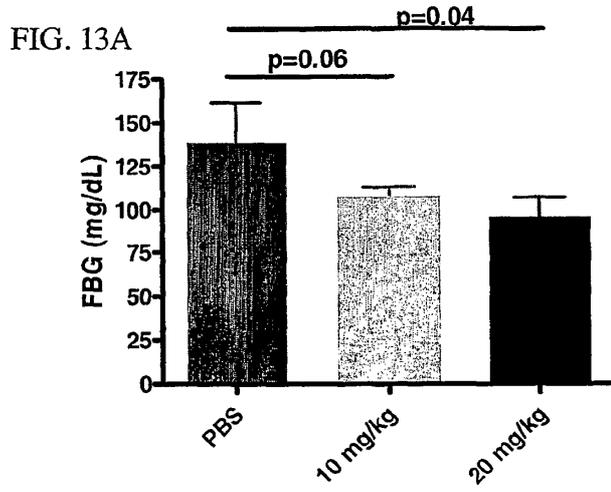


FIG. 12B
 Efecto de IL-6 sobre la fosforilación de AKT



Glucosa



Insulina

FIG. 13B

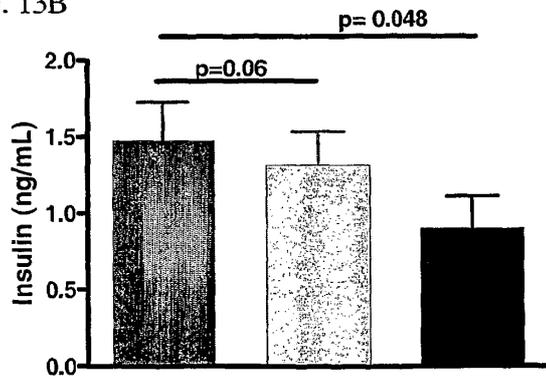


FIG. 13C

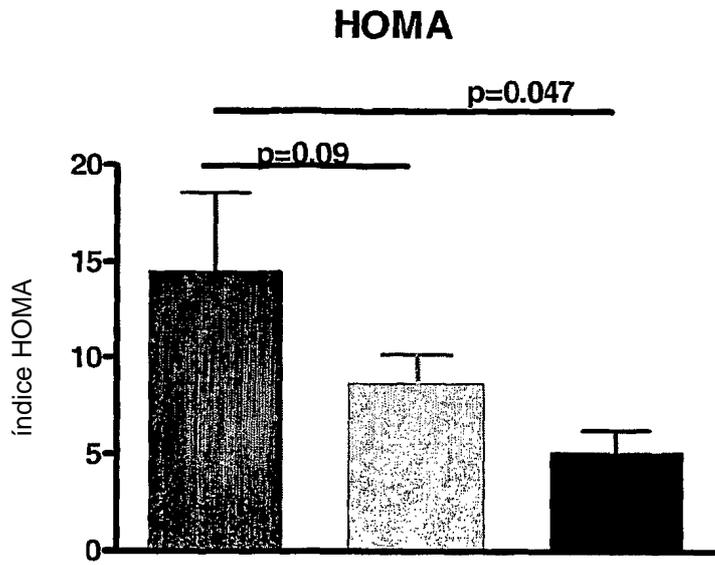


FIG. 14A

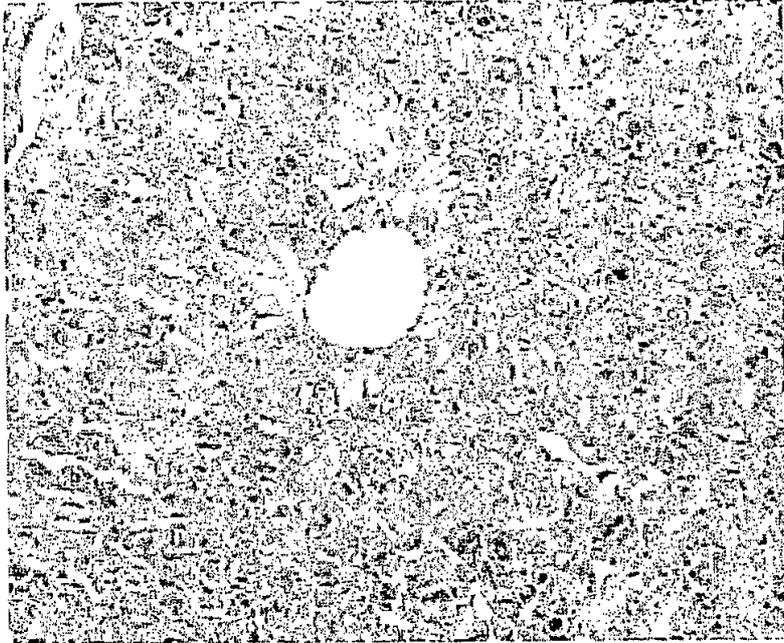


FIG. 14B

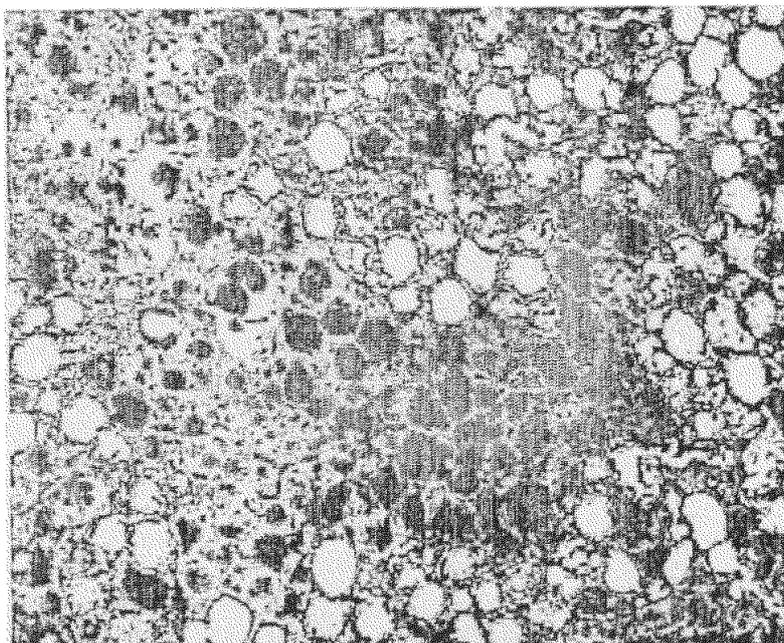


FIG. 14C

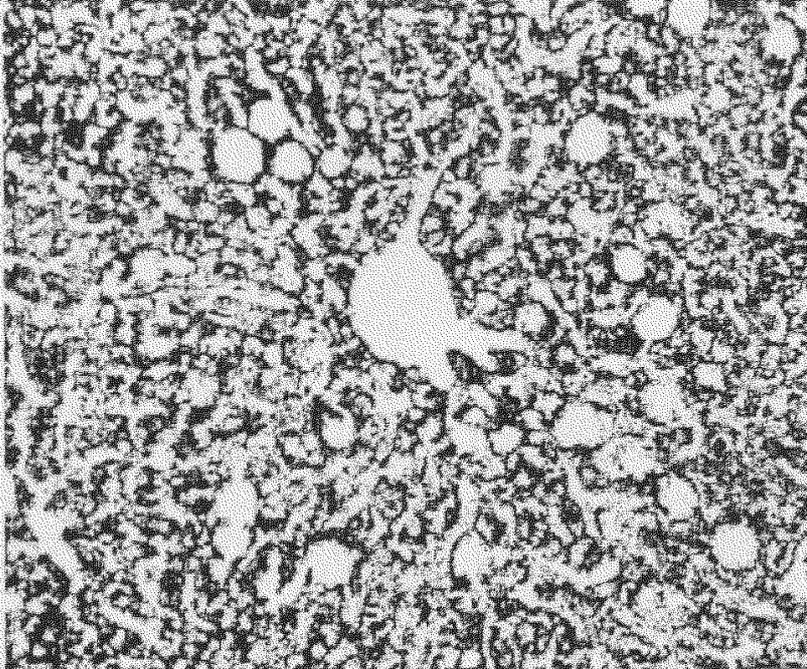


FIG. 14D

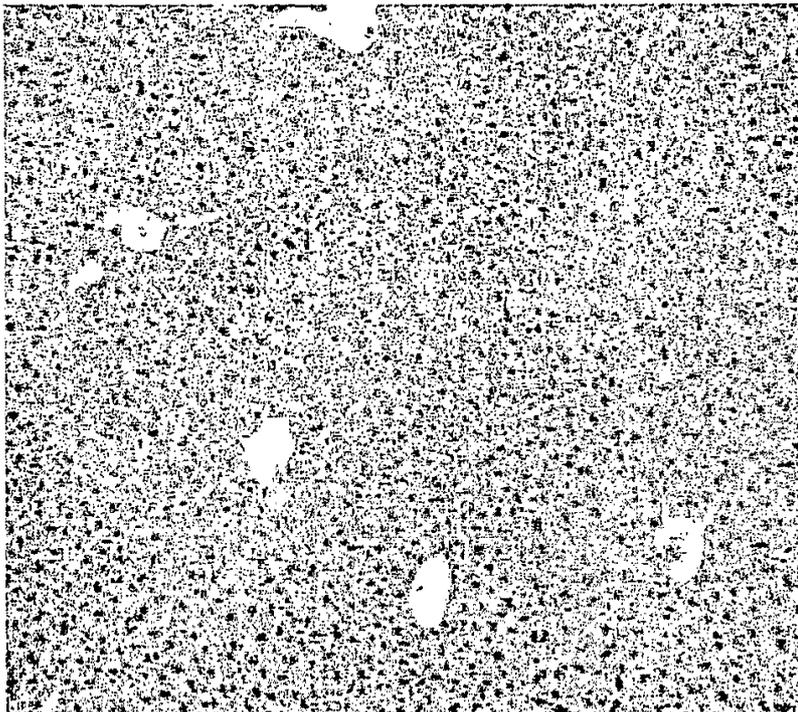


FIG. 14E

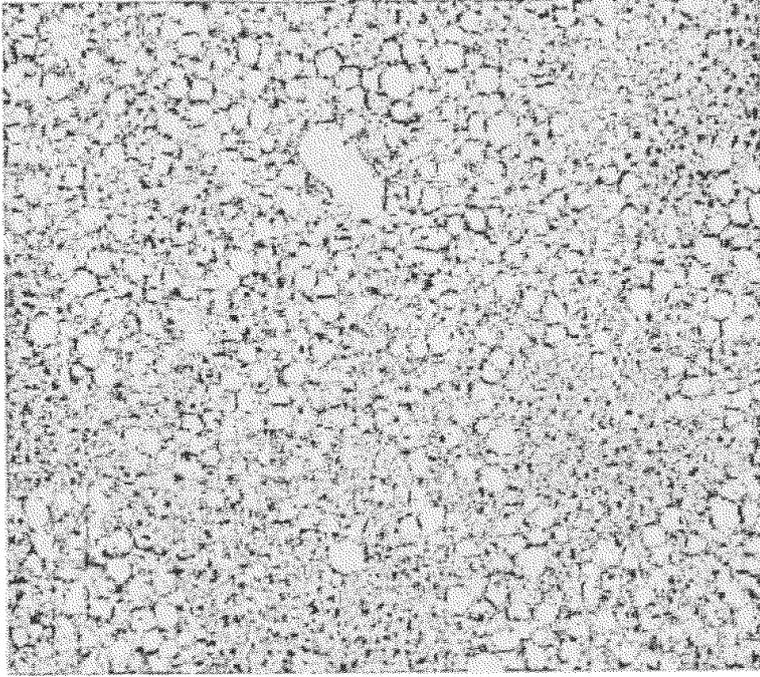


FIG. 14F

