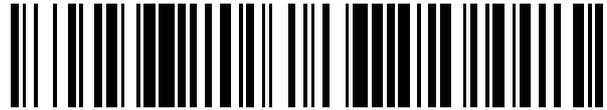


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 635**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/24** (2006.01)

**C12P 21/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.05.2009 E 09747432 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.01.2016 EP 2297202**

54 Título: **Anticuerpos anti-IL-6/IL-6R y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

**25.09.2008 US 194156**

**13.05.2008 US 127403**

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

**28.03.2016**

73 Titular/es:

**NOVIMMUNE SA (100.0%)  
14 ch. Des Aulx, Plan-Les Ouates  
1228 Geneva, CH**

72 Inventor/es:

**FERLIN, WALTER;  
KOSCO-VILBOIS, MARIE;  
ELSON, GREG;  
LEGER, OLIVIER y  
GUILHOT, FLORENCE**

74 Agente/Representante:

**SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro**

**ES 2 564 635 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/IL-6R y métodos de uso de los mismos

5 **Solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica las ventajas de la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/127.403, presentada el 13 de mayo de 2008, y la Solicitud Provisional de Estados Unidos N° 61/194.156, presentada el 25 de septiembre de 2008.

10

**Campo de la invención**

La presente invención se refiere por lo general a la generación de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, anticuerpos monoclonales totalmente humanos, que reconocen el complejo IL-6/IL-6R, a anticuerpos monoclonales, por ejemplo, anticuerpos totalmente humanos que reconocen tanto al complejo IL-6/IL-6R como a IL-6R, y a métodos de uso de los anticuerpos monoclonales como agentes terapéuticos.

15

Kalai *et al.*, Eur. J. Biochem. 249, 690-700 y Gaillard *et al.*, Immunology, 1996, 89, 135-141, describen anticuerpos murinos que se unen al complejo receptor IL6/IL6.

20

**Antecedentes de la invención**

La interleucina 6 (IL-6) es una potente citoquina pleiotrópica que regula el crecimiento y la diferenciación celular y también es un mediador importante de respuestas inflamatorias agudas. La IL-6 presenta su acción a través de un complejo receptor que consiste en un receptor de IL-6 específico (IL-6R) y una subunidad de transducción de señales (gp130). La señalización de IL-6 desregulada se ha visto implicada en la patogénesis de muchas enfermedades, tales como mieloma múltiple, enfermedades autoinmunitarias y cáncer de próstata. Por consiguiente, existe una necesidad de terapias que neutralicen las actividades biológicas de IL-6 y/o IL-6R.

25

30 **Sumario de la invención**

La presente divulgación proporciona anticuerpos monoclonales tales como anticuerpos monoclonales totalmente humanos que reconocen la Interleucina-6 ("IL-6") humana unida a membrana cuando forma complejos con el receptor de IL-6 humano (es decir, el complejo IL-6/IL-6R humano ("IL-6Rc") (es decir, IL-6Rc expresado en la superficie celular o en forma soluble). Los anticuerpos de la invención son capaces de modular, por ejemplo, bloqueo, inhibición, reducción, antagonismo, neutralización o interferencia de otro modo con la señalización intracelular de IL-6R a través de activación de la ruta de JAK/STAT y cascada de MAPK. Los anticuerpos de la invención también incluyen anticuerpos que se unen a la IL-6Rc soluble. Además, los anticuerpos de la invención incluyen anticuerpos que se unen a IL-6Rc, en la que también se unen a IL-6R sola (es decir, cuando no forman complejos con IL-6). La invención, tal como se define con las reivindicaciones, se refiere a anticuerpos humanos que se unen a la IL6R humana y al complejo IL6/IL6R.

35

40

El problema a resolver con la presente invención es la generación de anticuerpos que se unen al complejo formado por IL-6R y IL-6 para evitar de este modo la unión del complejo IL-6/IL-6R ("IL-6Rc") a la glicoproteína gp130 transmembrana y posterior señalización (tanto cis como trans), que se activa con el complejo de señalización IL-6Rc/gp130.

45

Los anticuerpos de la invención modulan, por ejemplo, bloquean, inhiben, reducen, antagonizan, neutralizan o de otro modo interfieren con, la interacción entre la IL-6Rc y gp130. La unión de IL-6 y IL-6R para formar el complejo IL-6Rc permite que la IL-6Rc interactúe o de otro modo se asocie con gp130, una glicoproteína transmembrana. En particular, la unión de IL-6 a IL-6R conduce a la homodimerización de gp130 unida por disulfuro dentro de una célula, que a su vez, conduce a la activación de una tirosina quinasa como la primera etapa en la transducción de señales. En una realización preferente, los anticuerpos de la invención se unen a IL-6Rc y bloquean o de otro modo inhiben la interacción de IL-6Rc con gp130, evitando de este modo, de forma parcial o completa, la homodimerización de gp130 y la señalización posterior (cis y trans).

50

55

A diferencia de algunos anticuerpos que se unen a IL-6 o IL-6R de forma individual, por ejemplo, en la hendidura en la que IL-6 se une a IL-6R, los anticuerpos de la invención no presentan ni interfieren de otro modo con la interacción entre IL-6 e IL-6R para formar el complejo IL-6Rc. Por lo tanto, los anticuerpos de la invención se usan en concentraciones que son significativamente menores que las concentraciones necesarias para los anticuerpos que bloquean o de otro modo interfieren con la interacción entre IL-6R e IL-6, por ejemplo, anticuerpos que compiten con IL-6 por la unión a IL-6R o viceversa. En algunas realizaciones, la concentración de los anticuerpos de la invención es 50-100 veces menor que la concentración necesaria para un anticuerpo que bloquea o de otro modo interfiere con la interacción entre IL-6 e IL-6R. Para anticuerpos que bloquean o de otro modo interfieren con la interacción entre IL-6 e IL-6R, se debe usar una concentración grande, por ejemplo, para tratar la inflamación, en la que los niveles de IL-6R aumentan y/o la expresión de IL-6 aumenta. Para competir de forma eficaz y durante un periodo

60

65

prolongado con el aumento de los niveles de IL-6 y/o IL-6R, estos anticuerpos que bloquean o de otro modo interfieren con la interacción entre IL-6 e IL-6R deben estar presentes en concentraciones grandes.

Los anticuerpos monoclonales de la invención incluyen, por ejemplo, el anticuerpo 39B9 VL1, el anticuerpo 12A y el anticuerpo 5C. En el presente documento, estos anticuerpos se denominan respectivamente anticuerpos "hull-6Rc". Algunos anticuerpos hull-6Rc incluyen anticuerpos monoclonales totalmente humanos. Estos anticuerpos muestran especificidad para la IL-6Rc y IL-6R humanas, y se ha mostrado que modulan, por ejemplo, bloquean, inhiben, reducen, antagonizan, neutralizan o de otro modo interfieren con la señalización intracelular mediada por IL-6Rc (señalización cis y/o trans).

Los anticuerpos totalmente humanos de la divulgación incluyen (i) la secuencia de aminoácidos consenso QQSXSYP(LT) (SEC ID N°: 42) en la región 3 determinante de la complementariedad de cadena ligera (CDR3), en la que X es N o Q; (ii) la secuencia de aminoácidos consenso GIIPX<sub>1</sub>FX<sub>2</sub>TTKYAQX<sub>3</sub>FQG (SEC ID N°: 43) en la región 2 determinante de la complementariedad de cadena pesada (CDR2), en la que X<sub>1</sub> es L o A, X<sub>2</sub> es D o E, y X<sub>3</sub> es Q o K; (iii) la secuencia de aminoácidos consenso DRDILTDYYPXGGMDV (SEC ID N°: 44) en la región 3 determinante de la complementariedad de cadena pesada (CDR3), en la que X es M o L; y (iv) la secuencia de aminoácidos consenso TAVXYCAR (SEC ID N°: 45) en la región 3 marco conservada (FRW3), en la que X es F o Y.

Por ejemplo, en una de las realizaciones preferentes, el anticuerpo hull-6Rc incluye la secuencia de aminoácidos QQSNSYPLT (SEC ID N°: 26) en la región CDR3 de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos GIIP(L)FDTTKYAQKFQG (SEC ID N°: 33) en la región CDR2 de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos DRDILTDYYPLGGMDV (SEC ID N°: 36) en la región CDR3 de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos TAVYYCAR (SEC ID N°: 39) en la región FRW3. En el presente documento este anticuerpo se denomina anticuerpo NI-1201A.

El anticuerpo hull-6Rc incluye la secuencia de aminoácidos QQSNSYPLT (SEC ID N°: 26) en la región CDR3 de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos GIIP(L)FDTTKYAQKFQG (SEC ID N°: 33) en la región CDR2 de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos DRDILTDYYPLGGMDV (SEC ID N°: 37) en la región CDR3 de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos TAVYYCAR (SEC ID N°: 39) en la región FRW3. En el presente documento este anticuerpo se denomina anticuerpo NI-1201B.

El anticuerpo hull-6Rc incluye la secuencia de aminoácidos QQSNSYPLT (SEC ID N°: 26) en la región CDR3 de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos GIIPAFETTKYAQKFQG (SEC ID N°: 34) en la región CDR2 de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos DRDILTDYYPLGGMDV (SEC ID N°: 37) en la región CDR3 de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos TAVYYCAR (SEC ID N°: 39) en la región FRW3. En el presente documento este anticuerpo se denomina anticuerpo NI-1201C.

El anticuerpo hull-6Rc incluye la secuencia de aminoácidos QQSQSYPLT (SEC ID N°: 32) en la región CDR3 de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos GIIPAFETTKYAQKFQG (SEC ID N°: 34) en la región CDR2 de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos DRDILTDYYPLGGMDV (SEC ID N°: 37) en la región CDR3 de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos TAVYYCAR (SEC ID N°: 39) en la región FRW3. En el presente documento este anticuerpo se denomina anticuerpo NI-1201D.

El anticuerpo hull-6Rc incluye la secuencia de aminoácidos QQSNSYPLT (SEC ID N°: 26) en la región CDR3 de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos GIIP(L)FDTTKYAQKFQG (SEC ID N°: 16) en la región CDR2 de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos DRDILTDYYPLGGMDV (SEC ID N°: 36) en la región CDR3 de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos TAVFYCAR (SEC ID N°: 38) en la región FRW3. En el presente documento este anticuerpo se denomina anticuerpo NI-1201 de tipo silvestre (*Wild Type*) (NI-1201-WT).

Los anticuerpos totalmente humanos contienen una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°s: 2, 8, y 12. Los anticuerpos totalmente humanos de la invención contienen una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de las SEC ID N°s: 4, 6, 10 y 14. El anticuerpo se une a IL-6R, a IL-6R que forma complejo con IL-6 (es decir, IL-6Rc) o a ambas.

Las tres CDR de cadena pesada incluyen una región 1 determinante de la complementariedad de cadena pesada variable (VH) (CDR1) que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N°s: 15, 18 y 21; una región 2 determinante de la complementariedad (CDR2) de VH que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N°s: 16, 19, 22, 33, 34 y 35; y una región 3 determinante de la complementariedad (CDR3) de VH que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N°s: 17, 20, 23, 36 y 37. El anticuerpo se une a IL-6R, a IL-6R que forma complejo con IL-6 (es decir, IL-6Rc) o a ambas.

Las tres CDR de cadena ligera incluyen una CDR1 de cadena ligera variable (VL) que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más a una secuencia seleccionada

entre el grupo que consiste en las SEC ID N<sup>os</sup>: 24, 27, 28, y 30; una CDR2 de VL que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más a la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N<sup>o</sup>: 25; y una CDR3 de VL que incluye una secuencia de aminoácidos idéntica al menos en un 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o más a una secuencia seleccionada entre el grupo que consiste en las SEC ID N<sup>os</sup>: 26, 29, 31 y 32. El anticuerpo se une a IL-6R, a IL-6R que forma complejo con IL-6 (es decir, IL-6Rc) o a ambas.

Los anticuerpos huIL-6Rc proporcionados en el presente documento son anticuerpos totalmente humanos que se unen al complejo IL-6/IL-6R (IL-6Rc) y evitan que IL-6Rc se una a gp130 de modo que la cascada de señalización intracelular mediada por gp 130 no se active en presencia de estos anticuerpos. Preferentemente, los anticuerpos tienen una afinidad de al menos  $1 \times 10^{-8}$  hacia IL-6Rc, y más preferentemente, los anticuerpos tienen una afinidad de al menos  $1 \times 10^{-9}$  hacia IL-6Rc.

Los anticuerpos de la divulgación se unen de forma específica a IL-6Rc, en la que el anticuerpo se une a un epítipo que incluye uno o más restos de aminoácidos en la IL-6 humana y/o IL-6R humana. Los anticuerpos de la invención se unen de forma inespecífica tanto a IL-6Rc como a IL-6R, en la que el anticuerpo se une a un epítipo que incluye uno o más restos de aminoácidos en la IL-6R humana. Preferentemente, los anticuerpos huIL-6Rc que se describen en el presente documento se unen a un epítipo en el dominio 3 del receptor de IL-6 (IL-6R). Más preferentemente, el epítipo al que se unen los anticuerpos huIL-6Rc incluye al menos la secuencia de aminoácidos AERSKT (SEC ID N<sup>o</sup>: 46).

Los anticuerpos de la divulgación también incluyen anticuerpos totalmente humanos que se unen de forma específica a IL-6Rc, y anticuerpos que se unen de forma específica tanto a IL-6Rc como a IL-6R, en la que el anticuerpo presenta una inhibición superior a un 50 % de activación mediada por IL-6 de la ruta de JAK/STAT y la cascada de MAPK. Por ejemplo, algunos anticuerpos de la invención presentan una inhibición superior a un 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 92 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % de las funciones mediadas por IL-6 incluyendo activación de STAT3, producción de proteína de fase aguda, producción de anticuerpos y diferenciación y/o proliferación celular.

La presente invención también proporciona métodos para tratar o prevenir patologías asociadas con la activación anómala del receptor de IL-6 y/o con la señalización anómala de IL-6 (cis y/o trans) o para aliviar un síntoma asociado con tales patologías, mediante la administración de un anticuerpo monoclonal de la invención (por ejemplo, anticuerpo monoclonal totalmente humano) a un sujeto en el que se desea tal tratamiento o prevención. Por ejemplo, el sujeto a tratar es un ser humano. El anticuerpo monoclonal se administra en una cantidad suficiente para tratar, prevenir o aliviar un síntoma asociado con la patología. La cantidad de anticuerpo monoclonal suficiente para tratar de prevenir la patología en el sujeto es, por ejemplo, una cantidad que es suficiente para reducir la activación inducida por IL-6Rc de la ruta de JAK/STAT o cascada de MAPK. Por ejemplo, la activación inducida por IL-6Rc de la ruta de JAK/STAT o cascada de MAPK disminuye cuando el nivel de activación de STAT3 en presencia de un anticuerpo monoclonal de la invención es mayor o igual que un 5 %, 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 90 %, 95 %, 99 %, o un 100 % menor que un nivel de control de activación de STAT3 (es decir, el nivel de activación de STAT3 en ausencia del anticuerpo monoclonal). Los expertos en la materia observarán que el nivel de activación de STAT3 se puede medir usando una diversidad de ensayos, que incluyen, por ejemplo, kits para ELISA disponibles en el mercado.

Algunas patologías que se tratan y/o se previenen usando los anticuerpos monoclonales de la invención (por ejemplo, anticuerpo monoclonal totalmente humano) incluyen, por ejemplo, septicemia, cáncer (por ejemplo, enfermedad de mieloma múltiple (MM), carcinoma de células renales (RCC), leucemia de células plasmáticas, linfoma, trastorno B-linfoproliferativo (BLPD), y cáncer de próstata), resorción ósea, osteoporosis, caquexia, psoriasis, glomerulonefritis proliferativa mesangial, sarcoma de Kaposi, linfoma relacionado con SIDA, y enfermedades inflamatorias (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil de inicio sistémico, hipergammaglobulinemia, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus sistémico eritematoso (SLE), esclerosis múltiple, enfermedad de Castleman, gammapatía de IgM, mixoma cardíaco, asma, asma alérgica y diabetes mellitus dependiente de insulina autoinmunitaria).

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden incluir un anticuerpo de la invención y un vehículo. Estas composiciones farmacéuticas se pueden incluir en kits, tales como, por ejemplo, kits de diagnóstico.

Un experto en la materia observará que los anticuerpos de la invención tienen una diversidad de usos. Por ejemplo, las proteínas de la invención se usan como agentes terapéuticos para prevenir la activación del receptor de IL-6 en trastornos tales como, por ejemplo, septicemia, cáncer (por ejemplo, enfermedad de mieloma múltiple (MM), carcinoma de células renales (RCC), leucemia de células plasmáticas, linfoma, trastorno B-linfoproliferativo (BLPD), y cáncer de próstata), resorción ósea, osteoporosis, caquexia, psoriasis, glomerulonefritis proliferativa mesangial, sarcoma de Kaposi, linfoma relacionado con SIDA, y enfermedades inflamatorias (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil de inicio sistémico, hipergammaglobulinemia, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus sistémico eritematoso (SLE), esclerosis múltiple, enfermedad de Castleman, gammapatía de IgM, mixoma cardíaco, asma, asma alérgica y diabetes mellitus dependiente de insulina autoinmunitaria). Los anticuerpos de la invención se pueden usar como reactivos en kits de diagnóstico o como herramientas de diagnóstico, o estos anticuerpos se

pueden usar en ensayos de competición para generar reactivos terapéuticos.

### Breve descripción de las figuras

- 5 Las Figuras 1A-1D son una serie de gráficos que representan la capacidad de un anticuerpo de la invención, NI-1201, para bloquear la señalización *trans* de IL-6.  
 Las Figuras 2A y 2B son una serie de gráficos que representan la capacidad del anticuerpo NI-1201 para bloquear la señalización *cis* de IL-6.  
 Las Figuras 3A y 3B son una serie de ilustraciones que representan la capacidad del anticuerpo NI-1201 para  
 10 bloquear la fosforilación de STAT-3 inducida por la señalización *cis* de IL-6.  
 La Figura 4 es un gráfico que representa la capacidad del anticuerpo NI-1201 para bloquear la señalización *trans* de IL-6 mediada por la proteína de fusión del complejo de IL-6/IL-6R humano soluble ("shuIL-6Rc").  
 La Figura 5 es un gráfico que representa la unión del anticuerpo NI-1201 a IL-6R unida a membrana.  
 Las Figuras 6A-6D son una serie de ilustraciones y gráficos que representan la formación de mapas del epítipo  
 15 de NI-1201 en IL-6R.  
 Las Figuras 7A y 7B son una ilustración y un gráfico que representan la capacidad del anticuerpo NI-1201 para presentar reacción cruzada y neutralizar la señalización de IL-6 de mono *cinomolgo*.

### Descripción detallada

- 20 La presente invención proporciona anticuerpos monoclonales humanos como se define en las reivindicaciones que se unen de forma específica al complejo receptor de IL-6/IL-6 humano ("IL-6Rc"), en forma soluble, o unido a membrana (es decir, cuando se expresa en una superficie celular). La invención también proporciona anticuerpos monoclonales que se unen a IL-6Rc de forma específica, en la que los anticuerpos también se unen a IL-6R cuando  
 25 no forma complejo con IL-6. En el presente documento, estos anticuerpos se denominan de forma colectiva anticuerpos "hull-6Rc". Por ejemplo, el anticuerpo es un anticuerpo totalmente humano.

- Los anticuerpos de la invención se unen de forma específica a IL-6Rc y/o tanto a IL-6Rc como a IL-6R en la que el anticuerpo se une a un epítipo que incluye uno o más restos de aminoácidos de IL-6R humana.

- 30 Los anticuerpos se unen a un epítipo de IL-6Rc y/o tanto de IL-6Rc como de IL-6R con una constante de unión en equilibrio ( $K_d$ )  $\leq 1 \mu\text{M}$ , por ejemplo,  $\leq 100 \text{ nM}$ , preferentemente  $\leq 10 \text{ nM}$ , y más preferentemente  $\leq 1 \text{ nM}$ . Por ejemplo, los anticuerpos hull-6Rc proporcionados en el presente documento presentan una  $K_d$  en el intervalo de aproximadamente entre  $\leq 1 \text{ nM}$  y aproximadamente  $1 \text{ pM}$ .

- 35 IL-6 actúa como una citoquina tanto proinflamatoria como antiinflamatoria. La secretan los linfocitos T y macrófagos para estimular una respuesta inmunitaria a traumatismos, en especial quemaduras u otro daño tisular que conduce a inflamación. La IL-6 es uno de los mediadores más importantes de la fiebre y de la respuesta de fase aguda. En el músculo y en el tejido graso, la IL-6 estimula la movilización de la energía que conduce a un aumento de la  
 40 temperatura corporal. La IL-6 se puede secretar por macrófagos como respuesta a moléculas microbianas específicas, denominados patrones moleculares asociados con patógenos (PAMP). Estos PAMP se unen a moléculas de detección muy importantes del sistema inmunitario innato, denominadas receptores de tipo Toll (TLR), que están presentes en la superficie celular (o en compartimentos intracelulares) que inducen cascadas de señalización intracelular que da lugar a la producción de citoquina se inflamatorias. IL-6 también es esencial para el crecimiento de hibridoma y se encuentra en muchos medios de clonación complementarios tales como Briclone.

- La IL-6 produce señales a través de un complejo receptor de citoquina de tipo I de superficie celular que consiste en la cadena de IL-6R $\alpha$  de unión a ligando (también conocida como CD126), y el componente gp130 de transducción de señales (también denominado CD130). gp130 es el transductor de señales común para varias citoquinas que  
 50 incluyen factor inhibidor de leucemia (LIF), factor neurotrófico ciliar, oncostatina M, IL-11 y cardiotrofina-1, y se expresa de forma casi omnipresente en la mayoría de los tejidos. Por el contrario, la expresión de CD 126 se limita a ciertos tejidos. Dado que IL-6 interactúa con su receptor, éste activa a las proteínas gp130 y IL-6R para que formen un complejo, activando de este modo al receptor. Estos complejos unen las regiones intracelulares de gp130 para iniciar una cascada de transducción de señales a través de ciertos factores de transcripción, quinasas de Janus (JAK) y Transductores de Señales y Activadores de Transcripción (STAT). Por consiguiente, la neutralización de la señalización de IL-6 es una estrategia terapéutica potencial en el tratamiento de trastornos tales como, por ejemplo, septicemia, cáncer (por ejemplo, enfermedad de mieloma múltiple (MM), carcinoma de células renales (RCC), leucemia de células plasmáticas, linfoma, trastorno B-linfoproliferativo (BLPD), y cáncer de próstata), resorción ósea, osteoporosis, caquexia, psoriasis, glomerulonefritis proliferativa mesangial, sarcoma de Kaposi, linfoma relacionado con SIDA, y enfermedades inflamatorias (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil de inicio sistémico, hipergammaglobulinemia, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus sistémico eritematoso (SLE), esclerosis múltiple, enfermedad de Castleman, gammapatía de IgM, mixoma cardíaco, asma, asma alérgica y diabetes mellitus dependiente de insulina autoinmunitaria).

- 65 Los anticuerpos hull-6Rc de la invención sirven para bloquear, inhibir, reducir, antagonizar, neutralizar o de otro modo interferir con la actividad funcional de IL-6Rc. Algunas actividades funcionales de IL-6Rc incluyen por ejemplo,

señalización intracelular a través de la activación de la ruta de JAK/STAT y activación de la cascada de MAPK, producción de proteína de fase aguda, producción de anticuerpos y diferenciación y/o proliferación celular. Por ejemplo, los anticuerpos huIL-6Rc inhiben completa o parcialmente la actividad funcional de IL-6Rc mediante el bloqueo, inhibición, reducción, antagonismo, neutralización, o de otro modo de interferencia, parcial o completamente, de la unión de IL-6Rc al componente gp130 receptor de transducción de señales.

Se considera que los anticuerpos huIL-6Rc bloquean, inhiben, reducen, antagonizan, neutralizan o de otro modo interfieren completamente con la actividad funcional de IL-6Rc cuando el nivel de actividad funcional de IL-6Rc en presencia del anticuerpo huIL-6Rc disminuye en al menos un 95 %, por ejemplo, en un 96%, 97 %, 98 %, 99 % o un 100 % en comparación con el nivel de actividad funcional de IL-6Rc en ausencia de unión con un anticuerpo huIL-6Rc que se describe en el presente documento. Se considera que los anticuerpos huIL-6Rc bloquean, inhiben, reducen, antagonizan, neutralizan o de otro modo interfieren parcialmente con la actividad funcional de IL-6Rc cuando el nivel de actividad de IL-6Rc en presencia del anticuerpo huIL-6Rc disminuye en menos de un 95 %, por ejemplo, un 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 75 %, 80 %, 85 % o un 90 % en comparación con el nivel de actividad de IL-6Rc en ausencia de unión con un anticuerpo huIL-6Rc que se describe en el presente documento.

### Definiciones

A menos que se defina de otro modo, los términos científicos y técnicos usados en conexión con la presente invención tendrán los significados que normalmente entienden los expertos habituales en la materia. Además, a menos que el contexto lo requiera de otro modo, los términos en singular incluirán pluralidades y los términos en plural incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas usadas en conexión con, y técnicas de, cultivo celular y tisular, biología molecular, y química e hibridación de proteínas y oligo- o polinucleótidos que se describen en el presente documento son las que se conocen bien y se usa normalmente en la técnica. Para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos, y cultivo y transformación tisular (por ejemplo, electroporación, lipofección) se usan técnicas convencionales. Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o tal como se consiguen normalmente en la técnica o como se describen en el presente documento. Las técnicas y procedimientos mencionados anteriormente por lo general se realizan de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y tal como se describen en diversas referencias generales y más específicas que se mencionan y analizan a través de toda la presente memoria descriptiva. Véase por ejemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Las nomenclaturas usadas en conexión con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de, química analítica, química orgánica de síntesis, y química medicinal y farmacéutica que se describen en el presente documento son las bien conocidas y usadas normalmente en la técnica. Para síntesis química, análisis químico, preparación farmacéutica, formulación y administración, y tratamiento de pacientes se usan técnicas convencionales.

Como se usa de acuerdo con la presente divulgación, se entenderá que los siguientes términos, a menos que se indique de otro modo cosa, tienen los siguientes significados:

Como se usa en el presente documento, las expresiones Receptor de Interleuquina-6, IL-6R, Receptor alfa de Interleuquina-6, IL-6R $\alpha$ , factor 126 de diferenciación de grupos, y CD 126 son sinónimos y se pueden usar de forma indistinta. Cada uno de estas expresiones se refiere a la proteína homodimérica, excepto si se indica de otro modo.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" se refiere a moléculas de inmunoglobulina y porciones de moléculas de inmunoglobulina inmunológicamente activas (1g), es decir, moléculas que contienen un sitio de unión al antígeno que se une de forma específica (inmunorreacciona con) un antígeno. Por "se une de forma específica" o "inmunorreacciona con" "o se dirige frente a" se hace referencia a que el anticuerpo reacciona con uno o más determinantes antigénicos del antígeno deseado y no reacciona con otros polipéptidos o se une con una afinidad mucho menor ( $K_d > 10^{-6}$ ). Los anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, policlinal, monoclonal, quimérico, dAb (anticuerpo de dominio), cadena individual, fragmentos de F<sub>ab</sub>, F<sub>ab'</sub> y F<sub>(ab')<sub>2</sub></sub>, scFv, y una biblioteca de expresión de F<sub>ab</sub>.

Se sabe que la unidad estructural de anticuerpo básico comprende un tetrámero. Cada tetrámero está formado por dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos teniendo cada par una cadena "ligera" (de aproximadamente 25 kDa) y una cadena "pesada" (de aproximadamente 50-70 kDa). La porción amino-terminal de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos responsables principalmente del reconocimiento de antígenos. La porción carboxi-terminal de cada cadena define una región constante responsable principalmente de la función efectora. En general, las moléculas de anticuerpo obtenidas a partir de seres humanos se relacionan con cualquiera de las clases de IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que se diferencian entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Ciertas clases también tienen subclases, tales como IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> y otras. Además, en seres humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

La expresión "anticuerpo monoclonal" (MAb) o "composición de anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a una población de moléculas de anticuerpo que contienen solamente una especie molecular de molécula de anticuerpo que consiste en un único producto genético de cadena ligera y un único

producto genético de cadena pesada. En particular, las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo monoclonal son idénticas en todas las moléculas de la población. Los mAb contienen un sitio de unión al antígeno capaz de inmunorreaccionar con un epítipo en particular del antígeno caracterizado por una afinidad de unión única para el mismo.

En general, algunas moléculas de anticuerpo obtenidas de seres humanos se refieren a cualquiera de las clases de IgG, IgM, IgA, IgE e IgD, que se diferencian entre sí por la naturaleza de la cadena pesada presente en la molécula. Ciertas clases también tienen subclases, tales como IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> y otras. Además, en seres humanos, la cadena ligera puede ser una cadena kappa o una cadena lambda.

La expresión "sitio de unión al antígeno" o "porción de unión" se refiere a la parte de la molécula de inmunoglobulina que participa en la unión al antígeno. El sitio de unión al antígeno se forma con restos de aminoácidos de regiones variables N-terminales ("V") de las cadenas pesada ("H") y ligera ("L"). Tres tramos altamente divergentes dentro de las regiones V de las cadenas pesada y ligera, denominadas "regiones hipervariables", se interponen entre más tramos de flanco conservados conocidos como "regiones de marco conservadas" o "FR". Por lo tanto, el término "FR" se refiere a secuencias de aminoácidos que se encuentran de forma natural entre, y adyacentes a, regiones hipervariables en inmunoglobulinas. En una molécula de anticuerpo, las tres regiones hipervariables de una cadena ligera y las tres regiones hipervariables de una cadena pesada se colocan de forma relativa entre sí en el espacio tridimensional para formar una superficie de un antígeno. La superficie de unión al antígeno es complementaria con la superficie tridimensional de un antígeno unido, y las tres regiones hipervariables de cada una de las cadenas pesada y ligera se denominan "regiones determinantes de la complementariedad", o "CDR". La asignación de aminoácidos a cada dominio se realiza de acuerdo con las definiciones de Secuencias de Kabat de Proteínas de Interés Inmunológico (Instituto Nacional de la Salud, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chotia y Lesk J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987), Chotia *et al.*, Nature 342: 878-883 (1989).

Como se usa en el presente documento, el término "epítipo" incluye cualquier determinante de proteína capaz de unión específica a una inmunoglobulina o fragmento de la misma, o un receptor de linfocitos T. El término "epítipo" incluye cualquier determinante de proteína capaz de unión específica a una inmunoglobulina o receptor de linfocitos T. Algunos determinantes epitópicos normalmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activa tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y que normalmente tienen tres características estructurales de dimensión específicas, así como características de carga específicas. Se dice que un anticuerpo se une de forma específica a un antígeno cuando la constante de disociación es  $\leq 1 \mu\text{M}$ ; por ejemplo,  $\leq 100 \text{ nM}$ , preferentemente  $\leq 10 \text{ nM}$  y más preferentemente  $\leq 1 \text{ nM}$ .

Como se usa en el presente documento, las expresiones "unión inmunológica", y "propiedades de unión inmunológica" se refieren a las interacciones no covalentes del tipo que se produce entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica. La fuerza, o afinidad de interacciones de unión inmunológicas se puede expresar en términos de la constante de disociación ( $K_d$ ) de la interacción, en la que una  $K_d$  menor representa una afinidad más elevada. Algunas propiedades de unión inmunológicas de polipéptidos seleccionados se pueden cuantificar usando métodos bien conocidos en la técnica. Uno de tales métodos implica la medida de las tasas de formación y disociación de complejos de sitio de unión al antígeno/antígeno, en la que las tasas dependen de las concentraciones de los asociados del complejo, la afinidad de la interacción, y parámetros geométricos que influyen del mismo modo en la tasa en ambas direcciones. Por lo tanto, tanto la "constante de tasa activada" ( $K_{\text{activada}}$ ) como la "constante de tasa desactivada" ( $K_{\text{desactivada}}$ ) se pueden determinar mediante el cálculo de las concentraciones y las tasas de asociación y disociación reales. (Véase Nature 361: 186-87 (1993)). La proporción de  $K_{\text{desactivada}}/K_{\text{activada}}$  permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad, y es igual a la constante de disociación,  $K_d$ . (Véase, *por lo general*, Davies *et al.*, (1990) Annual Rev Biochem 59: 439-473). Se dice que un anticuerpo de la presente invención se une de forma específica a IL-6Rc y/o tanto a IL-6Rc como a IL-6R, cuando la constante de unión en equilibrio ( $K_d$ ) es  $\leq 1 \mu\text{M}$ , preferentemente  $\leq 100 \text{ nM}$ , más preferentemente  $\leq 10 \text{ nM}$ , y lo más preferentemente  $\leq 100 \text{ pM}$  a aproximadamente  $1 \text{ pM}$ , como se mide con ensayos tales como ensayos de unión a radioligando por ensayos similares conocidos por los expertos en la materia.

La expresión "polinucleótido aislado" como se usa en el presente documento a la referencia a un polinucleótido de origen genómico, ADNc, o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud a su origen de "polinucleótido aislado" (1) no se asocia con ninguna ni con una porción de un polinucleótido en que el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) se une de forma operativa a un polinucleótido al que no se une en la naturaleza, o (3) no se produce en la naturaleza como parte de una secuencia más larga. Los polinucleótidos de acuerdo con la invención incluyen las moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada representadas en las SEC ID N<sup>os</sup>: 2, 8 y 12, y moléculas de ácido nucleico que codifican las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera representadas en las SEC ID N<sup>os</sup>: 4, 6, 10, y 14.

La expresión "proteína aislada" mencionada en el presente documento se refiere a una proteína de origen en ADNc, ARN recombinante, o sintético o alguna combinación de los mismos, que en virtud de su origen, o fuente de derivación, la "proteína aislada" (1) no se asocia con proteínas encontradas en la naturaleza, (2) está libre de otras proteínas de la misma fuente, por ejemplo, libre de proteínas marinas, (3) se expresa mediante una célula de una

especie diferente, o (4) no se produce en la naturaleza.

El término "polipéptido" se usa en el presente documento como un término genérico para hacer referencia a proteína nativa, fragmentos, o análogos de una secuencia de polipéptidos. Por lo tanto, algunos fragmentos y análogos de proteína nativa, son especies del género de polipéptido. Los polipéptidos de acuerdo con la invención comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada representadas en las SEC ID N<sup>os</sup>: 2, 8, y 12, y las moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera representadas en las SEC ID N<sup>os</sup>: 4, 6, 10, y 14 así como moléculas de anticuerpo formadas por combinaciones que comprenden las moléculas de inmunoglobulina de cadena pesada con moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera, tales como moléculas de inmunoglobulina de cadena ligera kappa, y viceversa, así como fragmentos y análogos de las mismas.

La expresión "de origen natural" como se usa en el presente documento tal como se aplica a un objeto se refiere al hecho de que un objeto se puede encontrar en la naturaleza. Por ejemplo, una secuencia de polipéptidos o de polinucleótidos que está presente en un organismo (incluyendo virus) que se pueden aislar de una fuente en la naturaleza y que el ser humano no ha modificado de forma intencionada en el laboratorio o de otro modo es de origen natural.

La expresión "unida de forma operativa", como se usa en el presente documento, se refiere a posiciones de componentes de modo que se describen en una relación que les permite funcionar de su manera pretendida. Una secuencia de control "unidad de forma operativa" a una secuencia de codificación se liga de un modo tal que la expresión de la secuencia de codificación se consigue en condiciones compatibles con las secuencias de control.

La expresión "secuencia de control", como se usa en el presente documento, se refiere a secuencias de polinucleótidos que son necesarias para realizar la expresión y procesamiento de secuencias de codificación a las que se ligan. La naturaleza de tales secuencias de control difiere dependiendo del organismo hospedador en procariontas, por lo general tales secuencias de control incluyen secuencia promotora, de sitio de unión a ribosoma, y de terminación de la transcripción en eucariotas, por lo general, tales de secuencias de control incluyen secuencia de promotores y de terminación de la transcripción. La expresión "secuencias de control" pretende incluir, como mínimo, todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y procesamiento, y también puede incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias directoras y secuencias de asociados de fusión. El término "polinucleótido" como se denomina en el presente documento se refiere a una forma polimérica de polinucleótidos con una longitud de al menos 10 bases, ya sean ribonucleótidos o desoxinucleótidos o una forma modificada de cualquier tipo de nucleótido. El término incluye formas de ADN monocatenario y bicatenario.

El término "oligonucleótido" mencionado en el presente documento incluye nucleótidos de origen natural y modificados unidos en conjunto mediante uniones de oligonucleótidos de origen natural y de origen no natural. Los oligonucleótidos son un subconjunto de polinucleótidos que por lo general comprenden una longitud de 200 bases o menos. Preferentemente, los oligonucleótidos tienen una longitud de 10 a 60 bases y lo más preferentemente una longitud de 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 a 40 bases. Normalmente los oligonucleótidos son monocatenarios, por ejemplo, para las ondas, aunque algunos oligonucleótidos pueden ser bicatenarios, por ejemplo, para uso en la construcción de un mutante genético. Los oligonucleótidos de la invención son cualquier oligonucleótidos sentido o antisentido.

La expresión "nucleótidos de origen natural" mencionada en el presente documento incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. La expresión "nucleótidos modificados" mencionada en el presente documento incluye nucleótidos con grupos de azúcar modificado o sustituido y similares. La expresión "uniones de oligonucleótido" mencionada en el presente documento incluye uniones de oligonucleótidos tales como fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenoato, fosforodiselenoato, fosforoanilitioato, fosforaniladato, fosforoamidato, y similares. Véase por ejemplo La Planche *et al.*, Nucl. Acids Res. 14: 9081 (1986); Stec *et al.*, J. Am. Chem. Soc. 106: 6077 (1984), Stein *et al.*, Nucl. Acids Res. 16: 3209 (1988), Zon *et al.*, Anti Cancer Drug Design 6: 539 (1991); Zon *et al.*, Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N° 5.151.510; Uhlmann y Peyman Chemical Reviews 90: 543 (1990). Si se desea, un oligonucleótido puede incluir una etiqueta para detección.

La expresión "hibridar de forma selectiva" mencionada en el presente documento se refiere a unir de forma detectable y de forma específica. Los polinucleótidos, oligonucleótidos y fragmentos de los mismos de acuerdo con la invención se hibridan selectivamente a hebras de ácidos nucleicos en condiciones de hibridación y de lavado que minimizan algunas cantidades apreciables de unión detectable a ácidos nucleicos no específicos. Se pueden usar condiciones de alta rigurosidad para conseguir condiciones de hibridación selectivas como se conoce en la técnica y se analiza en el presente documento. Por lo general, la homología de secuencias de ácidos nucleicos entre los polinucleótidos, oligonucleótidos, y fragmentos de la invención y una secuencia de ácidos nucleicos de interés tendrá un 80 %, y más habitualmente con tendrá preferentemente aumentos de homologías de al menos un 85 %, 90 %, 95 %, 99 %, y un 100 %. Dos secuencias de aminoácidos son homólogas si existe una identidad parcial o completa entre sus secuencias. Por ejemplo, homología de un 85 % se refiere a que un 85 % de los aminoácidos son idénticos cuando las dos secuencias se alinean para emparejamiento máximo. En la maximización de las longitudes de hueco

de emparejamiento se permiten algunos huecos (en cualquiera de las dos secuencias que se están emparejando), siendo preferentes de 5 o menos huecos y siendo más preferente 2 o menos huecos. Como alternativa y preferentemente, 2 secuencias de proteínas (o secuencias de polipéptidos derivadas de las mismas con una longitud de al menos 30 aminoácidos) son homólogas, tal como se usa esta expresión en el presente documento, si tienen una puntuación de alineamiento como de más de 5 (en unidades de desviación estándar) usando el programa ALIGN con la matriz de datos de mutación y una penalización de hueco de 6 o superior. Véase Dayhoff, M.O., en Atlas of Protein Sequence and Structure, pp. 101-110 (Volumen 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) y Suplemento 2 de este volumen, pp. 1-10. Las dos secuencias o partes de las mismas son más preferentemente homólogas si sus aminoácidos son idénticos en una proporción mayor o igual que un 50 % cuando se alinean de forma óptima usando el programa ALIGN. La expresión "corresponde a la" se usa en el presente documento para hacer referencia a que una secuencia de polinucleótidos es homóloga (es decir, es idéntica, no relacionada estrictamente de forma evolutiva) con toda o una porción de una secuencia de polinucleótidos de referencia, o que una secuencia de polinucleótidos es idéntica a una secuencia de polipéptidos de referencia. Por el contrario, la expresión "complementaria con" se usa en el presente documento para hacer referencia a que la secuencia complementaria es homóloga con toda o una porción de una secuencia de polinucleótidos de referencia. La ilustración, la secuencia de nucleótidos "TATAC" corresponde a una secuencia de referencia "TATAC" y es complementaria con una secuencia de referencia "GTATA".

Los siguientes términos se usan para describir las relaciones de secuencias entre dos o más secuencias de polinucleótidos o aminoácidos: "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia", e "identidad básica". Una "secuencia de referencia" es una secuencia definida usada como una base para una comparación de secuencias que puede ser un subconjunto de una secuencia más grande, por ejemplo, como un segmento de un ADNc de longitud completa o secuencia genética dada en un listado de secuencias o puede comprender un ADNc completo o secuencia genética. Por lo general, una secuencia de referencia tiene una longitud de al menos 18 nucleótidos o 6 aminoácidos, frecuentemente una longitud de al menos 24 nucleótidos o 8 aminoácidos, y a menudo una longitud de al menos 48 nucleótidos o 16 aminoácidos. Dado que dos secuencias de polinucleótidos o aminoácidos pueden cada uno (1) comprender una secuencia (es decir, una porción de la secuencia de polinucleótidos o aminoácidos completa) que es similar entre las dos moléculas, y (2) puede comprender adicionalmente una secuencia que es divergente entre las dos secuencias de polinucleótido sobre aminoácidos, por lo general las comparaciones de secuencias entre dos (o más) moléculas se realizan mediante comparación de las secuencias de las dos moléculas en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencias. Una "ventana de comparación", como se usa en el presente documento, se refiere a un segmento conceptual de al menos 18 posiciones de nucleótidos contiguos o 6 aminoácidos en el que una secuencia de polinucleótidos o secuencia de aminoácidos se puede comparar con una secuencia de referencia de al menos 18 nucleótidos contiguos o secuencias de 6 aminoácidos y en el que la porción de la secuencia de polinucleótidos en la ventana de comparación puede comprender adiciones, supresiones, sustituciones, y similares (es decir, huecos) de un 20 por ciento o inferior en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones ni supresiones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de la secuencias para alinear una ventana de comparación se puede realizar con el algoritmo de homología local de Smith y Waterman Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981), con el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch J. Mol. Biol. 48: 443 (1970), mediante la búsqueda del método de similitud de Pearson y Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85: 2444 (1988), se selecciona mediante implementaciones informáticas de estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), paquetes de software Geneworks, o MacVector), o mediante inspección, y el mejor alineamiento (es decir, que da como resultado el porcentaje de homología más elevado sobre la ventana de comparación) generado con los diversos métodos.

La expresión "identidad de secuencias" se refiere a que dos secuencias de polinucleótidos o de aminoácidos son idénticas (es decir en una base de un nucleótido a nucleótido o resto a resto) sobre la ventana de comparación. La expresión "porcentaje de identidad de secuencias" se calcula por comparación de dos secuencias alineadas de forma óptima sobre la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se produce la base o resto idénticos de ácidos nucleicos (por ejemplo, A, T, C, G, U o I) o en ambas secuencias para producir el número de posiciones emparejadas, dividiendo el número de posiciones emparejadas entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para producir el porcentaje de identidad de secuencias. Las expresiones "identidad básica" como se usa en el presente documento representa una característica de una secuencia de polinucleótidos o aminoácidos, en la que el polinucleótido o aminoácido comprende una secuencia que tiene una identidad de secuencias de un 85 por ciento, preferentemente una identidad de secuencias al menos de un 90 a un 95 por ciento, más habitualmente una identidad de secuencias de al menos un 99 por ciento en comparación con una secuencia de referencia sobre una ventana de comparación de al menos 18 posiciones de nucleótidos (6 aminoácidos), frecuentemente sobre una ventana de al menos 24-48 posiciones de nucleótidos (8-16 aminoácidos), en la que el porcentaje de identidad de secuencias se calcula por comparación de la secuencia de referencia con la secuencia que puede incluir supresiones o adiciones que hace un total de un 20 por ciento o inferior de la secuencia de referencia sobre la ventana de comparación. La secuencia de referencia puede ser un subconjunto de una secuencia más grande.

Como se usa en el presente documento, los veinte aminoácidos convencionales y sus abreviaturas siguen un uso

convencional. Véase *Immunology - A Synthesis* (2ª Edición, E.S. Golub y D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland7 Mass. (1991)). Algunos estereoisómeros (por ejemplo, D-aminoácidos) de los veinte aminoácidos convencionales, aminoácidos no naturales tales como  $\alpha$ -, aminoácidos  $\alpha$ -disustituidos, N-alquil aminoácidos, ácido láctico, y otros aminoácidos no convencionales también pueden ser componentes adecuados para polipéptidos de la presente invención. Algunos ejemplos de aminoácidos no convencionales incluyen: 4 hidroxiprolina,  $\gamma$ -carboxiglutamato,  $\epsilon$ -N,N,N-trimetilisina,  $\epsilon$ -N-acetilisina, O-fosfoserina, N-acetilserina, N-formilmetionina, 3-metilhistidina, 5-hidroxilisina,  $\sigma$ -N-metilarginina, y otros aminoácidos e imino ácidos similares (por ejemplo, 4-hidroxiprolina). En la anotación de polipéptidos usada en el presente documento, la dirección hacia la izquierda es la dirección amino terminal y la dirección hacia la derecha es la dirección carboxi-terminal, de acuerdo con uso y convención convencionales.

De forma análoga, a menos que se especifique de otro modo, el extremo hacia la izquierda de las secuencias de polinucleótidos monocatenarios es el extremo en la posición 5' de la dirección a la izquierda de las secuencias de polinucleótidos bicatenarios se refiere como en la dirección en la posición 5'. La dirección de la posición 5' a la posición 3' de transcripciones de ARN emergente hace referencia a las regiones de secuencias de dirección de transcripción en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y las que van desde la posición 5' al extremo en la posición 5' de la transcripción de ARN se denominan "secuencias cadena arriba", regiones de secuencias en la hebra de ADN que tienen la misma secuencia que el ARN y que están en la posición 3' con respecto al extremo en la posición 3' de la transcripción de ARN se denominan "secuencias cadena abajo".

Tal como se aplica para polipéptidos, la expresión "identidad básica" se refiere a que dos secuencias peptídicas, cuando se alinean de forma óptima, tal como con los programas GAP o BESTFIT que usan pesos de hueco por defecto, comparten una identidad de secuencias de al menos un 80 por ciento, preferentemente una identidad de secuencias de al menos un 90 por ciento, más preferentemente una identidad de secuencias de al menos un 95 por ciento, y lo más preferentemente una identidad de secuencias de al menos un 99 por ciento.

Preferentemente, las posiciones de los restos que no son idénticos se diferencian en funciones de aminoácidos conservativas.

Las sustituciones de aminoácidos conservativas hacen referencia a la capacidad de intercambio de los restos que tienen cadenas laterales similares. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales de hidroxilo alifático es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina, y triptófano; un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales básicas es lisina, arginina, e histidina; y un grupo de aminoácidos que tiene cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Algunos grupos de sustitución de aminoácidos conservativa preferentes son: valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina valina, glutámico-aspartico, y asparagina-glutamina.

Como se analiza en el presente documento, se contempla que algunas variaciones menores en las secuencias de aminoácidos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulina se incluyen en la presente invención, con la condición de que las variaciones en la secuencia de aminoácidos mantengan al menos un 75 %, más preferentemente al menos un 80 %, 90 %, 95 %, y lo más preferentemente un 99 %. En particular, se contemplan algunas sustituciones de aminoácidos conservativas. Las sustituciones conservativas son aquellas que se producen dentro de la familia de aminoácidos que se relacionan en sus cadenas laterales. Por lo general, los aminoácidos genéticamente codificados se dividen en familia: (1) los aminoácidos ácidos son aspartato, glutamato; (2) los aminoácidos básicos son lisina, arginina, histidina; (3) los aminoácidos no polares son alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano, y (4) los aminoácidos polares sin carga son glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. Los aminoácidos hidrófilos incluyen arginina, asparagina, aspartato, glutamina, glutamato, histidina, lisina, serina, y treonina. Los aminoácidos hidrófobos incluyen alanina, cisteína, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, triptófano, tirosina y valina. Otras familias de aminoácidos incluyen (i) serina y treonina, que son la familia hidroxil alifática; (ii) asparagina y glutamina, que son la familia que contiene amida; (iii) alanina, valina, leucina e isoleucina, que son la familia alifática; y (iv) fenilalanina, triptófano, y tirosina, que son la familia aromática. Por ejemplo, es razonable esperar que una sustitución aislada de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina, o una sustitución similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado no tenga un efecto mayor sobre la unión o las propiedades de la molécula resultante, especialmente si la sustitución no implica un aminoácido dentro de un sitio de armazón. Si un cambio de aminoácido da como resultado un péptido funcional éste se puede determinar fácilmente mediante ensayos de la actividad específica del derivado de polipéptido. En el presente documento se describen con detalle algunos ensayos. Los fragmentos análogos de anticuerpos o moléculas de inmunoglobulinas los pueden preparar fácilmente los expertos habituales en la materia. Algunos extremos de amino y carboxi preferentes de fragmentos o análogos se producen cerca de los límites de dominios funcionales. Los dominios estructurales y funcionales se pueden identificar por comparación de datos de secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos con respecto a bases de datos de secuencias públicas o registradas. Preferentemente, los métodos de comparación por ordenador se usan para identificar motivos de secuencias o dominios de conformación de proteínas predichas que se producen en otras proteínas de estructura y/o función conocidas. Se conocen algunos métodos para identificar secuencias de

proteínas que se pliegan en una estructura tridimensional conocida. Bowie *et al.*, Science 253: 164 (1991). Por lo tanto, los ejemplos mencionados anteriormente demuestran que los expertos en la materia pueden reconocer motivos de secuencias y conformaciones estructurales que se pueden usar para definir dominios estructurales y funcionales de acuerdo con la invención.

5 Algunas sustituciones de aminoácidos preferentes son aquellas que: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2) reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) alteran afinidades de unión, y (4) proporcionan o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de tales análogos. Algunos análogos pueden incluir diversas muteínas de una secuencia distinta de la secuencia peptídica de origen natural. Por ejemplo, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos individuales o múltiples (preferentemente sustituciones de aminoácidos conservativas) en la secuencia de origen natural (preferentemente en la porción del polipéptido fuera del dominio o dominios que forman contactos intermoleculares. Una sustitución de aminoácidos conservativas no debería cambiar básicamente las características estructurales de la secuencia precursora (por ejemplo, una sustitución de aminoácido no debería tener una tendencia a romper una hélice que se produce en la secuencia precursora, ni alterar otros tipos de estructura secundaria que caracterice a la secuencia precursora). Algunos ejemplos de estructuras secundarias y terciarias de polipéptidos reconocidos en la técnica se describen en Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed., W. H. Freeman y Company, New York (1984)); Introduction to Protein Structure (C. Branden y J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); y Thornton *et al.*, Nature 354: 105(1991).

20 La expresión "fragmento de polipéptido", como se usa en el presente documento, se refiere a un polipéptido que tiene una supresión amino terminal y/o carboxi terminal, pero en el que la secuencia de aminoácidos restante es idéntica a las posiciones correspondientes en la secuencia de origen natural deducida, por ejemplo, a partir de una secuencia de ADNc de longitud completa. Por lo general los fragmentos tienen una longitud al menos 5, 6, 8 o 10 aminoácidos, preferentemente una longitud de al menos 14 aminoácidos, más preferentemente una longitud de al menos 20 aminoácidos, normalmente una longitud de al menos 50 aminoácidos, e incluso más preferentemente una longitud de al menos 70 aminoácidos. El término "análogo", como se usa en el presente documento, se refiere a polipéptidos que están formados por un segmento de al menos 25 aminoácidos que tiene una identidad sustancial con una porción de una secuencia de aminoácidos deducida y que tiene una unión específica para IL-6Rc y/o tanto para IL-6Rc como para IL-6R, en condiciones de unión adecuadas. Por lo general, algunos análogos de polipéptidos comprenden una sustitución (o adición o supresión) de aminoácido conservativa con respecto a la secuencia de origen natural. Por lo general, los análogos tienen una longitud de al menos 20 aminoácidos, preferentemente una longitud de al menos 50 aminoácidos o superior, y a menudo pueden ser tan largos como un polipéptido de origen natural de longitud completa.

35 Algunos análogos de péptidos se usan normalmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido usado como molde. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "miméticos de péptido" o "peptidomiméticos". Fauchere, J. Adv. Drug Res. 15: 29 (1986), Veber y Freidinger TINS p. 392 (1985); y Evans *et al.*, J. Med. Chem. 30: 1229 (1987). A menudo, descompuestos se desarrollan con la ayuda de formación de modelos moleculares por ordenador. Los miméticos de péptido que son estructuralmente similares a los péptidos terapéuticamente útiles se pueden usar para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente. Por lo general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares a un polipéptido de paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una propiedad bioquímica o actividad farmacológica), tal como anticuerpo humano, pero tienen uno o más enlaces peptídicos opcionalmente sustituidos con un enlace sustituido entre el grupo que consiste en: --CH<sub>2</sub>NH--, -CH<sub>2</sub>S-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, --CH=CH- (cis y trans), --COCH<sub>2</sub>-, CH(OH)CH<sub>2</sub>-- y -CH<sub>2</sub>SO--, con métodos bien conocidos en la técnica. La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con un D-aminoácido del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) se puede usar para generar estilos más estables. Además, se pueden generar péptidos limitados que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencia consenso básicamente idéntica con métodos conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch Ann. Rev. Biochem. 61: 387 (1992)); por ejemplo, mediante la adición de restos internos de cisteína capaces de formar puentes disulfuro intramoleculares que ciclan el péptido.

55 El término "agente" se usa en el presente documento para indicar un compuesto químico, una mezcla de compuestos químicos, una macromolécula biológica, o un extracto preparado a partir de materiales biológicos.

60 Como se usa en el presente documento, los términos "etiqueta" o "etiquetado" se refiere a incorporación de un marcador detectable, por ejemplo, mediante incorporación de un aminoácido radiomarcado o unión a un polipéptido de restos de biotínulo que se pueden detectar con una avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o actividad enzimática que se puede detectar con métodos ópticos o calorimétricos). En ciertas situaciones, la etiqueta o marcador también puede ser terapéutico. En la técnica se conocen y se pueden usar diversos métodos de etiquetado de polipéptidos y glicoproteínas. Algunos ejemplos de etiquetas para polipéptidos incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: radioisótopos o radionúclidos (por ejemplo, <sup>3</sup>H, <sup>14</sup>C, <sup>15</sup>N, <sup>35</sup>S, <sup>90</sup>Y, <sup>99</sup>Tc, <sup>111</sup>In, <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I), etiquetas fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, lantánidos fósforos), etiquetas enzimáticas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, p-galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), quimioluminiscentes, grupos biotínulo, epítopos de polipéptido determinados previamente reconocidos por un indicador secundario (por ejemplo, secuencias de padres de cremallera de leucina, sitios de unión para anticuerpos

secundarios, dominios de unión o metal, etiquetas de epítipo). En algunas realizaciones, las etiquetas se unen con brazos espaciadores de diversas longitudes para reducir el impedimento estérico potencial. La expresión "agente o fármaco farmacéutico", como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto químico o composición capaces de inducir un efecto terapéutico deseado cuando se administran de forma adecuada a un paciente.

5 En el presente documento se usan otros términos químicos de acuerdo con uso convencional en la técnica, como se hacia modo de ejemplo con The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

10 La expresión "agente antineoplásico" se usa en el presente documento para hacer referencia a agentes que tienen la propiedad funcional de inhibir un desarrollo o evolución de una neoplasia en un ser humano, en particular una lesión maligna (cancerosa), tal como un carcinoma, sarcoma, linfoma, o leucemia. La inhibición de la metástasis es frecuentemente una propiedad de los agentes antineoplásicos.

15 Como se usa en el presente documento, "básicamente puro" se refiere a una especie de objeto que es la especie predominante presente (es decir, en una base molar es más abundante que cualquier otra especie individual en la composición), y preferentemente una fracción básicamente purificada es una composición en la que la especie de objeto comprende al menos aproximadamente un 50 por ciento (en una base molar) de todas las especies macromoleculares presentes.

20 Por lo general, una composición básicamente pura comprenderá más de aproximadamente un 80 por ciento de todas las especies macromoleculares presentes en la composición, más preferentemente más de aproximadamente un 85 %, 90 %, 95 %, y un 99 %. Más preferentemente, la especie de objeto se purifica hasta una homogeneidad esencial (las especies contaminantes no se pueden detectar en la composición con métodos de detección convencionales) en la que la composición consiste básicamente en una sola especie macromolecular.

Algunas enfermedades autoinmunitarias incluyen, por ejemplo, Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA, que es una enfermedad vírica con un componente autoinmunitario), alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípídico, enfermedad de Addison autoinmunitaria, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, enfermedades autoinmunitarias del oído interno (AIED), síndrome linfoproliferativo autoinmunitario (ALPS), púrpura trombocitopénica autoinmunitaria (ATP), enfermedad de Behcet, cardiomiopatía, enfermedad celiaca, dermatitis hepatoforme; síndrome de disfunción inmunitaria y fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIPD), pénfigo cicatricial, enfermedad de aglutinina fría, síndrome de CREST, enfermedad de Crohn, enfermedad de Degos, dermatomiositis juvenil, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia, fibromiositis, enfermedad de Graves, síndrome de Guillain-Barré, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (ITP), nefropatía de IgA, diabetes mellitus dependiente de insulina, artritis crónica juvenil (enfermedad de Still), artritis reumatoide juvenil, enfermedad de Ménière, enfermedad mixta de tejido conector, esclerosis múltiple, miastenia gravis, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriática, fenómenos de Raynaud, síndrome de Reiter, fiebre reumática, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia (esclerosis sistémica progresiva (PSS), también conocida como esclerosis sistémica (SS)), síndrome de Sjögren, síndrome de la persona rígida, lupus sistémico eritematoso, arteritis de Takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vitíligo y granulomatosis de Wegener.

45 Algunos trastornos inflamatorios incluyen, por ejemplo, trastornos inflamatorios crónicos y agudos. Algunos ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen enfermedad de Alzheimer, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, alergia atópica, alergia, aterosclerosis, asma bronquial, eccema, glomerulonefritis, enfermedad de injerto frente a hospedador, anemias hemolíticas, osteoartritis, septicemia, ictus, trasplante de tejidos y órganos, vasculitis, retinopatía diabética y lesión pulmonar inducida por ventilador.

50 Algunos cánceres incluyen, por ejemplo, enfermedad de mieloma múltiple (MM), carcinoma de células renales (RCC), leucemia de células plasmáticas, linfoma, trastorno B-linfoproliferativo (BLPD), y cáncer de próstata.

### 55 **Anticuerpos huLL-6Rc**

Los anticuerpos monoclonales de la invención (por ejemplo, anticuerpos monoclonales totalmente humanos) tienen la capacidad de inhibir la señalización celular mediada por IL-6Rc. La inhibición se determina, por ejemplo, usando el ensayo celular que se describe en el presente documento en el Ejemplo 1 y 2.

60 Los anticuerpos de la invención incluyen, por ejemplo, el anticuerpo 39B9 VL1, el anticuerpo 12A, y el anticuerpo 5C. Estos anticuerpos muestran especificidad hacia la IL-6Rc humana y/o tanto hacia IL-6Rc como hacia IL-6R y se ha mostrado que inhiben la actividad funcional de IL-6Rc (es decir, la unión a gp130 para inducir la cascada de señalización) *in vitro*.

65 Cada uno de los anticuerpos monoclonales huLL-6Rc descritos en el presente documento incluye una región variable

de cadena pesada (VH) y una región variable de cadena ligera (VL), como se muestra en las secuencias de aminoácidos y ácidos nucleicos correspondientes que se indican a continuación.

5 Los anticuerpos 39B9 VL1 y 39B9 VL5 comparten una región variable de cadena pesada común (SEC ID N°: 2) codificada por la secuencia de ácidos nucleicos mostrada en la SEC ID N°: 1.

Secuencia de ácidos nucleicos de > 39B9 VL1-VH (SEC ID N°: 1)

**5' CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTCTCGGT  
GAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCTATGCTATCAGCTGG  
GTGCGCCAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGGATGGGAGGGATCATCCCTCTC  
TTTGATAACAACAAAGTACGCACAGCAGTTCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCG  
GACGAATCCACGAGCACAGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGAC  
ACGGCCGTATTTTACTGTGCGAGAGATCGGGATATTTTGACTGATTATTATCCCA  
TGGGCGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA 3'**

10 Secuencia de aminoácidos de > 39B9 VL1-VH (SEC ID N°: 2)

**QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSY AISWVRQAPGQGLEWMGGIPLFDT  
TKYAQQFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVFYCARDRLTDYYPMGGM  
D VWGQGTITVTVSS**

15 El anticuerpo 39B9 VL1 incluye una región variable de cadena ligera (SEC ID N°: 4) codificada con la secuencia de ácidos nucleicos que se muestra en la SEC ID N°: 3.

Secuencia de ácidos nucleicos de > 39B9 VL1-VL (SEC ID N°: 3)

**5' GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA  
GTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGTTTTAGCCTGGTATC  
AGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGA  
AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC  
ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTCTA  
ATAGTTACCCGCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGT 3'**

20 Secuencia de aminoácidos de > 39B9 VL1-VL (SEC ID N°: 4)

**AIQLTQSPSSLSASVGRVTITCRASQGISSVLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVP  
SRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSNSYPLTFGGGTKVEIKR**

25 El anticuerpo 39B9 VL5 incluye una región variable de cadena ligera (SEC ID N°: 6) codificada con la secuencia de ácidos nucleicos que se muestra en la SEC ID N°: 5.

Secuencia de ácidos nucleicos de > 39B9 VL5-VL (SEC ID N°: 5)

**5' GACATCCTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA  
GTCACCATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGATATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATC  
AGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGA  
AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC  
ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTCTA  
ATAGTTACCCGCTCACTTTCCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAACGA 3'**

30 Secuencia de aminoácidos de > 39B9 VL5-VL (SEC ID N°: 6)

**DILMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQDISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGV  
PSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNSYPLTFGGGKVEIKR**

El anticuerpo 12A incluye una región variable de cadena pesada (SEC ID N°: 8) codificada con la secuencia de ácidos nucleicos que se muestra en la SEC ID N°: 7.

5 Secuencia de ácidos nucleicos de > 12A VH (SEC ID N°: 7)

**5'CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTTGGGGAGGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCT  
GAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGACATGTA  
GTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATTAGATGAT  
GGAAATAATAATACTACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGA  
GACAATTCCAAGAAAAAGGTGTATCTGCAAATGAATAGCCTGAGAGCTGAGGAC  
ACGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAGCGTCCCCTAACTGGGGTCTTCTTGA  
GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT 3'**

10 Secuencia de aminoácidos de > 12A VH (SEC ID N°: 8)

**QVQLVESWGGVQVQGRSLRLSCAASGFTFSNYDMYWVRQAPGKGLEWVAVILDDG  
NNNYYADSVKGRFTISRDNKSKK VYLQMNSLR AEDTAVYYCVRASPNWGLDFWG  
QGTLTVSS**

El anticuerpo 12A incluye una región variable de cadena ligera (SEC ID N°: 10) codificada con la secuencia de ácidos nucleicos que se muestra en la SEC ID N°: 9.

15 Secuencia de ácidos nucleicos de > 12A VL (SEC ID N°: 9)

**5'GAAATTGTGTTGACACAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA  
GTCACCATCACTTGTGGGGCAGTCAAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATC  
AGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATCTATGATGCCTCCAGTTTGGGA  
AAGTGGGGTCCCATCAAGGTTCAAGCGGAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTC  
ACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTTA  
ATAGTTACCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACGT 3'**

20 Secuencia de aminoácidos de > 12A VL (SEC ID N°: 10)

**EIVLTQSPSSLSASVGDRVITICRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESGVP  
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSYPITFGQGTRLEIKR**

25 El anticuerpo 5C incluye una región variable de cadena pesada (SEC ID N°: 12) codificada con la secuencia de ácidos nucleicos que se muestra en la SEC ID N°: 11

Secuencia de ácidos nucleicos de > 5C VH (SEC ID N°: 11)

**CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTG  
AGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCATCTTCAGTAGCTATGACATGTA  
TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATTATATGATG  
GAAATAATAAATACTACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG  
ACAATTCCAAGAACACGGTGTATCTGAAAATGAACAGCCTGAGAGCTGAGGACA  
CGGCTGTGTATTACTGTGTGAGAGCGTCCCCTAACTGGGGTCTTTTTGACTTCTGG  
GGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT 3'**

30

Secuencia de aminoácidos de > 5C VH (SEC ID N°: 12)

**QVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFIFSSYDMYWVRQAPGKGLEWVAVILYDG  
NNKYYADSVKGRFTISRDNKNTVYLQMNSLRAEDTAVYYCVRASPNWGLDFDWG  
QGTLVTVSS**

- 5 El anticuerpo 5C incluye una región variable de cadena ligera (SEC ID N°: 14) codificada con la secuencia de ácidos nucleicos que se muestra en la SEC ID N°: 13.

Secuencia de ácidos nucleicos de > 5C VL (SEC ID N°: 13)

**5'GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGA  
GTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGGGCATTAGCAGTGATTTAGCCTGGTATC  
AGCAGAAACCAGGGAAAGCTCCTAAGCTCCTGATGTATGATGCCTCCAGTTTGG  
AAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCT  
CACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAACAGTTT  
AATAGTTACCCGATCACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAACGT 3'**

10

Secuencia de aminoácidos de > 5C VL (SEC ID N°: 14)

**DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSDLAWYQQKPGKAPKLLMYDASSLES  
G VPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSYPITFGQGTRLEIKR**

15

Los anticuerpos hUL-6Rc de la invención comprenden adicionalmente, por ejemplo, las regiones determinantes de la complementariedad de cadena pesada (VH CDR) que se muestran a continuación en la Tabla 1, las regiones determinantes de la complementariedad de cadena ligera (VL CDR) que se muestran en la Tabla 2, y combinaciones de las mismas.

20

**Tabla 1.** Secuencias CDR de VH de clones de anticuerpo que se unen y neutralizan la actividad biológica de IL-6Rc

Nombre del Clon	CDR1 VH	CDR2 VH	CDR3 VH
39B9	SYAIS (SEC ID N°: 15)	GIIPFDTTKYAQQFQG (SEC ID N°: 16)	CAR DRDILTDYYPMGGMDV (SEC ID N°: 17)
12A	NYDMY (SEC ID N°: 18)	VILDDGNNYYADSVKG (SEC ID N°: 19)	CVR ASPNWGLLDF (SEC ID N°: 20)
5C	SYDMY (SEC ID N°: 21)	VILYDGNKYYADSVKG (SEC ID N°: 22)	CVR ASPNWGLDF (SEC ID N°: 23)

**Tabla 2.** Secuencias CDR de VL de clones de anticuerpo que se unen y neutralizan a IL-6Rc

Nombre del Clon	CDR1 VL	CDR2 VL	CDR3 VL
39B9 VL1	RASQGISSVLA (SEC ID N°: 24)	DASSLES (SEC ID N°: 25)	QQSNSYP LT (SEC ID N°: 26)
39B9 VL5	RASQDISSWLA (SEC ID N°: 27)	DASSLES (SEC ID N°: 25)	QQSNSYP LT (SEC ID N°: 26)
12A	RASQGISSWLA (SEC ID N°: 28)	DASSLES (SEC ID N°: 25)	QQSNSYP IT (SEC ID N°: 29)
5C	RASQGISSVDA (SEC ID N°: 30)	DASSLES (SEC ID N°: 25)	QQSNSYP IT (SEC ID N°: 31)

- 25 Los aminoácidos que incluyen las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) son como se definen en E.A. Kabat *et al.*, (Véase Kabat, EA, *et al.*, Sequences of Protein of immunological interest, Quinta Edición, US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office (1991)).

- 30 En la divulgación también se incluyen anticuerpos que se unen al mismo epítipo tal como los anticuerpos que se describen en el presente documento. Por ejemplo, los anticuerpos de la invención se unen de forma específica a IL-6R, en la que el anticuerpo se une a un epítipo que incluye uno o más restos de aminoácidos en la IL-6R humana

(por ejemplo, N° de Referencia P08887 en GenBank). Los anticuerpos de invención se unen de forma específica a IL-6Rc, en la que el anticuerpo se une a un epítipo que incluye uno o más restos de aminoácidos en la IL-6 humana (por ejemplo, N° de Referencia NP\_000591 en GenBank), IL-6R (por ejemplo, N° de Referencia P08887 en GenBank), o ambos.

5 Los expertos en la materia reconocerán que es posible determinar, sin experimentación excesiva, si un anticuerpo monoclonal (por ejemplo, anticuerpo monoclonal totalmente humano) tiene la misma especificidad que un anticuerpo monoclonal de la invención (por ejemplo, los clones 39B9 VL1, 39B9 VL5, 12A y 5C) determinando si el primero evita que el último se una a gp130. Si el anticuerpo monoclonal que se está sometiendo a ensayo compite con el anticuerpo monoclonal de la invención, como se muestra con una disminución en la unión con el anticuerpo monoclonal de la invención, entonces los dos anticuerpos monoclonales se unen al mismo epítipo, o a uno muy relacionado.

15 Un método alternativo para determinar si un anticuerpo monoclonal tiene la especificidad de anticuerpo monoclonal de la invención es incubar previamente el anticuerpo monoclonal de la invención con proteína IL-6Rc o IL-6R solubles (que normalmente es muy reactiva), y a continuación añadir el anticuerpo monoclonal que se está sometiendo a ensayo para determinar si se inhibe la capacidad del anticuerpo monoclonal que se está sometiendo a ensayo para unirse a IL-6Rc y/o tanto a IL-6Rc como a IL-6R. Si el anticuerpo monoclonal que se está sometiendo a ensayos se inhibe entonces, con toda probabilidad, tienen la misma especificidad epítópica, o funcionalmente equivalente que el anticuerpo monoclonal de la invención.

20 La identificación sistemática de anticuerpos monoclonales también se puede realizar, por ejemplo midiendo la activación mediada por el receptor de IL-6 receptor de las rutas de JAK/STAT y/o cascada de señalización de MAPK, y determinando si el anticuerpo monoclonal de ensayo es capaz de modular, bloquear, inhibir, reducir, antagonizar, neutralizar o de otro modo interferir con la señalización de IL-6.

30 Diversos procedimientos conocidos dentro de la técnica se pueden usar para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos frente a IL-6Rc y/o tanto a IL-6Rc como a IL-6R, o frente a derivados, fragmentos, análogos, homólogos u ortólogos de los mismos (Véase, por ejemplo, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow E, y Lane D, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Los anticuerpos totalmente humanos son moléculas de anticuerpo en las que toda la secuencia tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada, incluyendo las CDR, surgen a partir de genes humanos. En el presente documento, tales anticuerpos se denominan "anticuerpos humanos", o "anticuerpos totalmente humanos". Los anticuerpos monoclonales humanos se preparan, por ejemplo, usando los procedimientos que se describen en los Ejemplos que se proporcionan a continuación. Los anticuerpos monoclonales humanos también se pueden preparar usando la técnica de trioma; la técnica de hibridoma de linfocitos B humanos (véase Kozbor, *et al.*, 1983 *Immunol Today* 4: 72); y la técnica de hibridoma de EBV para producir anticuerpos monoclonales humanos (véase Cole, *et al.*, 1985 En: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Los anticuerpos monoclonales humanos se pueden usar y se pueden producir usando hibridomas humanos (véase Cote, *et al.*, 1983. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2026-2030) o mediante transformación de linfocitos B humanos con Virus de Epstein Barr *in vitro* (véase Cole, *et al.*, 1985 En: MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

45 Los anticuerpos se purifican con técnicas bien conocidas, tales como cromatografía por afinidad usando proteína A o proteína G, que proporcionan principalmente la fracción de IgG de suero inmunitario. Posteriormente, o como alternativa, el antígeno específico que es la diana de la inmunoglobulina buscada, o un epítipo de la misma, se puede inmovilizar en una columna para purificar el anticuerpo específico inmunitario mediante cromatografía de inmovilización. La purificación de inmunoglobulinas se analiza, por ejemplo, en D. Wilkinson (*The Scientist*, publicado por The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, N° 8 (17 de abril de 2000), pp. 25-28).

50 Los anticuerpos de la invención (por ejemplo, 39B9 VL1, 12A y 5C) son anticuerpos monoclonales totalmente humanos. Los anticuerpos monoclonales que bloquean, inhiben, reducen, antagonizan, neutralizan o de otro modo interfieren con la señalización celular mediada por IL-6Rc se generan, por ejemplo, mediante inmunización de un animal con IL-6Rc unida a membrana y/o soluble, tal como, por ejemplo, IL-6Rc de murino, rata o ser humano o un fragmento inmunogénico, derivado o variante del mismo. Como alternativa, el animal se inmuniza con células transfectadas con un vector que contiene una molécula de ácido nucleico que codifica IL-6Rc de modo que IL-6Rc se expresa y se asocia con la superficie de las células transfectadas. Como alternativa, los anticuerpos se obtienen mediante identificación sistemática de una biblioteca que contiene secuencias de dominio de unión a anticuerpo o a antígeno para unión a IL-6Rc. Esta biblioteca se prepara, por ejemplo, en bacteriófago como fusiones de proteína o péptido a una proteína de revestimiento de bacteriófago que se expresa en la superficie de las partículas de fago ensambladas y la codificación de secuencias de ADN contenidas dentro de las partículas del fago (es decir, "biblioteca de presentación de fagos"). A continuación, los hibridomas que resultan de las fusiones células de mieloma/linfocitos B se identifican sistemáticamente para reactividad hacia IL-6Rc y/o tanto hacia IL-6Rc como hacia IL-6R.

65 Los anticuerpos monoclonales se preparan, por ejemplo, usando métodos de hibridoma, tales como los que se describen en Kohler y Milstein, *Nature*, 256: 495 (1975). En un método de hibridoma, un ratón, hámster, u otro

animal hospedador apropiado, por lo general se inmuniza con un agente de inmunización para obtener linfocitos que producen o que son capaces de producir anticuerpos que se unirán de forma específica al agente de inmunización. Como alternativa, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*.

5 El agente de inmunización por lo general incluirá el antígeno de proteína, un fragmento del mismo o una proteína de fusión del mismo. Por lo general, si se desean células de origen humano, se usa cualquiera de los linfocitos de sangre periférica o se usan células de bazo o células de ganglios linfáticos si se desean fuentes de mamífero no  
10 humanas. Después, los linfocitos se fusionan con una línea de células inmortalizada usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Las líneas de células inmortalizadas normalmente son células de mamífero transformadas, en particular células de mieloma de origen roedor, bovino y humano. Normalmente, se usan líneas de células de mieloma de rata o de ratón. Las células de hibridoma se pueden cultivar en un medio de cultivo adecuado que contenga preferentemente una o más sustancias que inhiban el crecimiento o la supervivencia de las células inmortalizadas, sin fusionar. Por ejemplo, si las células precursoras carecen de la enzima hipoxantina  
15 guanina fosforribosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas por lo general incluirá hipoxantina, aminopterina, y timidina ("medio HAT"), cuyas sustancias impiden el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

20 Las líneas de células inmortalizadas preferentes son aquellas que se fusionan de forma eficaz, proporción a nivel de expresión de anticuerpo elevado estable con las células seleccionadas que producen anticuerpos, y son sensibles a un medio tal como medio HAT. Las líneas de células inmortalizadas más preferentes son líneas de mieloma murino, que se pueden obtener, por ejemplo, en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California y en la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Virginia. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales. (Véase Kozbor, J. *Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63).

30 El medio de cultivo en el que se cultivan las células hibridoma se puede someter a ensayo a continuación para la presencia de anticuerpos monoclonales dirigidos frente al antígeno. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por las células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA). Tales técnicas y ensayos se conocen en la técnica. La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se puede determinar, por ejemplo, con el análisis de Scatchard de Munson y Pollard, *Anal. Biochem.*, 107: 220 (1980). Además, en aplicaciones terapéuticas de anticuerpos monoclonales, es importante identificar anticuerpos que tengan un alto grado de especificidad y una afinidad de unión elevada hacia el antígeno diana.

35 Después de identificar las células de hibridoma deseadas, los clones se pueden subclonar con procedimientos de dilución limitante y se pueden cultivar con métodos convencionales. (Véase Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Algunos medios de cultivo adecuados para esta finalidad incluyen, por ejemplo, Medio de Eagle Modificado con Dulbecco y medio de RPMI-1640. Como alternativa, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como líquido ascítico en un mamífero.

45 Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden aislar o purificar a partir del medio de cultivo o fluido ascítico con procedimientos convencionales de purificación de inmunoglobulina tales como, por ejemplo, proteína A-Sepharose, cromatografía de hidroxilapatito, electroforesis en gel, diálisis, o cromatografía por afinidad. Los anticuerpos monoclonales también se pueden preparar con métodos de ADN recombinante, tales como los que se describen en el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.816.567. El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales de la invención se puede aislar y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótido que son capaces de unirse de forma específica a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos de murino). Las células de hibridoma de la invención sirven como una fuente preferente de tal ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células hospedadoras tales como células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células hospedadoras recombinantes. El ADN también se puede modificar, por ejemplo, mediante sustitución de la secuencia de codificación para dominios constantes de cadena pesada y ligera humana en lugar de las secuencias de murino homólogas (véase el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994)) o mediante unión covalente a la secuencia de codificación de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia de codificación para un polipéptido que no es inmunoglobulina. Tal polipéptido que no es inmunoglobulina se puede sustituir por los dominios constantes de un anticuerpo de la invención, o se puede sustituir por los dominios variables de un sitio de combinación de antígeno de un anticuerpo de la invención para crear un anticuerpo divalente quimérico.

#### Anticuerpos Humanos y Humanización de Anticuerpos

65 Los anticuerpos monoclonales de la invención son anticuerpos totalmente humanos. Estos anticuerpos son adecuados para administración a seres humanos sin provocar una respuesta inmunitaria por el ser humano frente a

la inmunoglobulina administrada.

Se genera un anticuerpo huIL-6Rc, por ejemplo, usando los procedimientos que se describen en los Ejemplos que se proporcionan a continuación.

5 En otros métodos alternativos, se desarrolla un anticuerpo huIL-6Rc, por ejemplo, usando métodos de presentación de fagos usando anticuerpos que contienen solamente secuencias humanas. Tales enfoques se conocen bien en la técnica, por ejemplo, en el documento WO92/0104 en el documento de Patente de Estados Unidos N° 6.521.404. En este enfoque, una biblioteca combinatoria de fagos que portan padres aleatorios de cadenas ligeras y pesadas se  
10 identifica sistemáticamente usando fuentes naturales o recombinantes de IL-6Rc o fragmentos de las mismas. En otro enfoque, se puede producir un anticuerpo huIL-6Rc con un proceso en el que al menos una etapa del proceso incluye inmunización de un animal no humano, transgénico con proteína IL-6Rc humana. En este enfoque, algunos de los sitios de cadena pesada y/o ligera kappa endógenos de este animal no humano xenogénico sean discapacitado y son incapaces del reordenamiento necesario para generar genes que codifican inmunoglobulinas  
15 como respuesta a un antígeno. Además, al menos un sitio de cadena pesada humana y al menos un sitio de cadena ligera humana sean transfectados de forma estable en el animal. Por lo tanto, como respuesta a un antígeno administrado, los sitios humanos se reordenan para proporcionar genes que codifican regiones variables humanas inmunes específicas para el antígeno. Por lo tanto, después de la inmunización, el xenorratón produce linfocitos B que secretan inmunoglobulinas totalmente humanas.

20 En la técnica se conoce bien una diversidad de técnicas para producir animales no humanos xenogénicos. Por ejemplo, véanse los documentos de Patente de Estados Unidos N° 6.075.181 y N° 6.150.584. Esta estrategia general se demostró en conexión con la generación de las primeras cepas de Xenomouse™ como se publicó en 1994. Véase Green *et al.*, Nature Genetics 7: 13-21 (1994), Véanse también, los documentos de Patente de Estados  
25 Unidos N°s 6.162.963, 6.150.584, 6.114.598, 6.075.181, y 5.939.598 y los documentos de patentes japonesa N°s 3 068 180 B2, 3 068 506 B2, y 3 068 507 B2 y el documento de patente europea N° EP 0 463 151 B1 y las Solicitudes de Patente Internacional N°s WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 y miembros relacionados de la familia.

30 En un enfoque alternativo, otros han usado un enfoque de "minisito" en el que se imita un sitio de Ig exógeno a través de la inclusión de piezas (genes individuales) del sitio de Ig. Por lo tanto, se forma uno o más genes de VH, uno o más genes de DH, uno o más genes de JH, una región constante mu, y una secundar región constante (preferentemente una región constante gamma) en una construcción para inserción en un animal. Véanse, por  
35 ejemplo, los documentos de Patente de Estados Unidos N°s 5.545.806; 5.545.807; 5.591.669; 5.612.205; 5.625.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.643.763; 5.661.016; 5.721.367; 5.770.429; 5.789.215; 5.789.650; 5.814.318; 5.877.397; 5.874.299; 6.023.010; y 6.255.458; y documento de patente europea N° 0 546 073 B1; y Solicitudes de Patente Internacional N°s WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852, y WO 98/24884 y miembros relacionados de la familia.

40 También se ha demostrado la generación de anticuerpos humanos a partir de ratones en los que se han introducido, a través de fusión microcelular, grandes partes de cromosomas, o cromosomas enteros. Véanse las Solicitudes de Patente Internacional N°s 773 288 y 843 961.

45 Algunas respuestas de anticuerpo anti-ratón humano (HAMA) han llevado a la industria a preparar anticuerpos quiméricos o de otro modo humanizados. Aunque los anticuerpos quiméricos tienen una región constante humana y una región variable inmunitaria, se espera observar ciertas respuestas del anticuerpo anti-quimérico humano (HACA), en particular usos crónicos o de múltiples dosis del anticuerpo. Por lo tanto, sería deseable proporcionar anticuerpos totalmente humanos frente a IL-6Rc y/o tanto frente a IL-6Rc como a IL-6R para aliviar o de otro modo  
50 aliviar las preocupaciones y/o efectos de las respuestas de HAMA o HACA.

La producción de anticuerpos con inmunogenicidad reducida también se consigue mediante técnicas de humanización, quimerización y presentación usando bibliotecas apropiadas. Se observará que algunos anticuerpos murinos o anticuerpos de otras especies se pueden humanizar o primatizar usando técnicas bien conocidas en la técnica. Véase por ejemplo, Winter y Harris Immunol Today 14: 43 46 (1993) y Wright *et al.*, Crit, Reviews in  
55 Immunol. 12:125-168 (1992). El anticuerpo de interés se puede someter a ingeniería mediante técnicas de ADN recombinante para sustituir los dominios CH1, CH2, CH3, dominios bisagra, y/o el dominio marco con la secuencia humana correspondiente (véase el documento WO 92102190 y los documentos de Patente de Estados Unidos N°s 5.530.101; 5.585.089; 5.693.761; 5.693.792; 5.714.350; y 5.777.085). Además, en la técnica se conoce el uso de ADNc de Ig para construcción de genes quiméricos de inmunoglobulina quimérica (Liu *et al.*, P.N.A.S. 84: 3439 (1987) y J. Immunol. 139: 3521 (1987)). El ARNm se aísla de un hibridoma u otra célula que produce el anticuerpo y se usa para producir ADNc. El ADNc de interés se puede amplificar con la reacción en cadena de la polimerasa usando cebadores específicos (documentos de Patente de Estados Unidos N°s 4.683.195 y 4.683.202). Como alternativa, una biblioteca se prepara y se identifica sistemáticamente para aislar la secuencia de interés. La secuencia de ADN que codifica la región variable del anticuerpo a continuación se fusiona con secuencias de región  
60 constante humana. Las secuencias de genes de regiones constantes humanas genes se pueden encontrar en Kabat *et al.*, (1991) Sequences of Proteins of immunological Interest, publicación de N.I.H. n° 91-3242. Los genes de la

región C humana están fácilmente disponibles a partir de clanes conocidos. La elección del isotipo se guiará con las funciones efectoras deseadas, tales como fijación de complemento, o actividad en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo. Algunos isotipos preferentes son IgG1, IgG3 e IgG4. Se puede usar cualquiera de las regiones constantes de cadena ligera humana, kappa o lambda. A continuación, el anticuerpo humanizado, quimérico se expresa mediante métodos convencionales.

Algunos fragmentos de anticuerpo tales como Fv, F(ab')<sub>2</sub> y Fab se pueden preparar mediante escisión de la proteína intacta, por ejemplo, mediante proteasa o escisión química. Como alternativa, se diseña un gen truncado. Por ejemplo, un gen quimérico que codifica una porción del fragmento de F(ab')<sub>2</sub> incluiría a secuencias de ADN que codifican el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguido de un codón de parada de la traducción para producir la molécula truncada.

Las secuencias consenso de las regiones H y L J se pueden usar para diseñar oligonucleótidos para uso como cebadores a introducir sitios de restricción útiles en la región J para una unión posterior de segmentos de la región V con segmentos de la región C humana. El ADNc de la región C se puede modificar mediante mutagénesis dirigida al sitio para colocar un sitio de restricción en la posición análoga en la secuencia humana.

Algunos vectores de expresión incluyen plásmidos, retrovirus, YAC, episomas derivados de EBV, y similares. Un vector conveniente es uno que codifica una secuencia de inmunoglobulina de CH o CL humana funcionalmente completa, con sitios de restricción apropiados modificados por ingeniería de modo que cualquier secuencia de VH o VL se pueda insertar y expresar fácilmente. En tales vectores, normalmente se produce corte y empalme entre el sitio dador de corte y empalme en la región J insertada y el sitio aceptor de corte y empalme que precede a la región C humana, y también en las regiones de corte y empalme que se producen dentro de los exones de CH humanos. La poliadenilación y la terminación de la transcripción se producen en sitios cromosómicos nativos cadena debajo de las regiones de codificación. El anticuerpo quimérico resultante se puede unir mediante cualquier promotor fuerte, que incluye los LTR retrovirales, por ejemplo, el promotor temprano de SV-40, (Okayama *et al.*, Mol. Cell. Bio. 3: 280 (1983)), LTR del virus del sarcoma de Rous (Gorman *et al.*, P.N.A.S. 79: 6777 (1982)), y el LTR del virus de la leucemia murina de Moloney (Grosschedl *et al.*, Cell 41: 885 (1985)). Además, tal como se observará, se pueden usar promotores de Ig nativa y similares.

Además, se pueden generar anticuerpos humanos o anticuerpos de otras especies a través de tecnologías de tipo de presentación, que incluyen, pero no se limitan a, presentación de fagos, presentación retroviral, presentación de ribosomas, y otras técnicas, usando técnicas bien conocidas en la técnica y las moléculas resultantes se pueden someter a maduración adicional, tal como maduración por afinidad, dado que tales técnicas se conocen bien en la técnica. Wright *et al.*, Crit. Reviews en Immunol. 12:125-168 (1992), Hanes y Plückthun PNAS USA 94: 4937-4942 (1997) (presentasen de ribosomas), Parmley y Smith Gene 73:305-318 (1988) (presentación de fagos), Scott, TIBS, vol. 17: 241-245 (1992), Cwirla *et al.*, PNAS USA 87: 6378-6382 (1990), Russel *et al.*, Nucl. Acids Research 21: 1081-1085 (1993), Hoganboom *et al.*, Immunol. Reviews 130: 43-68 (1992), Chiswell y McCafferty TIBTECH; 10: 80-8A (1992), y el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.733.743. Si se usan tecnologías de presentación para producir anticuerpos que no son humanos, tales anticuerpos se pueden humanizar como se ha descrito anteriormente.

Usando estas técnicas, se pueden generar algunos anticuerpos para células que expresan IL-6Rc, formas solubles de IL-6Rc, epítopos o péptidos de los mismos, y bibliotecas de expresión de los mismos (Véase por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N° 5.703.057) que a partir de ese momento se pueden identificar sistemáticamente como se ha descrito anteriormente para las actividades que se describen en el presente documento.

Los anticuerpos huIL-6Rc de la invención se pueden expresar con un vector que contiene un segmento de ADN que codifica el anticuerpo de una sola cadena que se ha descrito anteriormente.

Estos pueden incluir vectores, liposomas, ADN desnudo, ADN asistido por adyuvante, pistola genética, catéteres, etc. Los vectores incluyen conjugados químicos tal como se describe en el documento de patente WO 93/64701, que tiene un resto de dirección (por ejemplo, un ligando para un receptor de superficie celular), y un resto de unión a ácido nucleico (por ejemplo, polilisina), vector viral (por ejemplo, un vector viral de ADN o de ARN) proteínas de fusión tal como se describe en el documento PCT/US 95/02140 (documento WO 95/22618) que es una proteína de fusión que contiene un resto diana (por ejemplo, un anticuerpo específico para una célula diana) y un resto de unión a ácido nucleico (por ejemplo, una protamina), plásmidos, fago, etc. Los vectores pueden ser cromosómicos, no cromosómicos o sintéticos.

Algunos vectores preferentes incluyen vectores virales, proteínas de fusión y conjugados químicos. Algunos vectores retrovirales incluyen virus de leucemia murina de Moloney. Son preferentes los vectores virales de ADN. Estos vectores incluyen vectores de viruela tales como vectores de ortopox o viruela aviar, vectores de virus del herpes tales como un vector de virus I del herpes simple (HSV) (véase Geller, A. I. *et al.*, J. Neurochem, 64: 487 (1995); Lim, F., *et al.*, en DNA Cloning: Mammalian Systems, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller, A. I. *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci.: U.S.A. 90: 7603 (1993); Geller, A. I., *et al.*, Proc Natl. Acad. Sci USA 87: 1149

(1990), Vectores de Adenovirus (véase LeGal LaSalle *et al.*, Science, 259: 988 (1993); Davidson, *et al.*, Nat. Genet 3: 219 (1993); Yang, *et al.*, J. Virol. 69: 2004 (1995) y Vectores de Virus Adeno-asociados (véase Kaplitt, M. G.. *et al.*, Nat. Genet. 8: 148 (1994).

- 5 Los vectores virales de la viruela introducen el gen en el citoplasma de las células. Los vectores de virus de la viruela aviar dan como resultado solamente una expresión a corto plazo del ácido nucleico. Los vectores de adenovirus, vectores de virus adeno-asociados y vectores de virus del herpes simple (HSV) son preferentes para introducir el ácido nucleico en células neutras. El vector de adenovirus da como resultado una expresión en un plazo más corto (aproximadamente 2 meses) que el virus adeno-asociado (aproximadamente 4 meses), que a su vez es más corto
- 10 que los vectores de HSV. El vector elegido en particular dependerá de la diana celular y la afección que se está tratando. La introducción se puede realizar mediante técnicas convencionales, por ejemplo infección, transfección, transducción o transformación. Algunos ejemplos de modos de transferencia genética incluyen por ejemplo, ADN desnudo, precipitación con CaPO<sub>4</sub>, dextrano de DEAE, electroporación, fusión de protoplastos, lipofección, microinyección celular, y vectores virales.
- 15 El vector se puede usar para dirigirse esencialmente a cualquier célula diana deseada. Por ejemplo, se puede usar inyección estereotáxica para dirigir los vectores (por ejemplo, adenovirus, HSV) a una ubicación deseada. Además, las partículas se pueden administrar mediante infusión intracerebroventricular (icv) usando un sistema de infusión con minibomba, tal como un Sistema de Infusión de SynchroMed. También se ha demostrado que un método basado en flujo en volumen, denominado convección, es eficaz para la administración de moléculas grandes a zonas
- 20 extensas del cerebro y puede ser útil en la administración del vector a la célula diana. (Véase Bobo *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2076-2080 (1994); Morrison *et al.*, Am. J. Physiol. 266: 292-305 (1994)). Otros métodos que se pueden usar incluyen catéteres, inyecciones intravenosas, parenteral, intraperitoneal y subcutánea, y oral u otras vías de administración conocidas.
- 25 Estos vectores se pueden usar para expresar grandes cantidades de anticuerpos que se pueden usar en una diversidad de formas. Por ejemplo, para detectar la presencia de IL-6Rc y/o IL-6R en una muestra. El anticuerpo también se puede usar para intentar unirse a y alterar la señalización relacionada con IL-6Rc.
- 30 Algunas técnicas se pueden adaptar para la producción de anticuerpos de cadena simple específicos para una proteína antigénica de la invención (véase por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N° 4.946.778). Además, algunos métodos se pueden adaptar para la construcción de bibliotecas de expresión de F<sub>ab</sub> (véase por ejemplo, Huse, *et al.*, 1989 Science 246: 1275-1281) para permitir una identificación rápida y eficaz de fragmentos de F<sub>ab</sub> monoclonal con la especificidad deseada para una proteína o derivados, fragmentos, análogos u homólogos
- 35 de los mismos. Algunos fragmentos de anticuerpo que contienen los idiotipos para un antígeno de proteína se pueden producir con técnicas conocidas en la técnica que incluyen, pero no se limitan a: (i) un fragmento de F<sub>(ab')<sub>2</sub></sub> producido mediante digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo; (ii) un fragmento de F<sub>ab</sub> generado mediante la reducción de los puentes disulfuro de un fragmento de F<sub>(ab')<sub>2</sub></sub>; (iii) un fragmento de F<sub>ab</sub> generado mediante el tratamiento de la molécula de anticuerpo con papaína y un agente reductor y (iv) fragmentos de F<sub>v</sub>.
- 40 La invención también incluye fragmentos anti-IL-6R de F<sub>v</sub>, F<sub>ab</sub>, F<sub>ab'</sub> y F<sub>(ab')<sub>2</sub></sub> o fragmentos de complejo anti-IL-6Rc, anticuerpos anti-IL-6R de una sola cadena o anti-IL-6Rc, anticuerpos anti-IL-6R biespecíficos, y/o anticuerpos anti-IL-6Rc, y anticuerpos anti-IL-6R y/o anti-IL-6Rc heteroconjugados.
- 45 Los anticuerpos biespecíficos son anticuerpos que tienen especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para IL-6Rc o IL-6R. La segunda diana de unión es cualquier otro antígeno, y de forma ventajosa es una proteína de superficie celular o receptor o su unidad de receptor.
- 50 En la técnica se conocen algunos métodos para preparar anticuerpos biespecíficos. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada/cadena ligera de inmunoglobulina, en los que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature, 305: 537-539 (1983)). Debido a la selección aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de diez moléculas de anticuerpo diferentes, de las que
- 55 solamente una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta normalmente se consigue mediante etapas de cromatografía por afinidad. Algunos procedimientos similares se desvelan en el documento de patente WO 93/08829, publicado el 13 de mayo de 1993, y en Trauneker *et al.*, EMBO J., 10: 3655-3659 (1991).
- 60 Algunos dominios varían desde anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación de anticuerpo-antígeno) se pueden fusionar con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se realiza preferentemente con un dominio constante de cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra, CH2, y CH3. Es preferente tener la primera región constante de cadena pesada (CH1) que contiene el sitio necesario para unión de la cadena ligera presente en al menos una de las fusiones. Los ADN
- 65 que codifican las fusiones de cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados, y se cotransfectan en un organismo hospedador

adecuado. Para detalles adicionales de generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121: 210 (1986).

5 De acuerdo con otro enfoque que se describe en el documento WO 96/27011, la superficie de contacto entre un par de moléculas de anticuerpos se puede modificar por ingeniería para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan a partir del cultivo de células recombinantes. La superficie de contacto preferente comprende al menos una parte de la región CH3 de un dominio constante de anticuerpo. En este método, una o más cadenas laterales de aminoácido pequeño de la superficie de contacto de la primera molécula de anticuerpos se sustituyen con cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). En la superficie de contacto de la segunda molécula de anticuerpo se crean "cavidades" de compensación de tamaño idéntico o similar con respecto a la cadena o cadenas laterales grandes mediante la sustitución de cadenas laterales de aminoácidos grandes con otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para aumentar el rendimiento de heterodímero con respecto a otros productos finales no deseados tales como homodímeros.

15 Algunos anticuerpos biespecíficos se pueden preparar como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos de  $F(ab')_2$ ). En la bibliografía se han descrito algunas técnicas para la generación de anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, algunos anticuerpos biespecíficos se pueden preparar usando unión química. Brennan *et al.*, *Science* 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que algunos anticuerpos intactos se escinden de forma proteolítica para generar fragmentos de  $F(ab')_2$ . Estos fragmentos se reducen en presencia de del agente de formación de complejos de ditiol, arsenito sódico, para estabilizar los ditiolos vecinos y para evitar la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos de Fab' generados a continuación se convierten en derivados de tionitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados de Fab'-TNB se reconvierte en el Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado de Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Los anticuerpos biespecíficos producidos se pueden usar como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

30 Además, algunos fragmentos de Fab' se pueden recuperar directamente de *E. coli* se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.* 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de  $F(ab')_2$  de anticuerpo biespecífico totalmente humanizado. Cada fragmento de Fab' se secreto por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico. El anticuerpo biespecífico formado de este modo era capaz de unirse a células que sobreexpresaban el receptor ErbB2 y linfocitos T humanos normales, así como de desencadenar la actividad lítica de linfocitos citotóxicos humanos con respecto a dianas de tumor de mama humano.

35 También se han descrito diversas técnicas para preparar y aislar fragmentos de anticuerpo biespecífico directamente a partir de cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.* 148 (5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión genética. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y a continuación para volver a oxidarlos para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este método también se puede usar para la producción de homodímeros de anticuerpo. La tecnología de "diacuerpo" que se describe en Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) a proporcionar un mecanismo alternativo para la preparación de fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) con un conector que es demasiado corta como para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un fragmento se ven forzados a emparejarse con los dominios  $V_L$  y  $V_H$  complementarios de otro fragmento, formando de este motor dos sitios de unión al antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpo biespecífico mediante el uso de dímeros de Fv de una sola cadena (sFv). Véase, Gruber *et al.*, *J. Immunol.* 152: 5368 (1994).

50 Se contemplan algunos anticuerpos con más de dos valencias. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos trispecíficos. Tutt *et al.*, *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

55 Algunos anticuerpos biespecíficos a modo de ejemplo se pueden unir a dos epítomos diferentes, al menos uno de los cuales se origina en el antígeno de proteína de la invención. Como alternativa, un brazo anti-antigénico de una molécula de inmunoglobulina se puede combinar con un brazo que se une a una molécula de estimulación en un leucocito tal como una molécula receptora de linfocitos T (por ejemplo, CD2, CD3, CD28, o B7), o receptores de Fc para IgG (FcγR), tales como FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) y FcγRIII (CD16) con el fin de centrarse en mecanismos de defensa celular para la célula que expresan el antígeno en particular. Algunos anticuerpos biespecíficos también se pueden usar para dirigir agentes citotóxicos a células que expresan un antígeno en particular. Estos anticuerpos poseen un brazo de unión al antígeno y un brazo que une a un agente citotóxico o un agente quelante de radionúclido, tal como EOTUBE, DPTA, DOTA, o TETA. Otro anticuerpo biespecífico de interés se une al antígeno de proteína que se describe en el presente documento y adicionalmente se une al factor tisular (TF).

65 Dentro del alcance de la presente invención también se encuentran algunos anticuerpos de heteroconjugado. Los anticuerpos de heteroconjugado están formados por dos anticuerpos unidos de forma covalente. Tales anticuerpos

se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (Véase el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.676.980), y para tratamiento de infección por VIH (véanse los documentos WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Se contempla que los anticuerpos se pueden preparar *in vitro* usando métodos conocidos en química de proteína de síntesis, incluyendo los agentes de reticulación implicados. Por ejemplo, algunas inmunotoxinas se pueden construir usando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace de tioéter. Algunos ejemplos de reactivos adecuados para esta finalidad incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptobutirimidato y los que se desvelan, por ejemplo, en el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.676.980.

10 Puede ser deseable modificar el anticuerpo de la invención con respecto a la función efectora, con el fin de aumentar, por ejemplo, la eficacia del anticuerpo en el tratamiento de enfermedades y trastornos asociados con la señalización anómala de IL-6. Por ejemplo, se pueden introducir un resto o restos de cisteína en la región de Fc, permitiendo de este modo la formación de enlaces disulfuro intercadenas en esta región. El anticuerpo homodimérico generado de este modo puede presentar un aumento de la capacidad de internalización y/o aumento de la eliminación celular mediada por complemento y citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). (Véase Caron *et al.*, J. Exp Med., 176: 1191-1195 (1992) y Shopes, J. Immunol., 148: 2918-2922 (1992)). Como alternativa, un anticuerpo se puede modificar por ingeniería para que tenga regiones de Fc dobles y por lo tanto puede presentar un aumento de la lisis de anticuerpo y capacidades de ADCC. (Véase Stevenson *et al.*, Anti-Cancer Drug Design, 3: 219-230 (1989)).

20 La invención también se refiere a inmunoconjugados que comprenden un anticuerpo conjugado con un agente citotóxico tal como una toxina (por ejemplo, una toxina enzimática mente activa de origen bacteriano, fúngico, vegetal, o animal, o fragmentos de los mismos), o un isótopo radiactivo (*es decir*, un radioconjugado).

25 Algunas toxinas enzimáticamente activas y fragmentos de las mismas que se pueden usar incluyen cadena de difteria A, fragmentos activos de no unión de toxina de difteria, cadena de exotoxina A (de *Pseudomonas aeruginosa*), cadena de ricina A, cadena de abrina A, cadena de modeccina A, alfa-sarcina, proteínas de *Aleurites fordii*, proteínas de diantina, proteínas de *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, y PAP-S), inhibidor de *Momordica charantia*, curcuma, crotina, inhibidor de *Sapaonaria officinalis*, gelonina, mitogellina, restrictocina, fenomicina, enomicina, y los tricotecenos. Se dispone de una diversidad de radionúclidos para la producción de anticuerpos radioconjugados. Algunos ejemplos incluyen  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$ , y  $^{186}\text{Re}$ .

35 Algunos conjugados del anticuerpo y del agente citotóxico se preparan usando una diversidad de agentes de acoplamiento de proteína bifuncionales tales como propionato de N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como HCl de adipimidato de dimetilo), ésteres activos (tales como suberato de disuccinimidilo), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos bis-azido (tal como bis (p-azidobenzoil) hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazo-niumbenzoil)-etilendiamina), diisocianatos (tales como 2,6-diisocianato de tolueno), y compuestos de flúor bis-activos (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno). Por ejemplo, una inmunotoxina de ricina se puede preparar se puede preparar como se describe en Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987). El ácido 1-isotiocianatobencil-3-metildietilén triaminpentaacético etiquetado con carbono 14 (MX-DTPA) es un agente de quelación o modo de ejemplo para conjugación de radionucleótido con el anticuerpo. (Véase el documento WO94/11026).

45 Los expertos habituales en la materia reconocerán que una gran diversidad de posibles restos pueden acoplarse a los anticuerpos resultantes de la invención. (Véase, por ejemplo, "Conjugate Vaccines", Contributions to Microbiology and Immunology, J. M. Cruse y R. E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989)).

50 El acoplamiento se puede conseguir mediante cualquier reacción química que unirá las dos moléculas siempre y cuando el anticuerpo y el otro resto mantengan sus respectivas actividades. Esta unión puede incluir muchos mecanismos químicos, por ejemplo unión covalente, unión por afinidad, intercalación, unión coordinada y formación de complejos. La unión preferente es, sin embargo, la unión covalente. La unión covalente se puede conseguir ya sea mediante condensación directa de cadenas laterales existentes o mediante la incorporación de moléculas de formación de puentes externos. Muchos agentes de unión, bivalentes o polivalentes, son útiles para el acoplamiento de moléculas de proteína, tales como los anticuerpos de la presente invención, a otras moléculas. Por ejemplo, algunos agentes de acoplamiento representativos pueden incluir compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldehído, diazobencenos y hexametilén diaminas. Este listado no pretende ser exhaustivo de las diversas clases de agentes de acoplamiento conocidos en la técnica pero, sin embargo, es un ejemplo de los reactivos de acoplamiento más comunes. (Véase Killen y Lindstrom, Jour. Immun. 133: 1335-2549 (1984); Jansen *et al.*, Immunological Reviews 62: 185-216 (1982); y Vitetta *et al.*, Science 238: 1098 (1987)).

65 En la bibliografía se describen algunos conectores preferentes. (Véase, por ejemplo, Ramakrishnan, S. *et al.*, Cancer Res. 44: 201-208 (1984) que describe el uso de MBS (éster de M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida). Véase también, el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.030.719, que describe el uso de derivado de acetil hidrazida halogenada acoplado con un anticuerpo por medio de un conector oligopeptídico. Algunos conectores particularmente preferentes incluyen: (i) EDC, clorhidrato de (1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida; (ii) SMPT,

(4-succinimidiloxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)-tolueno (Pierce Chem. Co., Cat. (21558G); (iii) SPDP, hexanoato de (succinimidil-6 [3-(2-piridilditio) propionamido] (Pierce Chem. Co., N° de Cat 21651G); (iv) Sulfo-LC-SPDP, hexanoato de (sulfosuccinimidil 6 [3-(2-piridilditio)-propianamida] (Pierce Chem. Co. N° de Cat 2165-G); y (v) sulfo-NHS (N-hidroxisulfo-succinimida: Pierce Chem. Co., N° de Cat 24510) conjugado con EDC.

5 Los conectores que se han descrito anteriormente contienen componentes que tienen diferentes atributos, conduciendo de este modo a conjugados con diferentes propiedades fisicoquímicas. Por ejemplo, los ésteres de sulfo-NHS de carboxilatos de alquilo son más estables que los ésteres de sulfo-NHS de carboxilatos aromáticos. Los conectores que contienen éster de NHS son menos solubles que los ésteres de sulfo-NHS. Además, el conector  
10 SMPT contiene un enlace disulfuro impedido estéricamente, y puede formar conjugados con aumento de la estabilidad. En general, los enlaces disulfuro son menos estables que otros enlaces porque el enlace disulfuro se escinde *in vitro*, dando como resultado un conjugado menos disponible. El sulfo-NHS, en particular, puede aumentar la estabilidad de acoplamientos de carbodimida. Los acoplamientos de carbodimida (tal como EDC) cuando se usan  
15 en conjunto con sulfo-NHS, forman ésteres que son más resistentes a la hidrólisis que la reacción de acoplamiento de carbodimida sola.

Los anticuerpos que se desvelan en el presente documento también se pueden formular como inmunoliposomas. Los liposomas que contienen el anticuerpo se preparan con métodos conocidos en la técnica, tal como se describe  
20 en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y los documentos de Patente de Estados Unidos N°s 4.485.045 y 4.544.545. En el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.013.556 se desvelan algunos liposomas con aumento del tiempo de circulación.

Se pueden generar liposomas particularmente útiles con el método de evaporación en fase inversa con una  
25 composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol, y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para producir liposomas con el diámetro deseado. Algunos fragmentos de Fab' del anticuerpo de la presente invención se pueden conjugar con los liposomas como se describe en Martin *et al.*, J. Biol. Chem., 257: 286-288 (1982) a través de una reacción de intercambio de disulfuro.

### 30 Uso de anticuerpos frente a IL-6Rc

Se observará que la administración de entidades terapéuticas de acuerdo con la invención se realizará con  
vehículos, excipientes, y otros agentes adecuados que se incorporan en formulaciones para proporcionar una mejora  
35 de la transferencia, administración, tolerancia, y similares. Se puede encontrar una multitud de formulaciones apropiadas en el libro de formulación conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's Pharmaceutical Sciences (15ª ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), en particular en el Capítulo 87 de Blaug, Seymour, en el mismo. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, gelatinas, ceras, aceites, lípidos, vesículas que contienen lípidos (catiónicos o aniónicos) (tal como Lipofectin™), conjugados de ADN, pastas anhidras  
40 de absorción, emulsiones de aceite en agua y de agua en aceite, emulsiones de Carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos, y mezclas semisólidas que contienen Carbowax. Cualquiera de las mezclas mencionadas anteriormente puede ser apropiada en tratamientos y terapias de acuerdo con la presente invención, con la condición de que el principio activo en la formulación no se inactive con la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véase también Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32 (2): 210-8  
45 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203 (1-2): 1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." J Pharm Sci. 89 (8): 967-78 (2000), Powell *et al.*, "Compendium of excipients for parenteral formulations" PDA J Pharm Sci Technol. 52: 238-311 (1998) y las citas en el mismo para información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y vehículos bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

50 En una realización, los anticuerpos de la invención, que incluyen un anticuerpo monoclonal de la invención (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal totalmente humano), se pueden usar como agentes terapéuticos. Por lo general tales agentes se usarán para diagnosticar, pronosticar, controlar, tratar, aliviar, y/o prevenir una enfermedad o patología asociada con la señalización anómala de IL-6 objeto. Un régimen terapéutico se realiza mediante la  
55 identificación de un sujeto, por ejemplo, un paciente humano que padece (o que está en riesgo de desarrollar) una enfermedad o trastorno asociados con la señalización anómala de IL-6, por ejemplo, un trastorno inflamatorio tal como artritis reumatoide, usando métodos convencionales. Una preparación de anticuerpo, preferentemente una que tenga especificidad y afinidad elevadas hacia su antígeno diana, se administra al sujeto y por lo general tendrá un efecto debido a su unión con la diana. La administración del anticuerpo puede anular o inhibir o interferir con la  
60 función de señalización de la diana (por ejemplo, IL-6Rc). La administración del anticuerpo puede anular o inhibir o interferir con la unión de la diana (por ejemplo, IL-6Rc) con un ligando endógeno (por ejemplo, gp130) al que se une de forma natural. Por ejemplo, el anticuerpo se une a la diana y modula, bloquea, inhibe, reduce, antagoniza, neutraliza, o de otro modo interfiere con la señalización de IL-6.

65 Algunas enfermedades o trastornos relacionados con la señalización anómala de IL-6 incluyen septicemia, cáncer (por ejemplo, enfermedad de mieloma múltiple (MM), carcinoma de células renales (RCC), leucemia de células

plasmáticas, linfoma, trastorno B-linfoproliferativo (BLPD), y cáncer de próstata), resorción ósea, osteoporosis, caquexia, psoriasis, glomerulonefritis proliferativa mesangial, sarcoma de Kaposi, linfoma relacionado con SIDA, y enfermedades inflamatorias (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil de inicio sistémico, hipergammaglobulinemia, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus sistémico eritematoso (SLE), esclerosis múltiple, enfermedad de Castleman, gammapatía de IgM, mixoma cardíaco, asma, asma alérgica y diabetes mellitus dependiente de insulina autoinmunitaria).

Algunos síntomas asociados con trastornos relacionados con la inflamación incluyen, por ejemplo, inflamación, fiebre, malestar general, fiebre, dolor, a menudo localizado en la zona inflamada, ritmo de pulso rápido, dolor o molestias en articulaciones (artralgia), respiración rápida u otros patrones respiratorios anómalos, escalofríos, confusión, desorientación, agitación, mareos, tos, disnea, infecciones pulmonares, insuficiencia cardíaca, insuficiencia respiratoria, edema, aumento de peso, recaídas mucopurulentas, caquexia, sibilancias, dolor de cabeza y síntomas abdominales tales como, por ejemplo, dolor abdominal, diarrea o estreñimiento. Algunos síntomas asociados con trastornos relacionados con el sistema inmunitario incluyen, por ejemplo, inflamación, fiebre, pérdida de apetito, pérdida de peso, síntomas abdominales tales como, por ejemplo, dolor abdominal, diarrea o estreñimiento, dolor con molestias en las articulaciones (artralgia), fatiga, erupción cutánea, anemia, sensibilidad extrema al frío (fenómeno de Raynaud), debilidad muscular, fatiga muscular, cambios en la piel o en el tono tisular, falta de aire u otros patrones respiratorios anómalos, dolor en el pecho u opresión de los músculos del pecho, ritmo cardíaco anómalo (por ejemplo, elevado o reducido), sensibilidad a la luz, visión borrosa o de otro modo anómala, y reducción de la función orgánica.

Una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo de la invención por lo general se refiere a la cantidad necesaria para conseguir un objetivo terapéutico. Como se ha indicado anteriormente, esto puede ser una interacción de unión entre el anticuerpo y su antígeno diana que, en ciertos casos, interfiere con el funcionamiento de la diana. La cantidad necesaria para administrar dependerá también de la afinidad de unión del anticuerpo para su antígeno específico, y también dependerá de la tasa a la que un anticuerpo administrado se agota a partir del volumen libre de otro sujeto al que se administra. Algunos intervalos comunes para dosificación terapéuticamente eficaz de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención pueden ser, a modo de ejemplo una limitante, de aproximadamente 0,1 mg/kg de peso corporal a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal. Las frecuencias de dosificación habituales pueden variar, por ejemplo, de dos veces al día a una vez a la semana.

La eficacia del tratamiento se determina en asociación con cualquier método conocido para el diagnóstico o el tratamiento del trastorno relacionado con la inflamación en particular. El alivio de uno o más síntomas del trastorno relacionado con la inflamación indica que el anticuerpo proporciona un beneficio clínico.

Algunos métodos para la identificación sistemática de anticuerpos que poseen la especificidad deseada incluyen, pero no se limitan a, ensayo de inmunoabsorción unido a enzimas (ELISA) y otras técnicas mediadas de forma inmunológica conocidas dentro de la técnica.

En otra realización, se pueden usar anticuerpos dirigidos frente a IL-6Rc y/o tanto a IL-6Rc como a IL-6R en métodos conocidos dentro de la técnica que se relacionan con la localización y/o cuantificación de IL-6Rc (por ejemplo, para uso en la medida de los niveles de IL-6Rc y/o tanto de IL-6Rc como de IL-6R dentro de nuestras fisiológicas apropiadas, para uso en métodos de diagnóstico, para uso en formación de imágenes de la proteína, y similares). En una realización dada, los anticuerpos específicos para IL-6Rc y/o tanto para IL-6Rc como para IL-6R, o derivado, fragmento, análogo u homólogo de los mismos, que contienen el dominio de unión al antígeno derivado de anticuerpo, se usan como compuestos farmacológicamente activos (denominados "Agentes Terapéuticos" en lo sucesivo en el presente documento).

En otra realización, un anticuerpo específico para IL-6Rc se puede usar para aislar un polipéptido IL-6R, IL-6Rc, y/o IL-6, mediante técnicas convencionales, tales como inmunoafinidad, cromatografía o inmunoprecipitación. Algunos anticuerpos dirigidos frente a la proteína IL-6Rc y/o tanto a IL-6Rc como a IL-6R (o un fragmento de los mismos) se pueden usar de forma diagnóstica para controlar niveles de proteínas en tejido como parte, por ejemplo, de un procedimiento de ensayo clínico, por ejemplo para, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección se puede facilitar mediante acoplamiento (es decir, unión físicamente) del anticuerpo ha una sustancia detectable. Algunos ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminescentes, y materiales radiactivos. Algunos ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina,  $\beta$ -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; algunos ejemplos de complejos de grupo prostético incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; algunos ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; algunos ejemplos de materiales bioluminescentes incluyen luciferasa, luciferina, y aequorina, y algunos ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  o  $^3\text{H}$ .

Un anticuerpo de acuerdo con la invención se puede usar como un agente para detectar la presencia de proteína IL-6Rc y/o tanto IL-6Rc como IL-6R (o un fragmento de proteína del mismo) en una muestra. En algunas realizaciones, el anticuerpo contiene una etiqueta detectable. Algunos anticuerpos son policlonales, o más preferentemente,

monoclonales. Se usa un anticuerpo intacto, o un fragmento del mismo (por ejemplo,  $F_{ab}$ , scFv, o  $F_{(ab)2}$ ). El término "etiquetado", con respecto a la sonda o anticuerpo, pretende incluir etiquetado directo de la sonda o anticuerpo mediante acoplamiento (es decir, unión físicamente) de una sustancia detectable a la sonda o anticuerpo, así como etiquetado indirecto de la sonda o anticuerpo mediante reactividad con otro reactivo que se etiqueta directamente.

5 Algunos ejemplos de etiquetado indirecto incluyen detección de un anticuerpo primario usando un anticuerpo secundario etiquetado con fluorescencia y un etiquetado terminal de una sonda de ADN con biotina de modo que se puede detectar con estreptavidina etiquetada con fluorescencia. La expresión "muestra biológica" pretende incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Por lo tanto, dentro del uso de la expresión "muestra biológica", se incluye sangre y una fracción componente  
10 de sangre que incluye suero sanguíneo, plasma sanguínea, o linfa. Es decir, el método de detección de la invención se puede usar para detectar ARNm de analito, proteína o ADN genómico en una muestra biológica *in vitro* así como *in vivo*. Por ejemplo, algunas técnicas *in vitro* para detección de un ARNm de analito incluyen hibridaciones de Northern e hibridaciones *in situ*. Algunas técnicas *in vitro* para detección de una proteína de analito incluyen ensayos de inmunoabsorción unidos a enzimas (ELISA), transferencias de Western, inmunoprecipitaciones, e  
15 inmunofluorescencia. Algunas técnicas *in vitro* para detección de un ADN genómico de analito incluyen hibridaciones de Southern. Algunos procedimientos para realizar inmunoensayos que describen, por ejemplo en "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J. R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis y T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996; y "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Además, algunas  
20 técnicas *in vivo* para detección de una proteína de analito incluyen la introducción en un sujeto de un anticuerpo de proteína anti-analito etiquetada. Por ejemplo, el anticuerpo se puede etiquetar con un marcador radiactivo cuya presencia y ubicación en un sujeto se pueden detectar mediante técnicas convencionales de formación de imágenes.

## 25 **Administración Terapéutica y Formulaciones de anticuerpos huLL-6Rc**

Los anticuerpos de la invención (también denominados en el presente documento "compuestos activos"), y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos, se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para administración. Los principios y consideraciones implicados en la preparación de tales  
30 composiciones, así como las directrices en la elección de los componentes se proporcionan, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences: The Science And Practice Of Pharmacy 19<sup>a</sup> ed. (Alfonso R. Gennaro, *et al.*, editores) Mack Pub. Co., Easton, Pa. : 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers Langhorne, Pa., 1994; y Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

35 Por lo general, tales composiciones comprenden el anticuerpo y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Cuando se usan fragmentos de anticuerpo, es preferente el fragmento inhibidor más pequeño que se une de forma específica al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, basándose en las secuencias de región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar moléculas de péptido que mantienen la capacidad para unirse a la secuencia de  
40 proteína diana. Tales péptidos se pueden sintetizar por vía química y/o se pueden producir mediante tecnología del ADN recombinante. (Véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)).

Como se usa en el presente documento, la expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes de isotónicos y de retraso de la solución, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Algunos vehículos adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia convencional en el campo. Algunos ejemplos preferentes de tales vehículos o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, soluciones de Ringer, solución de dextrosa, y albúmina de suero humano al 5 %. También se pueden usar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites no volátiles. En la técnica se conoce bien el  
50 uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, el uso de los mismos se contempla en las composiciones.

Las formulaciones a usar para administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a  
55 través de membranas de filtración estériles.

Una composición farmacéutica de la invención se formula para que sea compatible con su vía de administración pretendida. Algunos ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosal, y  
60 rectal. Algunas soluciones o suspensiones usadas para aplicación parenteral, intradérmica, o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites no volátiles, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes de quelación tales como ácido etilendiamintetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y  
65 agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro sódico o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido sódico. La preparación parenteral se puede incluir en ampollas,

jeringas desechables o viales de múltiples dosis fabricados con vidrio o plástico.

Algunas composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (que son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para administración intravenosa algunos vehículos adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debería ser fluida hasta el punto en el que pueda existir una capacidad de inyección fácil. Deben ser estables en las condiciones de preparación y almacenamiento y se deben conservar frente a la acción de la contaminación de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un medio disolvente o de dispersión que contenga, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un revestimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos se puede conseguir mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares. En muchos casos, será preferente incluir en la composición, agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro sódico. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se puede conseguir mediante la inclusión en la composición de un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio de gelatina.

Algunas soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del compuesto activo en la cantidad necesaria en un disolvente apropiado con un ingrediente o una combinación de ingredientes mencionados anteriormente, si fuera necesario, seguido de esterilización con filtración. Por lo general, las dispersiones se preparan mediante la incorporación del compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes necesarios a partir de los mencionados anteriormente. En el caso de polvos externos para la preparación de soluciones inyectables estériles, algunos métodos de preparación son secado vacío y liofilización que proporciona un polvo del principio activo más cualquier ingrediente adicional deseado a partir de una solución del mismo previamente filtrada de forma estéril.

Por lo general, las composiciones orales incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Estos se pueden incluir en cápsulas de gelatina o se pueden formar por compresión en comprimidos. Para la finalidad de la administración terapéutica oral, el compuesto activo se puede incorporar con excipientes y se puede usar en forma de comprimidos, trociscos, o cápsulas. Algunas composiciones orales también se pueden preparar usando un vehículo fluido para uso como un enjuague bucal, en las que el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se enjuaga y se expectora o se traga. Algunos agentes de unión y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles se pueden incluir como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de una naturaleza similar: un alucinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido alginico, Primogel, o almidón de maíz; un agente lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; una sustancia de deslizamiento tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo, o sabor a naranja.

Para administración mediante inhalación, los compuestos se administran en forma de una pulverización de aerosol a partir de un envase o dispensador presurizados que contiene un agente propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono, o un nebulizador.

La administración sistémica también puede se puede realizar por medios transmucosales o transdérmicos. Para administración transmucosal o transdérmica, en la formulación se usan agentes penetrantes apropiados para la barrera a permear. Tales agentes penetrantes por lo general se conocen en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, detergentes, sales biliares, y derivados del ácido fusídico. La administración transmucosal se puede realizar a través del uso de pulverizaciones nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, bálsamos, geles o cremas como se conoce por lo general en la técnica.

Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorio convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para administración rectal.

En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto frente a la rápida eliminación del organismo, tales como formulaciones de liberación sostenida/controlada, que incluyen implantes sistemas de administración microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Algunos métodos para la preparación de tales formulaciones serán evidentes para los expertos en la materia.

Por ejemplo, los principios activos se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas

de coacervación mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas coloidales de administración del fármaco (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas, y nanocápsulas) o en macroemulsiones.

5 Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Algunos ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen anticuerpos, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o micro cápsulas. Algunos ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (documento de Patente de Estados Unidos N° 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$  etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables formadas por copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Aunque los polímeros tales como acetato de etileno-vinil y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos.

Los materiales también se pueden obtener en el mercado en Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Algunas suspensiones liposomales (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales para antígenos virales) también se pueden usar como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estas se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, como se describe en el documento de Patente de Estados Unidos N° 4.522.811.

Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenteral es en forma de unitaria de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. Forma unitaria de dosificación, como se usa en el presente documento, se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico necesario. La memoria descriptiva para las formas de unidad de dosificación de la invención se dictan y son dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico a conseguir en particular, y las limitaciones inherentes en la técnica de formación de compuestos tal como un compuesto activo para el tratamiento de individuos.

Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un envase, paquete, o dosificado junto con instrucciones para administración.

35 La formulación también puede contener más de un compuesto activo si fuera necesario para la indicación que se está tratando en particular, preferentemente aquellos con actividades complementarias que se influyen de forma adversa entre sí. Como alternativa, o además, la composición pueden comprender un agente que potencie su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citoquina, agente quimioterapéutico, o agente inhibidor del crecimiento. Tales moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para la finalidad pretendida.

En una realización, los compuestos activos se administran en terapia de combinación, es decir, se combinan con otros agentes, por ejemplo, agentes terapéuticos, que son útiles para el tratamiento de afecciones o trastornos patológicos, tales como diversas formas de cáncer, trastornos autoinmunitarios y enfermedades inflamatorias. La expresión "en combinación" en este contexto se refiere a que los agentes se administran básicamente de forma contemporánea, ya sea de forma simultánea o de forma secuencial. Si se administran de forma secuencial, al comienzo de la administración del segundo compuesto, el primero de los dos compuestos todavía es preferentemente detectable a concentraciones eficaces en el sitio de tratamiento.

50 Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir uno o más anticuerpos de la invención coformulados con, y/o coadministrados con, uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo, una o más citoquinas e inhibidores del factor de crecimiento, inmunosupresores, agentes antiinflamatorios, inhibidores metabólicos, inhibidores enzimáticos, y/o agentes citotóxicos o citostáticos, como se describe con más detalle a continuación. Tales terapias de combinación pueden usar, de forma ventajosa, dosificaciones menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando de este modo una posible toxicidad de sus complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

Algunos agentes terapéuticos usados en combinación con un anticuerpo de la invención son aquellos que interfieren en diferentes estadios en una respuesta inflamatoria. En una realización, uno o más anticuerpos descritos en el presente documento se pueden coformular con, y/o coadministrar con, uno o más agentes adicionales tales como otras citoquinas o antagonistas de factor de crecimiento (por ejemplo, receptores solubles, inhibidores peptídicos, moléculas pequeñas, fusiones de ligandos); o anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos que se unen a otras dianas (por ejemplo, anticuerpos que se unen a otras citoquinas o factores de crecimiento, sus receptores, u otras moléculas de superficie celular); y citoquinas antiinflamatorias o agonistas de las mismas.

En otras realizaciones, los anticuerpos de la invención se usan como adyuvantes de vacuna frente a trastornos autoinmunitarios, enfermedades inflamatorias, etc. La combinación de adyuvantes para tratamiento de estos tipos de trastornos es adecuada para uso en combinación con una gran diversidad de antígenos a partir de autoantígenos dirigidos, es decir, autoantígenos, implicados en la inmunidad, por ejemplo, proteína básica de mielina; autoantígenos inflamatorios, por ejemplo, proteína de péptido amiloide, o antígenos de trasplante, por ejemplo, aloantígenos. El antígeno puede comprender péptidos o polipéptidos derivados de proteínas, así como fragmentos de cualquiera de los siguientes: sacáridos, proteínas, polinucleótidos u oligonucleótidos, autoantígenos, proteína de péptido amiloide, antígenos de trasplante, alérgenos, u otros componentes macromoleculares. En algunos casos, en la composición antigénica se incluye más de un antígeno.

### **Diseño y Generación de Otro Agente Terapéutico**

Basándose en la actividad de los anticuerpos que se producen y se caracterizan en el presente documento con respecto al IL-6Rc, se facilita el diseño de otras modalidades terapéuticas más allá de restos de anticuerpo. Tales modalidades incluyen, sin limitación, agentes terapéuticos de anticuerpo avanzados, tales como anticuerpos biespecíficos, inmunotoxinas, y agentes terapéuticos radioetiquetados, generación de agentes terapéuticos peptídicos, terapias genéticas, en particular intracuerpos, agentes terapéuticos antisentido, y moléculas pequeñas.

Por ejemplo, en conexión con anticuerpos biespecíficos, se pueden generar algunos anticuerpos biespecíficos que comprende (i) dos anticuerpos – uno con una especificidad para IL-6Rc y/o tanto para IL-6Rc como para IL-6R y otro para una segunda molécula que se conjugan en conjunto, (ii) un solo anticuerpo que tiene o una cadena específica para IL-6Rc y/o tanto para IL-6Rc como para IL-6R y una segunda cadena específica para una segunda molécula, o (iii) un anticuerpo de una sola cadena que tiene especificidad para IL-6Rc y/o tanto para IL-6Rc como para IL-6R y una segunda molécula. Tales anticuerpos biespecíficos se generan usando técnicas que se conocen bien, por ejemplo, en relación con (i) y (ii) Véase por ejemplo, Fanger *et al.*, Immunol Methods 4: 72-81 (1994) y Wright *et al.*, Crit. Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992), y en relación con (iii) Véase por ejemplo, Traunecker *et al.*, Int. J. Cancer (Supl.) 7: 51-52 (1992).

En relación con inmunotoxinas, algunos anticuerpos se pueden modificar para que actúen como inmunotoxinas usando técnicas que se conocen bien en la técnica. Véase por ejemplo, Vitetta Immunol Today 14: 252 (1993). Véase también el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.194.594. En relación con la preparación de anticuerpos radioetiquetados, tales anticuerpos modificados también se pueden preparar fácilmente usando técnicas que se conocen bien en la técnica. Véase por ejemplo, Junghans *et al.*, en Cancer Chemotherapy and Biotherapy 655-686 (2ª edición, Chafner y Longo, eds., Lippincott Raven (1996)). Véanse también los documentos de Patente de Estados Unidos N°s 4.681.581, 4.735.210, 5.101.827, 5.102.990 (RE 35,500), 5.648.471, y 5.697.902. Sería probable que cada una de las inmunotoxinas y moléculas radioetiquetadas eliminaran células que expresan IL-6Rc.

En relación con la generación de péptidos terapéuticos, a través del uso de información estructural relacionada con IL-6Rc y/o tanto con IL-6Rc como con IL-6R y anticuerpos de las mismas, tales como los anticuerpos de la invención o identificación sistemática de bibliotecas de péptidos, se pueden generar péptidos terapéuticos que se dicen frente a IL-6Rc y/o tanto a IL-6Rc como a IL-6R. El diseño y la identificación sistemática de agentes terapéuticos peptídicos se analizan en relación con Houghten *et al.*, Biotechniques 13: 412-421 (1992), Houghten PNAS USA 82: 5131-5135 (1985), Pinalla *et al.*, Biotechniques 13: 901-905 (1992), Blake y Litz-Davis BioConjugate Chem. 3: 510-513 (1992). También se pueden preparar inmunotoxinas y moléculas radioetiquetadas, y de una manera similar, en relación con restos peptídicos como se ha analizado anteriormente en relación con anticuerpos. Suponiendo que la molécula de IL-6Rc y/o tanto la de IL-6Rc como la de IL-6R (o una forma, tal como una variante de corte y empalme o forma alternativa) sea funcionalmente activa en un proceso de enfermedad, también será posible diseñar agentes terapéuticos genéticos y antisentido de los mismos a través de técnicas convencionales. Tales modalidades se pueden usar para modular la función de IL-6Rc. En relación con los mismos, los anticuerpos de la presente invención facilitan el diseño y uso de ensayos funcionarios relacionados con los mismos. Un diseño y estrategia para agentes terapéuticos antisentido se analiza con detalle en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 94/29444. El diseño y las estrategias de terapia genética se conocen bien. Sin embargo, en particular, el uso de técnicas de terapia genética que implican intracuerpos podría demostrar que es particularmente ventajoso. Véase por ejemplo, Chen *et al.*, Human Gene Therapy 5: 595-601 (1994) y Marasco Gene Therapy 4: 11-15 (1997). El diseño general y consideraciones relacionadas con agentes terapéuticos genéticos también se analiza en la Solicitud de Patente Internacional N° WO 97/38137.

El conocimiento deducido a partir de la estructura de la molécula de IL-6Rc y sus interacciones con los anticuerpos de la invención, se puede usar para el diseño de forma racional de modalidades terapéuticas adicionales. En este sentido, se pueden usar técnicas racionales de diseño de fármacos tales como cristalografía de rayos X, formación de modelos moleculares con ayuda de ordenador (o asistidos por) (CAMM), relación de estructura-actividad cuantitativa o cualitativa (QSAR), y tecnologías similares para centrarse en esfuerzos de descubrimiento de fármacos. El diseño racional permite la predicción de estructuras de proteína o sintéticas que pueden interactuar con la molécula o formas específicas de la misma que se pueden usar para modificar o modular la actividad de IL-6Rc. Tales estructuras se pueden sintetizar por vía química o se pueden expresar en sistemas biológicos. Este enfoque se ha revisado en Capsey *et al.*, Genetically Engineered Human Therapeutic Drugs (Stockton Press, NY (1988)).

Además, en programas de identificación sistemática se pueden diseñar y sintetizar y usar bibliotecas combinatorias, tales como esfuerzos de identificación sistemática de alto rendimiento.

### **Métodos de Identificación Sistemática**

5 La divulgación proporciona métodos (también denominados "ensayos de identificación sistemática" en el presente documento) para identificar moduladores, es decir, compuestos o agentes candidatos o de ensayo (por ejemplo, péptidos, peptidomiméticos, moléculas pequeñas u otros fármacos) que modulando de otro modo interfieren con la  
10 con la función de señalización del receptor de IL-6. También se proporcionan métodos para identificar compuestos útiles para el tratamiento de trastornos asociados con la señalización anómala de IL-6.

En una realización, la divulgación proporciona ensayos para la identificación sistemática de compuestos candidatos o de ensayo que modulan la función de señalización de IL-6Rc. Los compuestos de ensayo se pueden obtener  
15 usando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos de biblioteca combinatoria conocidos en la técnica, que incluyen: bibliotecas biológicas; bibliotecas de fase sólida o de fase líquida paralelas que se pueden dirigir en el espacio; métodos de biblioteca sintética que necesitan desconvolución; el método de biblioteca de "una perla un compuesto"; y métodos de biblioteca sintética que usan selección de cromatografía por afinidad. El enfoque de biblioteca biológica se limita a bibliotecas de péptidos, aunque los otros cuatro enfoques se pueden aplicar a  
20 bibliotecas de compuestos peptídicos, oligómeros no peptídicos o de molécula pequeña. (Véase, por ejemplo Lam, 1997. *Anticancer Drug Design* 12: 145).

Una "molécula pequeña", como se usa en el presente documento, pretende hacer referencia a una composición que tiene un peso molecular inferior a aproximadamente 5 kD y lo más preferentemente inferior a aproximadamente 4  
25 kD. Algunas moléculas pequeñas pueden ser, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos, polipéptidos, peptidomiméticos, carbohidratos, lípidos u otras moléculas orgánicas o inorgánicas. En la técnica se conocen algunas bibliotecas de mezclas químicas y/o biológicas, tales como fúngicas, bacterianas, o extractos de algas, y se pueden identificar sistemáticamente con cualquiera de los ensayos de la invención.

30 Algunos ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares se pueden encontrar en la técnica, por ejemplo en: DeWitt, *et al.*, 1993. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90: 6909; Erb, *et al.*, 1994. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 11422; Zuckermann, *et al.*, 1994. *J. Med. Chem.* 37: 2678; Cho, *et al.*, 1993. *Science* 261: 1303; Carrell, *et al.*, 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2059; Carrell, *et al.*, 1994. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33: 2061; y Gallop, *et al.*, 1994. *J. Med. Chem.* 37: 1233.

35 Algunas bibliotecas de compuestos pueden estar presentes en solución (véase por ejemplo, Houghten, 1992. *Biotechniques* 13: 412-421), o en perlas (véase Lam, 1991. *Nature* 354: 82-84), en chips (véase Fodor, 1993. *Nature* 364: 555-556), bacterias (véase el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.223.409), esporas (véase el documento de Patente de Estados Unidos N° 5.233.409), plásmidos (véase Cull, *et al.*, 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 1865-1869) o en fago (véase Scott y Smith, 1990. *Science* 249: 386-390; Devlin, 1990. *Science* 249: 404-406; Cwirla, *et al.*, 1990. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87: 6378-6382; Felici, 1991. *J. Mol. Biol.* 222: 301-310; y documento de Patente de Estados Unidos N° 5.233.409.).

45 En una realización, un compuesto candidato se introduce en un complejo de anticuerpo-antígeno y se determina si el compuesto candidato altera el complejo de antígeno-anticuerpo, en el que una alteración de este complejo indica que el compuesto candidato modula la función de señalización de IL-6Rc y/o la interacción entre IL-6 e IL-6R. Por ejemplo, el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal, 39B9 VL1, y el antígeno es IL-6R. Como alternativa, el anticuerpo monoclonal es 39B9 VL5, 12A, o 5C, y el antígeno es IL-6Rc o IL-6R.

50 En otra realización, se proporciona una proteína soluble de IL-6Rc y/o tanto de IL-6Rc como de IL-6R y se expone a al menos un anticuerpo monoclonal de neutralización. Se detecta la formación de un complejo de anticuerpo-antígeno, y uno o más compuestos candidatos se introducen al complejo. Si el complejo de anticuerpo-antígeno se altera después de la introducción de uno o más compuestos candidatos, los compuestos candidatos son útiles para tratar trastornos asociados con la señalización anómala de IL-6.

55 La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para interferir con o alterar el complejo de anticuerpo-antígeno se puede conseguir, por ejemplo, por acoplamiento del compuesto de ensayo con un radioisótopo o etiqueta enzimática de modo que la unión del compuesto de ensayo al antígeno o porción biológicamente activa del mismo se puede determinar mediante la detección del compuesto etiquetado en un complejo. Por ejemplo, los  
60 compuestos de ensayo se pueden etiquetar con <sup>125</sup>I, <sup>35</sup>S, <sup>14</sup>C, o <sup>3</sup>H, ya sea directa o indirectamente, y el radioisótopo se puede detectar mediante recuento directo de radioemisión o mediante recuento de centelleo. Como alternativa, los compuestos de ensayos se pueden etiquetar de forma enzimática con, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, o luciferasa, y la etiqueta enzimática se puede detectar mediante la determinación de la conversión de sustrato apropiado con respecto al producto.

65 En una realización, el ensayo comprende poner en contacto un complejo de anticuerpo-antígeno con un compuesto

de ensayo, y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con el antígeno o de otro modo alterar el complejo de anticuerpo-antígeno existente. En esta realización, la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para interactuar con el antígeno y/o alterar el complejo de anticuerpo-antígeno comprende la determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para unirse de forma preferente al antígeno o a una porción biológicamente activa del mismo, en comparación con el anticuerpo.

En otra realización, el ensayo comprende poner en contacto un complejo de anticuerpo-antígeno con un compuesto de ensayo y determinar la capacidad del compuesto de ensayo para modular el complejo de anticuerpo-antígeno. La determinación de la capacidad del compuesto de ensayo para modular el complejo de anticuerpo-antígeno se puede conseguir, por ejemplo, mediante la determinación de la capacidad del antígeno para unirse a o para interactuar con el anticuerpo, en presencia del compuesto de ensayo.

Los expertos en la materia reconocerán que, en cualquiera de los métodos de identificación sistemática que se desvelan en el presente documento, el anticuerpo puede ser un anticuerpo de neutralización, tal como un anticuerpo monoclonal, 39B9 VL1, 39B9 VL5, 12A y 5C, cada uno de los cuales interfiere con la activación mediada por IL-6 de la ruta de JAK/STAT la cascada de MAPK.

Los métodos de identificación sistemática que se desvelan en el presente documento se pueden realizar en forma de un ensayo basado en células o en forma de un ensayo sin células. Los ensayos sin células de la invención son susceptibles de uso de cualquiera de la forma soluble o de la forma unida a membrana de IL-6Rc y/o tanto de IL-6Rc como de IL-6R, y fragmentos de las mismas. En el caso de ensayos sin células que comprenden las formas unidas a la membrana de IL-6Rc y/o tanto de IL-6Rc como de IL-6R, puede ser deseable el uso de un agente de solubilización de modo que la forma unida a membrana de las proteínas se mantenga en solución. Algunos ejemplos de tales agentes de solubilización incluyen detergentes no iónicos tales como n-octilglucósido, n-dodecilglucósido, n-dodecilmaltósido, octanoil-N-metilglucamida, decanoil-N-metil-glucamida, Triton® X-100, Triton® X-114, Thesit®, Isotridecilo(etilenglicol éter)<sub>n</sub>, sulfonato de N-dodecil--N,N-dimetil-3-amonio-1-propano, 3-(3-colamidopropil) sulfonato de dimetilaminiol-1-propano (CHAPS), o sulfonato de 3-(3-colamidopropil)dimetilaminiol-2-hidroxi-1-propano (CHAPSO).

En más de una realización, puede ser deseable inmovilizar cualquiera del anticuerpo o el antígeno para facilitar la separación de formas que forman complejos de las que no forman complejos de una o ambas después de introducción del compuesto candidato, así como para admitir la automatización del ensayo. La observación del complejo de anticuerpo-antígeno en presencia y ausencia de un compuesto candidato, se puede realizar en cualquier recipiente adecuado para contener los reactivos. Algunos ejemplos de tales recipientes incluyen placas de microtitulación, tubos de ensayo, y tubos de microcentrífuga. En una realización, se puede proporcionar una proteína de fusión se añade un dominio que permite que una o ambas de las proteínas se unan a una matriz. Por ejemplo, algunas proteínas de fusión de GST-anticuerpo o proteínas de fusión de GST-antígeno se pueden adsorber sobre perlas de glutatión Sepharose (Sigma Chemical, St. Louis, MO) o placas de microtitulación derivatizadas con glutatión, que a continuación se combinan con el compuesto de ensayo, y la mezcla se incuba en condiciones que conducen a la formación de complejos (por ejemplo, en condiciones fisiológicas para sal y pH). Después de incubación, las perlas o los portillos de la placa de microtitulación se lavan para retirar cualquier componente no unido, la matriz se inmoviliza en el caso de perlas, el complejo se determina ya sea directa o indirectamente. Como alternativa, los complejos se pueden disociar a partir de la matriz, y el nivel de formación de complejo de anticuerpo-antígeno se puede determinar usando técnicas convencionales.

En los ensayos de identificación sistemática también se pueden usar otras técnicas para inmovilización de proteínas en matrices. Por ejemplo, cualquiera del anticuerpo (por ejemplo, 39B9 VL1, 39B9 VL5, 12A y 5C) o el antígeno (por ejemplo, IL-6Rc y/o tanto IL-6Rc como IL-6R protein) se pueden inmovilizar usando conjugación de biotina y estreptavidina. El anticuerpo biotinilado o moléculas de antígeno se pueden preparar a partir de biotina-NHS (N-hidroxi-succinimida) usando técnicas bien conocidas dentro de la técnica (por ejemplo, kit de biotinilación, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.), y se pueden inmovilizar en los pocillos de placas de 96 pocillos revestidos con estreptavidina (Pierce Chemical). Como alternativa, otros anticuerpos reactivos con el anticuerpo o antígenos de interés, pero que no interfieren con la formación del complejo de anticuerpo-antígeno de interés, se pueden derivatizar con respecto a los pocillos de la placa, y anticuerpo o antígenos sin unir se pueden atrapar en los pocillos mediante conjugación de anticuerpo. Algunos métodos para detectar tales complejos, además de los que se han descrito anteriormente para los complejos inmovilizados con GST, incluyen inmunodetección de complejos usando esos otros anticuerpos reactivos con el anticuerpo o antígeno.

### **Formulaciones de Diagnóstico y Profilácticas**

Los MAb de huIL-6Rc de la invención se usan en formulaciones de diagnóstico y profilácticas. En una realización, un antagonista de IL-6Rc y/o tanto de IL-6Rc como de IL-6R, tal como un MAb de huIL-6Rc de la invención, se administran a pacientes que están en riesgo de desarrollar una o más de las enfermedades mencionadas anteriormente, tal como, por ejemplo, sin limitación, septicemia, cáncer (por ejemplo, enfermedad de mieloma múltiple (MM), carcinoma de células renales (RCC), leucemia de células plasmáticas, linfoma, trastorno B-linfoproliferativo (BLPD), y cáncer de próstata), resorción ósea, osteoporosis, caquexia, psoriasis, glomerulonefritis

proliferativa mesangial, sarcoma de Kaposi, linfoma relacionado con SIDA, y enfermedades inflamatorias (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil de inicio sistémico, hipergammaglobulinemia, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus sistémico eritematoso (SLE), esclerosis múltiple, enfermedad de Castleman, gammapatía de IgM, mixoma cardiaco, asma, asma alérgica y diabetes mellitus dependiente de insulina autoinmunitaria). Una predisposición del paciente o del órgano a una o más de las enfermedades autoinmunitarias o inflamatorias mencionadas anteriormente se puede determinar usando marcadores genotípicos, serológicos o bioquímicos.

En otra realización de la invención, un anticuerpo huIL-6Rc de la invención se administra a individuos humanos diagnosticados con un indicio clínico asociado con una o más de las enfermedades mencionadas anteriormente, tales como, por ejemplo, sin limitación, septicemia, cáncer (por ejemplo, enfermedad de mieloma múltiple (MM), carcinoma de células renales (RCC), leucemia de células plasmáticas, linfoma, trastorno B-linfoproliferativo (BLPD), y cáncer de próstata), resorción ósea, osteoporosis, caquexia, psoriasis, glomerulonefritis proliferativa mesangial, sarcoma de Kaposi, linfoma relacionado con SIDA, y enfermedades inflamatorias (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil de inicio sistémico, hipergammaglobulinemia, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus sistémico eritematoso (SLE), esclerosis múltiple, enfermedad de Castleman, gammapatía de IgM, mixoma cardiaco, asma, asma alérgica y diabetes mellitus dependiente de insulina autoinmunitaria). Después del diagnóstico, un antagonista de IL-6Rc y/o tanto de IL-6Rc como de IL-6R, tal como un anticuerpo huIL-6Rc se administra para aliviar o invertir los efectos de la indicación clínica asociada con una o más de las enfermedades mencionadas anteriormente, tales como por ejemplo, sin limitación, septicemia, cáncer (por ejemplo, enfermedad de mieloma múltiple (MM), carcinoma de células renales (RCC), leucemia de células plasmáticas, linfoma, trastorno B-linfoproliferativo (BLPD), y cáncer de próstata), resorción ósea, osteoporosis, caquexia, psoriasis, glomerulonefritis proliferativa mesangial, sarcoma de Kaposi, linfoma relacionado con SIDA, y enfermedades inflamatorias (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil de inicio sistémico, hipergammaglobulinemia, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus sistémico eritematoso (SLE), esclerosis múltiple, enfermedad de Castleman, gammapatía de IgM, mixoma cardiaco, asma, asma alérgica y diabetes mellitus dependiente de insulina autoinmunitaria).

Los anticuerpos de la invención también son útiles en la detección de IL-6Rc y/o tanto de IL-6Rc como de IL-6R en muestras de pacientes y en consecuencia son útiles como agentes de diagnóstico. Por ejemplo, los anticuerpos huIL-6Rc de la invención se usan en ensayos *in vitro*, por ejemplo, ELISA, para detectar los niveles de IL-6Rc y/o tanto de IL-6Rc como de IL-6R en una muestra del paciente.

Un anticuerpo huIL-6Rc de la invención se puede inmovilizar en un soporte sólido (por ejemplo, el pocillo o pocillos de una placa de microtitulación). El anticuerpo inmovilizado sirve como un anticuerpo de captura para cualquiera de IL-6Rc y/o tanto de IL-6Rc como de IL-6R que puede estar presente en una muestra de ensayo. Antes de poner en contacto del anticuerpo inmovilizado con una muestra del paciente, el soporte sólido se enjuaga y se trata con un agente de bloqueo tal como proteína o albúmina de leche para evitar la adsorción no específica del analito.

A continuación los pocillos se tratan con una muestra de ensayo de la que se sospecha que contiene el antígeno, o con una solución que contiene una cantidad patrón del antígeno. Tal muestra es, por ejemplo, una muestra de suero de un sujeto del que se sospecha que tiene niveles de antígeno en circulación que se consideran que son el diagnóstico de una patología. Después de retirar el enjuague de la muestra o patrón de ensayo, el soporte sólido se trata con un segundo anticuerpo que se etiqueta de forma detectable. El segundo anticuerpo etiquetado sirve como un anticuerpo de detección. El nivel de etiqueta detectable se mide, y la concentración de antígeno de IL-6Rc y/o tanto de IL-6Rc como de IL-6R en la muestra de ensayo se determina por comparación con una curva patrón desarrollada a partir de las muestras de patrón.

Se observará que basándose en los resultados obtenidos usando los anticuerpos huIL-6Rc de la invención en un ensayo de diagnóstico *in vitro*, es posible determinar el estadio de una enfermedad (por ejemplo, un indicio clínico asociado con isquemia, un trastorno autoinmunitario o inflamatorio) en un sujeto basándose en niveles de expresión del antígeno de IL-6Rc y/o tanto de IL-6Rc como de IL-6R. Para una enfermedad determinada, se extraen muestras de sangre de sujetos a los que se les ha diagnosticado que tienen diversos estadios en la evolución de la enfermedad, y/o en diversos puntos en el tratamiento terapéutico de la enfermedad. Usando una población de muestras que proporciona resultados estadísticamente significativos para cada estadio de evolución o terapia, se diseña un intervalo de concentraciones del antígeno que se puede considerar característico de cada estadio.

### Ejemplos

Los siguientes ejemplos, incluyendo los experimentos realizados y los resultados obtenidos, se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no se deben interpretar como limitantes de la presente invención.

#### **EJEMPLO 1: Clonación, expresión y purificación de Interleuquina-6 (IL-6). Receptor de IL-6 (IL-6R) y el complejo de IL-6/IL-6R (IL-6Rc)**

Los ADNc que codifican la IL-6R humana (Nº de Referencia X12830), IL-6 humana (Nº de Referencia BC015511),

IL-6R de *cinomolgo*, IL-6 de *cinomolgo* (N° de Referencia AB000554), IL-6R de ratón (N° de Referencia NM\_010559) y IL-6 (de ratón N° de Referencia NM\_031168) se amplificaron mediante PCR a partir de ADNc derivado de células mononucleares de sangre periférica (PMBC) y se clonaron en vector PCR4TOPO (Invitrogen). Después de una etapa de PCR posterior, una Etiqueta de His o Avi (Avidity, Denver CO) se introdujo en el extremo C-terminal de la secuencia de codificación de citoquina. A continuación, estas construcciones se subclonaron en los vectores correspondientes para expresión de cualquiera de las formas soluble o de membrana de IL-6, IL-6R e IL-6Rc. La proteína recombinante de IL-6Rc soluble humana (shuLL-6Rc) se generó mediante fusión de IL-6 con IL-6R (la proteína de fusión de IL-6/IL-6R tomada de Mizuguchi *et al.*, 2001 J. Biosci. Bioeng. 91 (3): 299-304 con modificaciones que siguen a continuación: aa1-333 para IL-6R y aa28-212 para IL-6). Las secuencias de codificación de citoquinas etiquetadas con His de diversas especies (ser humano, *cinomolgo*, ratón) se colocaron bajo el control del promotor EF1 y/o el promotor CMV a la expresión en los vectores pEAK8 o pEE14.4 de expresión episódica para formas solubles. La secuencia de codificación de citoquina fue seguida de un sitio de entrada de ribosoma interno viral (IRES) y un segundo o tercer cistron para la coexpresión de BirA y GFP. El vector pEAK8 contiene el gen de resistencia a puromicina, el antígeno 1 nuclear de EBV (EBNA1) y el origen de replicación *oriP*. EBNA1 y *oriP* son necesarios para la propagación del vector pEAK8 como ADN episómico en células humanas y la generación de transfectantes estables. Las células transfectadas de forma estable se obtuvieron después de 7-10 días de cultivo en presencia de 2 µg/ml de puromicina. Las células resistentes a puromicina se expandieron y se usaron para producción de citoquina soluble. La actividad biológica de las IL-6R, IL-6 e IL-6Rc de ser humano, ratón y *cinomolgo*, etiquetadas con His solubles se sometió al ensayo en diversos ensayos funcionales y se encontró que era comparable con respecto a reactivos de fuentes comerciales (cuando están disponibles). Para expresión de superficie celular, se clonaron construcciones de IL-6R, IL-6 y IL-6Rc en el vector pDisplay, se transfectaron en células CHO y se seleccionaron con selección de G418.

### **EJEMPLO 2: Inmunizaciones**

Se generaron anticuerpos monoclonales totalmente humanos usando cepas de ratones transgénicos en las que la expresión genética de anticuerpo de ratón se suprimió y se sustituyó con expresión genética de anticuerpo humano. Se usaron tres cepas de ratones transgénicos:

- 1) ratón HuMab® (Medarex, Princeton NJ)
- 2) ratón KM™, un híbrido entre Ratón HuMAB y Ratón de TC de Kirin (Kirin Pharma Company, Japón)
- 3) ratón KM (FCyRIIb-KO), una cepa derivada de ratón KM™, en la que el gen *Fcgr2b* que codifica el Receptor IIB de Fc gamma inhibidor se ha inactivado.

Los ratones inmunizaron con cualquiera de Células de Ovario de Hámster chino que expresan IL-6Rc humana en la superficie celular (CHO/IL-6Rc) o con IL-6Rc humana soluble (shuLL-6Rc).

En general, todos los animales recibieron de 7 a 10 inyecciones por vía intraperitoneal (i.p.) o por vía subcutánea (s.c.) con CHO/IL-6Rc o IL-6Rc emulsionadas en adyuvante de MPL+TDM (RIBI) como se describe en el presente documento. Todas las 5 a 8 inyecciones iniciales se realizaron en presencia de adyuvante. Los dos hiperrefuerzos finales que preceden a la fusión se realizaron con antígeno libre y sin adyuvante. Un ejemplo de un programa de inmunización representativo:

Día 1 10<sup>7</sup> células CHO/IL-6Rc, i.p. en RIBI  
 Día 14 10<sup>7</sup> células CHO/IL-6Rc, i.p. en RIBI  
 Día 28 10<sup>7</sup> células CHO/IL-6Rc, i.p. en RIBI  
 Día 42 50 µg de shuLL-6Rc, i.p. en RIBI  
 Día 56 20 µg de shuLL-6Rc, s.c. en RIBI  
 Día 70 10 µg de shuLL-6Rc, s.c. en PBS  
 Día 84 10 µg de shuLL-6Rc, s.c. en PBS  
 Día 87 5 µg de shuLL-6Rc, s.c. en PBS

Los sueros de animales inmunizados se identificaron sistemáticamente de forma periódica mediante análisis de citometría de flujo para detectar la presencia de IgG humana dirigida a CHO/IL-6Rc en comparación con células CHO solas. Para obtener hibridomas, los ganglios linfáticos poplíteos, inguinales, para-aórticos, submandibulares, cervicales, axiales, y braquiales se retiraron de los ratones y se digirieron con colagenasa y DNAsa. Una suspensión de células individuales de células de ganglios linfáticos se mezcló en una proporción a 1:1 con células de mieloma SP2/0 y se suspendieron en Medio de Baja Conductividad Cytofusion (CPS-LCMC, CytoPulse Sciences, Inc.). Las fusiones se realizaron con 30 a 60 millones de esplenocitos en el aparato de Electrofusión CEEF50 de CytoPulse como lo indica el fabricante (Cyto Pulse Sciences, Inc). Después de electrofusión, las células se incubaron durante aproximadamente 1 hora a 37 °C para permitir la recuperación antes de distribuir las en placas de 96 pocillos. Las

células fusionadas se volvieron a suspender en medio de selección HAT y se sembraron en 44 a 52 placas de 96 pocillos a una concentración celular de  $0,1-0,2 \times 10^5$  esplenocitos por pocillo en 200  $\mu$ l de medio. La selección de hibridoma evolucionó durante 14 días. La fusión de los ganglios linfáticos de ratones inmunizados dio como resultado la generación de hibridomas que producían anticuerpos específicos para IL-6Rc. Catorce días después de la fusión, las placas que contenían hibridoma se identificaron sistemáticamente para la presencia de IgG humana que se unía a CHO/IL-6Rc humana.

### **EJEMPLO 3: Ensayos biológicos para actividad de IL-6Rc**

Todos los ensayos que se describen en el presente documento se realizaron en paralelo con un anticuerpo monoclonal de IgG1 humana de control con respecto a IL-6R humana (documento de Patente de Estados Unidos N° 5.817.790, SEC ID N°: 69 y SEC ID N°: 71); denominado "mAb de control" en este documento. Además, el anticuerpo 39B9 VL1 (secuencias de ácidos nucleicos SEC ID N°: 1 y 3, secuencias de amino SEC ID N°: 2 y 4) se ha denominado "NI-1201".

En células diana, la IL-6 se une primero a la IL-6R unida a la membrana (mIL-6R). El complejo de IL-6/IL-6R se asocia con la proteína gp130 de membrana de transducción de señales, estimulando de este modo su dimerización y el inicio posterior de la señalización intracelular. La gp130 se expresa de forma casi omnipresente por las células mientras que mIL-6R presenta un perfil de expresión reducida en hepatocitos y un número limitado de células inmunitarias. Una forma soluble de origen natural de la IL-6R (sIL6R) se genera mediante proteólisis de la forma de membrana o mediante corte y empalme diferencial del ARNm de IL-6R. La sIL-6R se combina con IL-6 para formar el complejo IL-6/IL-6R soluble (IL-6Rc) y es capaz de activar las células positivas para gp130 y negativas para mIL-6R. Este mecanismo se denomina señalización *trans* mientras que la señalización a través de unión de IL-6 a mIL-6R y posterior acoplamiento con gp130 se denomina señalización *cis* (Taga *et al.*, 1989, Cell, 58: 573-581).

**Ensayos funcionales de IL-6:** las células BAF-hugp130 (BAF-130), una línea de células pro-B de ratón transfectados con gp130 humana, proliferan en presencia de IL-6 and shuIL-6R (Fig. 1). De forma análoga, las células BAF-130 transfectadas con huIL-6R unidas a membrana (BAF-130/IL-6R) proliferan cuando se cultivan con huIL-6 (Fig. 2).

Para análisis de señalización *trans*, la IL-6Rc "nativa" (en oposición al complejo de fusión recombinante) se formó por incubación de la citoquina (IL-6) con su receptor soluble similar (shuIL-6R) a 37 °C durante 3-4 h. Se añadieron varias concentraciones de los mAb en células antes de su cultivo con el complejo nativo. Las células BAF-130 ( $1 \times 10^4$  células/0,2 ml/pocillo) se incubaron durante 72 h en una placa de fondo plano de 96 pocillos en suero de ternero fetal al 0,5 % complementado con RPMI en presencia de los mAb de ensayo (mAb de Control, huIgG1 o NI-1201) con huIL-6 + shuIL-6R (Fig. 1A-D). La proliferación se evaluó usando el reactivo de proliferación celular, WST-1 (Roche), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, después del periodo de cultivo, se añadieron 20  $\mu$ l de reactivo WST-1 en medio y se incubaron a 37 °C en CO<sub>2</sub> al 5 % durante 4 horas. La absorbancia (450-650 nm) se midió usando un vector de microplacas. Los resultados demuestran que NI-1201 neutralizar la actividad de la IL-6Rc nativa de forma más eficaz que el mAb de control.

Para análisis de señalización *cis*, las células BAF-130/IL-6R se incubaron con diferentes dosis de los mAb y una cantidad fija de IL-6 (Fig. 2A). Por el contrario, las células también se incubaron con una concentración de mAb en presencia de concentraciones crecientes de IL-6 (Fig. 2B). La proliferación se evaluó usando el reactivo de proliferación celular, WST-1, tal como se ha mencionado anteriormente. NI-1201 y mAb de control demuestran una actividad equivalente en el bloqueo de este ensayo de señalización *cis*.

### **EJEMPLO 4: Variantes de anticuerpos huIL-6Rc**

Las variantes de los anticuerpos huIL-6Rc se preparan usando cualquiera de una diversidad de técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, algunos anticuerpos de huIL-6Rc variantes incluyen anticuerpos que tienen una o más modificaciones de aminoácidos, tales como, por ejemplo, una substitución de aminoácido, en la posición dentro de la secuencia del anticuerpo.

A continuación, en la Tabla 3, se muestran algunas posiciones preferentes para sustituciones de aminoácidos como restos subrayados, con letra negrita. Los restos de aminoácido en negrita/subrayados se pueden sustituir con cualquier resto de aminoácido. En realizaciones preferentes, los restos de aminoácido en negrita/subrayados se sustituyen con los restos de aminoácido que se muestran a continuación en la Tabla 3. En estas realizaciones, el anticuerpo comprende (i) la secuencia de aminoácidos consenso QQSXSYP<sub>1</sub>LT (SEC ID N°: 42) en la región 3 determinante de la complementariedad de cadena ligera (CDR3), en la que X es N o Q; (ii) la secuencia de aminoácidos consenso GIIPX<sub>1</sub>FX<sub>2</sub>TTKYA<sub>1</sub>QX<sub>3</sub>FQ<sub>2</sub>G (SEC ID N°: 43) en la región 2 determinante de la complementariedad de cadena pesada (CDR2), en la que X<sub>1</sub> es L o A, X<sub>2</sub> es D o E, y X<sub>3</sub> es Q o K; (iii) la secuencia de aminoácidos consenso DRDILTDYYPXGGMDV (SEC ID N°: 44) en la región 3 determinante de la complementariedad de cadena pesada (CDR3), en la que X es M o L; y (iv) la secuencia de aminoácidos consenso TAVXYCAR (SEC ID N°: 45) en la región 3 marco conservada (FRW3), en la que X es F o Y.

El anticuerpo de tipo silvestre (*Wild Type*) NI-1201 (NI-1201-WT) enumerado en la Tabla 3 comprende la secuencia

de aminoácidos QQSNSY-PLT (SEC ID N°: 26) en la región CDR3 de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos GIIPLFDTTKYAQQFQG (SEC ID N°: 16) en la región CDR2 de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos DRDILTDYYPMGGMDV (SEC ID N°: 36) en la región CDR3 de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos TAVFYCAR (SEC ID N°: 38) en la región FRW3.

El anticuerpo NI-1201-A enumerado en la Tabla 3 comprende la secuencia de aminoácidos QQSNSYPLT (SEC ID N°: 26) en la región CDR3 de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos GIIPLFDTTKYAQKFQG (SEC ID N°: 33) en la región CDR2 de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos DRDILTDYYPMGGMDV (SEC ID N°: 36) en la región CDR3 de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos TAVYYCAR (SEC ID N°: 39) en la región FRW3.

El anticuerpo NI-1201-B enumerado en la Tabla 3 comprende la secuencia de aminoácidos QQSNSYPLT (SEC ID N°: 26) en la región CDR3 de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos GIIPLFDTTKYAQKFQG (SEC ID N°: 33) en la región CDR2 de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos DRDILTDYYPLGGMDV (SEC ID N°: 37) en la región CDR3 de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos TAVYYCAR (SEC ID N°: 39) en la región FRW3.

El anticuerpo NI-1201-C enumerado en la Tabla 3 comprende la secuencia de aminoácidos QQSNSYPLT (SEC ID N°: 26) en la región CDR3 de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos GIIPAFETTKYAQKFQG (SEC ID N°: 34) en la región CDR2 de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos DRDILTDYYPLGGMDV (SEC ID N°: 37) en la región CDR3 de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos TAVYYCAR (SEC ID N°: 39) en la región FRW3.

El anticuerpo NI-1201-D enumerado en la Tabla 3 comprende la secuencia de aminoácidos QQSQSYPLT (SEC ID N°: 32) en la región CDR3 de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos GIIPAFETTKYAQKFQG (SEC ID N°: 34) en la región CDR2 de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos DRDILTDYYPLGGMDV (SEC ID N°: 37) en la región CDR3 de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos TAVYYCAR (SEC ID N°: 39) en la región FRW3.

El anticuerpo NI-1201-E enumerado en la Tabla 3 comprende la secuencia de aminoácidos QQSQSYPLT (SEC ID N°: 32) en la región CDR3 de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos GIIPLFDTTKYAQKFQG (SEC ID N°: 33) en la región CDR2 de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos DRDILTDYYPLGGMDV (SEC ID N°: 37) en la región CDR3 de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos TAVYYCAR (SEC ID N°: 39) en la región FRW3.

El anticuerpo NI-1201-F enumerado en la Tabla 3 comprende la secuencia de aminoácidos QQSNSYPLT (SEC ID N°: 26) en la región CDR3 de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos GIIPAFDTTKYAQKFQG (SEC ID N°: 35) en la región CDR2 de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos DRDILTDYYPLGGMDV (SEC ID N°: 37) en la región CDR3 de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos TAVYYCAR (SEC ID N°: 39) en la región FRW3.

El anticuerpo NI-1201-G enumerado en la Tabla 3 comprende la secuencia de aminoácidos QQSQSYPLT (SEC ID N°: 32) en la región CDR3 de cadena ligera, la secuencia de aminoácidos GIIPAFDTTKYAQKFQG (SEC ID N°: 35) en la región CDR2 de cadena pesada, la secuencia de aminoácidos DRDILTDYYPLGGMDV (SEC ID N°: 37) en la región CDR3 de cadena pesada, y la secuencia de aminoácidos TAVYYCAR (SEC ID N°: 39) en la región FRW3.

Tabla 3. Candidatos Principales para NI-1201

	CDR3 de cadena ligera	CDR2 de cadena pesada	CDR3 de cadena pesada	FRW 3
NI1201-WT	QQSNSYPLT	GIIPLFDTTKYAQQFQG	DRDILTDYYPMGGMDV	...TAVFYCAR...
NI1201-A	QQSNSYPLT	GIIPLFDTTKYAQKFQG	DRDILTDYYPMGGMDV	...TAVYYCAR...
NI1201-B	QQSNSYPLT	GIIPLFDTTKYAQKFQG	DRDILTDYYPLGGMDV	...TAVYYCAR...
NI1201-C	QQSNSYPLT	GIIPAFETTKYAQKFQG	DRDILTDYYPLGGMDV	...TAVYYCAR...
NI1201-D	QQSQSYPLT	GIIPAFETTKYAQKFQG	DRDILTDYYPLGGMDV	...TAVYYCAR...
NI1201-E	QQSQSYPLT	GIIPLFDTTKYAQKFQG	DRDILTDYYPLGGMDV	...TAVYYCAR...
NI1201-F	QQSNSYPLT	GIIPAFDTTKYAQKFQG	DRDILTDYYPLGGMDV	...TAVYYCAR...
NI1201-G	QQSQSYPLT	GIIPAFDTTKYAQKFQG	DRDILTDYYPLGGMDV	...TAVYYCAR...

**EJEMPLO 5:** NI-1201 bloquea la fosforilación de STAT-3 lucida por la señalización *cis* de IL-6

Después de un periodo sin alimento en suero de 24 h, las células HepG2 de carcinoma hepatocelular humano positivas para mL-6R (ATCC) se incubaron durante 10 min con las concentraciones indicadas de hIL-6 (Fig 3A) o con 10 ng/ml de IL-6 con las concentraciones indicadas de hulG1, mAb de control o NI-1201 WT (*Wild Type, de tipo silvestre*) (Fig 3B). Después de lisis en tampón de muestra, las proteínas se analizaron en transferencia de Western de SDS-PAGE usando un anticuerpo anti-fosfo-STAT3 monoclonal, P-STAT3 (Tecnología de señalización celular). Las transferencias se separaron y se volvieron a investigar con un anticuerpo policlonal que reconocía STAT3 activado/inactivado (Santa Cruz Biotecnología). NI-1201 y el mAb de control demostraba una actividad equivalente

en el bloqueo de la fosforilación de STAT-3 inducida por la señalización *cis*.

**EJEMPLO 6:** NI-1201 bloquea la *trans*-señalización de IL-6 mediada por shuLL-6Rc

5 Las células PEAK se transfectar un de forma transitoria con el plásmido indicador de Luciferasa (dependiente de STAT3 promotor). Se sembraron  $2,5 \times 10^4$  células por pocillo en placas de fondo plano de 96 pocillos en DMEM que contenía suero de ternero fetal al 0,5 %. Después de 4-6 h de adhesión celular, las células PEAK se activaron con 30 ng/ml de shuL-6Rc con dosis crecientes de los mAb indicados. 18 h después, el medio se retiró y el ensayo de Luciferasa se realizó usando el sistema de Ensayo de Luciferasa Steady-Glo® (Promega) en un analizador de quimioluminiscencia. Todas las variantes de NI-1201 neutralizaron, de una manera dependiente de la dosis, la actividad de shuL-6Rc mientras que el mAb de control fallo en el bloqueo de la actividad del complejo formado previamente (Fig 4).

**EJEMPLO 7:** Afinidad y cinética de unión de anticuerpos huLL-6Rc

15 La capacidad de NI-1201 para unirse a huLL-6R unido a la membrana nativa se evaluó usando análisis de citometría de flujo en la línea de células de hepatoma HepG2. La tinción de la superficie celular se realiza en células HepG2 con diferentes dosis de los mAb. La unión de los mAb primarios sin conjugar (mAb de Control, huIgG1 y mAb de NI-1201) se detectó con IgG de cabra anti-humana con Alexa Fluor 647 (H+L) (Invitrogen). Cada experimento se realizó por triplicado. La media de la intensidad de fluorescencia (MFI) se representa y demuestra un aumento de la afinidad aparente de NI-1201 para la IL-6R de membrana en comparación con el mAb de control (Fig. 5).

La afinidad y la cinética de unión de candidatos de NI-1201 (A-D), NI-1201 WT (de tipo silvestre, *Wild Type*) y mAb de control se caracterizaron en un instrumento Biacore 2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Se usó un chip CM5 de Biacore y 1640 RU (unidades de respuesta) de un Fc de IgG anti-humana (Biacore AB, Uppsala, Suecia) se inmovilizó mediante química de EDC/NHS. Esta superficie se usó para capturar candidatos de NI-1201, NI-1201 WT y el mAb de control. La superficie se regeneró después de cada ciclo por inyección de cloruro de magnesio 3 M a 20  $\mu$ l/min, durante 30 s seguido de 1 min de tiempo de estabilización en tampón HBS-EP (Biacore AB, Uppsala, Suecia). La unión se midió pasando IL-6R humana soluble sin vehículo de analitos (shuLL6-R; R&D), IL-6Rc humana soluble (shuLL-6Rc) e IL-6R de mono *cinomolgo* soluble (scyLL-6R) por duplicado en las siguientes concentraciones: 100 nM, 50 nM, 25 nM, 12,5 nM, 6,25 nM y 0 nM. Todas las soluciones se diluyeron en tampón HBS-EP. La inyección se realizó a 50  $\mu$ l/min durante 3 min seguido de 12 min de tiempo de disociación y la temperatura se ajustó a 25 °C. Los datos se ajustaron de acuerdo con un modelo de Langmuir a 1:1 y se determinaron los valores de  $K_{activada}$ ,  $K_{desactivada}$  y  $K_D$ . Las afinidades y las constantes cinéticas de las variantes A-D de NI-1201, NI-1201 WT y mAb de control se resumen en the Tabla 4. Mediante la confirmación de los ensayos funcionales usando cualquiera de IL-6Rc nativo o formado previamente, NI-1201 demostraba una afinidad subnanomolar para el complejo mientras que el mAb de control no presentaba unión mensurable.

Tabla 2. Constantes cinéticas y de afinidad medidas con Biacore

Analito	Muestra	$K_{activada}$ (1/MS)	$K_{desactivada}$ (1/s)	$K_D$ (M)
shuLL-6R	NI-1201 A	8,29E+05	1,10E-04	1,21E-10
	NI-1201 B	8,75E+05	9,40E-05	1,07E-10
	NI-1201 C	9,92E+05	1,10E-04	1,10E-10
	NI-1201 D	7,61E+05	1,02E-04	1,34E-10
	NI-1201 WT	1,33E+06	7,53E-05	5,67E-11
	mAb de Control	4,14E+05	3,99E-04	9,65E-10
shuLL-6Rc	NI-1201 A	5,01E+04	2,46E-04	4,92E-09
	NI-1201 B	5,34E+04	2,37E-04	4,43E-09
	NI-1201 C	4,77E+04	2,40E-04	5,03E-09
	NI-1201 D	4,53E+04	2,22E-04	4,89E-09
	NI-1201 WT	4,31E+04	2,43E-04	5,64E-09
	mAb de Control	N.D.	N.D.	N.D.
scyLL-6R	NI-1201 A	1,04E+05	2,13E-04	2,05E-09
	NI-1201 B	1,15E+05	2,07E-04	1,81E-09
	NI-1201 C	1,11E+05	2,25E-04	2,03E-09
	NI-1201 D	1,12E+05	2,00E-04	1,79E-09
	NI-1201 WT	1,06E+05	2,15E-04	2,04E-09
	mAb de Control	2,68E+04	4,63E-04	1,73E-08

shuLL-6R = Receptor de IL-6 humana soluble; shuLL-6Rc = complejo de Receptor de IL-6/IL-6 humano soluble; scyLL-6R = Receptor de IL-6 de mono cinomolgo soluble; N.D. = unión no detectada.

**EJEMPLO 8:** Formación de mapas de epítomos de anticuerpos huIL-6Rc

Construcción de quimeras de IL-6R e IL-6R de ratón mutada: Cada modificación se realizó en la forma soluble de IL-6R y se añadió en un vector pDISPLAY™ (Invitrogen) permitiendo la expresión superficial de construcciones. La formación de mapas de epítomos de NI-1201 se evaluó mediante intercambio de restos humanos en el segundo dominio de fibronectina II (dominio D3) de IL-6R de ratón y mediante la verificación de si se recuperaba la unión de los mAb en IL-6R de ratón modificada.

Se usó una estrategia de PCR de extensión de superposición para generar secuencias de codificación que especifican proteínas quiméricas de huIL-6R/IL-6R de ratón (Fig. 6A) y proteínas de IL-6R de ratón que contenían sustituciones de aminoácidos humanos en dominios D3 (Fig. 6B). Se usaron cebadores de oligonucleótidos mutagénicos de superposición parcial para amplificación con PCR de secuencias N- y C-terminales en cualquier lado de las uniones de huIL-6R/IL-6R de ratón o regiones sustituidas, seguido de aislamiento en gel e hibridación de los productos de PCR desnaturalizados. A continuación, los productos de PCR de longitud completa se digirieron con EcoRI y BglII y se ligaron en un vector pDISPLAY™ (Invitrogen). Las células PEAK se cultivaron en medio DMEM complementado con suero de ternero fetal al 10 % y L-glutamina 4 mM. Las células se sembraron de 12 a 24 h antes de que la transfección tuviera una confluencia de un 40-50 % en placas de 6 pocillos. Las transfecciones de vectores pDISPLAY™ (Invitrogen) se realizaron mediante lipofección usando reactivo de LT1 *TransIT*® (MirusBio) de acuerdo con las especificaciones del fabricante. Las células se cultivaron durante 48 h antes de cosecha y análisis mediante citometría de flujo.

Análisis de FACS: Se realizó tinción de la superficie celular en células PEAK que presentaban cada variante de IL-6R y se analizaron mediante citometría de flujo (Fig. 6B-D). La expresión de la superficie celular de cada IL-6R quimérica se evaluó usando un anticuerpo CD126 PE antihumano o un anticuerpo CD126-PE anti-ratón (BD Pharmingen). La unión de mAb de control y NI-1201 se detectó usando un Alexa Fluor 647 para IgG de cabra anti-humana (H+L) (Invitrogen). Los datos demuestran que NI-1201 reconoce un epítipo distinto en huIL-6R con respecto al mAb de Control.

**EJEMPLO 9:** NI-1201 tiene reacción cruzada y neutralizar la IL-6Rc de mono *cinomolgo*

Se muestra la homología de secuencias de proteína IL-6R entre especies humanas y otras indicadas (Fig. 7A). Como se describe en el ejemplo 6, las células PEAK se transfectaron de forma transitoria con el plásmido indicador de Luciferasa (promotor dependiente de STAT3) y se activaron con 25 ng/ml de IL-6 de *cinomolgo* + 250 ng/ml de scylL-6R con diferentes dosis de los mAb anti-humanos indicados. El ensayo de luciferasa se realizó como se ha descrito anteriormente en el Ejemplo 6 (Fig 7B). Los resultados demostraban la capacidad de NI-1201 para neutralizar la actividad funcional de la IL-6Rc de *Cinomolgo* nativa.

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NovImmune SA Ferlin, Walter Kosco-vilbois, Marie Elson, Greg. Leer, Olivier Guilhot, Florence

<120> Anticuerpos anti-IL-6/IL-6R y métodos de uso de los mismos

<130> 23135-417001WO

<150> US 61/127.403

<151> 13-05-2008

<150> US 61/194.156

<151> 25-09-2008

<160> 46

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 375

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 564 635 T3

caggtgcagc tgggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc 60  
 tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgcta tcagctgggt gcgccaggcc 120  
 cctggacaag ggcttgagtg gatgggaggg atcatccctc tctttgatac aacaaagtac 180  
 gcacagcagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240  
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtat tttactgtgc gagagatcgg 300  
 gatattttga ctgattatta tcccatgggc ggtatggacg tctggggcca agggaccacg 360  
 gtcaccgtct cctca 375

5 <210> 2  
 <211> 125  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 2

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45  
 Gly Gly Ile Ile Pro Leu Phe Asp Thr Thr Lys Tyr Ala Gln Gln Phe  
 50 55 60  
 Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Phe Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asp Arg Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Pro Met Gly Gly Met  
 100 105 110  
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

15 <210> 3  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 3

ES 2 564 635 T3

gccatccagt tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgcc gggcaagtca gggcattagc agtgtttttag cctggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tctaatagtt acccgctcac tttcggcgga 300  
 gggaccaagg tggagatcaa acgt 324

5 <210> 4  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 4

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

10 <210> 5  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 15 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 5

gacatcctga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgtc gggcgagtca ggatattagc agctggtttag cctggtatca gcagaaacca 120  
 gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tctaatagtt acccgctcac tttcggcgga 300  
 gggaccaagg tggagatcaa acga 324

20 <210> 6  
 <211> 108

ES 2 564 635 T3

<212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 6

5

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

<210> 7  
 <211> 357  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 7

caggtgcagc tgggtggagtc ttggggagggc gtgggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cgtctggatt caccttcagt aactatgaca tgtactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atattagatg atggaaataa taattactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa aaaggtgtat 240  
 ctgcaaatga atagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgt gagagcgtcc 300  
 cctaactggg gtcttcttga cttctggggc caggaaccc tggtcaccgt ctcgagt 357

15

<210> 8  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 8

ES 2 564 635 T3

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

5 <210> 9  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 9  
 gaaatttgtg tgacacagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctggttag cctggatca gcagaaacca 120  
 gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccgatcac cttcggccaa 300  
 10 gggacacgac tggagattaa acgt 324  
 15 <210> 10  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 10

ES 2 564 635 T3

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

<210> 11  
 <211> 357  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 11

caggtgcagc tgggtgcagtc tgggggagggc gtggtccagc ctgggaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt catcttcagt agctatgaca tgtactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atattatatg atggaaataa taaatactac 180  
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacggtgtat 240  
 ctgcaaatga acagcctgag agctgaggac acggctgtgt attactgtgt gagagcgtcc 300  
 cctaactggg gtctttttga cttctggggc cagggaaacc tggtcacctg ctcgagt 357

10

<210> 12  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 12

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ile Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Asp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

ES 2 564 635 T3

Ala Val Ile Leu Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

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

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

Val Arg Ala Ser Pro Asn Trp Gly Leu Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

5 <210> 13  
 <211> 324  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 13

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60  
 atcaattgcc gggcaagtca gggcattagc agtgatttag cctgggatca gcagaaacca 120  
 gggaaagctc ctaagctcct gatgtatgat gcctccagtt tggaaagtgg ggtcccatca 180  
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240  
 gaagattttg caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt acccgatcac cttcggccaa 300  
 10 gggacacgac tggagattaa acgt 324

15 <210> 14  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

ES 2 564 635 T3

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Met  
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Ser Tyr Pro Ile

85

90

95

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

<210> 15  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 15

Ser Tyr Ala Ile Ser  
 1 5

10

<210> 16  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 16

Gly Ile Ile Pro Leu Phe Asp Thr Thr Lys Tyr Ala Gln Gln Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

20

<210> 17  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

25

<400> 17

Cys Ala Arg Asp Arg Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Pro Met Gly Gly  
 1 5 10 15

Met Asp Val

ES 2 564 635 T3

5 <210> 18  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 18

Asn Tyr Asp Met Tyr  
1 5

10 <210> 19  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 19

Val Ile Leu Asp Asp Gly Asn Asn Asn Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

20 <210> 20  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

25 <400> 20

Cys Val Arg Ala Ser Pro Asn Trp Gly Leu Leu Asp Phe  
1 5 10

30 <210> 21  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 21

Ser Tyr Asp Met Tyr  
1 5

40 <210> 22  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 22

Val Ile Leu Tyr Asp Gly Asn Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

45 Gly

50 <210> 23  
<211> 13  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 23

ES 2 564 635 T3

Cys Val Arg Ala Ser Pro Asn Trp Gly Leu Phe Asp Phe  
 1 5 10

5 <210> 24  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 24

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val Leu Ala  
 1 5 10

15 <210> 25  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 25

20 Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser  
 1 5

25 <210> 26  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 26

30 Gln Gln Ser Asn Ser Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

35 <210> 27  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 27

40 Gln Gln Ser Asn Ser Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

45 <210> 28  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 28

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
 1 5 10

50 <210> 29  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 29

55

Gln Gln Ser Asn Ser Tyr Pro Ile Thr  
 1 5

5  
 <210> 30  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 30

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Val Asp Ala  
 1 5 10

10  
 <210> 31  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 31

Gln Gln Ser Asn Ser Tyr Pro Ile Thr  
 1 5

20  
 <210> 32  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 32

Gln Gln Ser Gln Ser Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

30  
 <210> 33  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 33

Gly Ile Ile Pro Leu Phe Asp Thr Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

40  
 <210> 34  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*  
 <400> 34

Gly Ile Ile Pro Ala Phe Glu Thr Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
 1 5 10 15

Gly

50  
 <210> 35  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 564 635 T3

<400> 35

Gly Ile Ile Pro Ala Phe Asp Thr Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe Gln  
1 5 10 15

Gly

5

<210> 36  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 36

Asp Arg Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Pro Met Gly Gly Met Asp Val  
1 5 10 15

15

<210> 37  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 37

Asp Arg Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Pro Leu Gly Gly Met Asp Val  
1 5 10 15

25

<210> 38  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 38

Thr Ala Val Phe Tyr Cys Ala Arg  
1 5

35

<210> 39  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

<400> 39

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
1 5

40

<210> 40  
<211> 142  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

45

<400> 40

ES 2 564 635 T3

Gln Gly Cys Gly Ile Leu Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Ile Thr Val  
 1 5 10 15  
 Thr Ala Val Ala Arg Asn Pro Arg Trp Leu Ser Val Thr Trp Gln Asp  
 20 25 30  
 Pro His Ser Trp Asn Ser Ser Phe Tyr Arg Leu Arg Phe Glu Leu Arg  
 35 40 45  
 Tyr Arg Ala Glu Arg Ser Lys Thr Phe Thr Thr Trp Met Val Lys Asp  
 50 55 60  
 Leu Gln His His Cys Val Ile His Asp Ala Trp Ser Gly Leu Arg His  
 65 70 75 80  
 Val Val Gln Leu Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Gln Gly Glu Trp Ser  
 85 90 95  
 Glu Trp Ser Pro Glu Ala Met Gly Thr Pro Trp Thr Glu Ser Arg Ser  
 100 105 110  
 Pro Pro Ala Glu Asn Glu Val Ser Thr Pro Met Gln Ala Leu Thr Thr  
 115 120 125  
 Asn Lys Asp Asp Asp Asn Ile Leu Phe Arg Asp Ser Ala Asn  
 130 135 140

5 <210> 41  
 <211> 143  
 <212> PRT  
 <213> *Mus musculus*

10 <400> 41

ES 2 564 635 T3

His Ser Leu Lys Met Val Gln Pro Asp Pro Pro Ala Asn Leu Val Val  
 1 5 10 15  
 Ser Ala Ile Pro Gly Arg Pro Arg Trp Leu Lys Val Ser Trp Gln His  
 20 25 30  
 Pro Glu Thr Trp Asp Pro Ser Tyr Tyr Leu Leu Gln Phe Gln Leu Arg  
 35 40 45  
 Tyr Arg Pro Val Trp Ser Lys Glu Phe Thr Val Leu Leu Leu Pro Val  
 50 55 60  
 Ala Gln Tyr Gln Cys Val Ile His Asp Ala Leu Arg Gly Val Lys His  
 65 70 75 80  
 Val Val Gln Val Arg Gly Lys Glu Glu Leu Asp Leu Gly Gln Trp Ser  
 85 90 95  
 Glu Trp Ser Pro Glu Val Thr Gly Thr Pro Trp Ile Ala Glu Pro Arg  
 100 105 110  
 Thr Thr Pro Ala Gly Ile Leu Trp Asn Pro Thr Gln Val Ser Val Glu  
 115 120 125  
 Asp Ser Ala Asn His Glu Asp Gln Tyr Glu Ser Ser Thr Glu Ala  
 130 135 140

<210> 42  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (4)..(4)  
 <223> X es N o Q

<400> 42

Gln Gln Ser Xaa Ser Tyr Pro Leu Thr  
 1 5

<210> 43  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (5)..(5)  
 <223> X es L o A

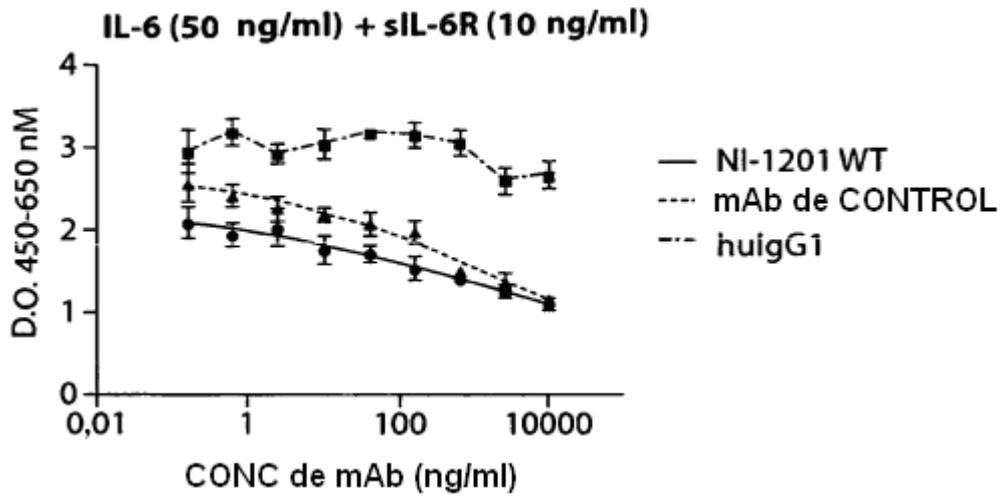
<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (7)..(7)  
 <223> Y es D o E

ES 2 564 635 T3

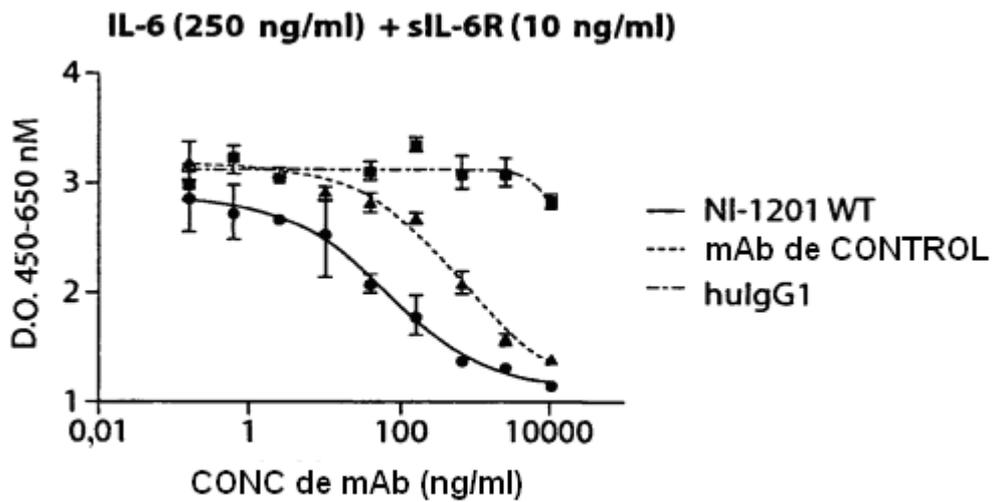
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (14)..(14)  
5 <223> X es Q o K  
  
<400> 43  
  
Gly Ile Ile Pro Xaa Phe Xaa Thr Thr Lys Tyr Ala Gln Xaa Phe Gln  
1 5 10 15  
  
Gly  
10  
<210> 44  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
15  
<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (11)..(11)  
<223> X es M o L  
20  
<400> 44  
  
Asp Arg Asp Ile Leu Thr Asp Tyr Tyr Pro Xaa Gly Gly Met Asp Val  
1 5 10 15  
  
25 <210> 45  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
30 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (4)..(4)  
<223> X es F o Y  
35 <400> 45  
  
Thr Ala Val Xaa Tyr Cys Ala Arg  
1 5  
  
40 <210> 46  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*  
45 <400> 46  
  
Ala Glu Arg Ser Lys Thr  
1 5

## REIVINDICACIONES

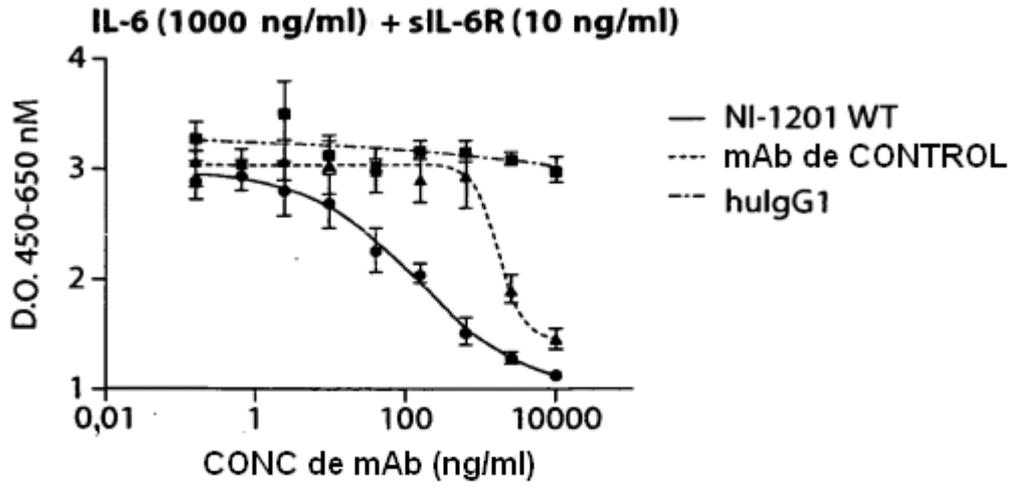
1. Un anticuerpo monoclonal totalmente humano aislado, o fragmento del mismo, que se une al complejo IL-6/IL-6R (IL-6Rc), en el que dicho anticuerpo comprende una región 1 determinante de la complementariedad de cadena pesada variable (CDR1 VH), una región 2 determinante de la complementariedad de cadena pesada variable (CDR2 VH), una región 3 determinante de la complementariedad de cadena pesada variable (CDR3 VH), una región 1 determinante de la complementariedad de cadena ligera variable (CDR1 VL), una región 2 determinante de la complementariedad de cadena ligera variable (CDR2 VL), una región 3 determinante de la complementariedad de cadena ligera variable (CDR3 VL) seleccionado entre el grupo que consiste en:
- (a) una región CDR1 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15, una región CDR2 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 33, una región CDR3 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 36, una región CDR1 VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 24, una región CDR2 VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 25, y una región CDR3 VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 26;
- (b) una región CDR1 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 15, una región CDR2 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 16, una región CDR3 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 17, una región CDR1 VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 24, una región CDR2 VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 25, y una región CDR3 VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 26;
- (c) una región CDR1 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 18, una región CDR2 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 19, una región CDR3 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 20, una región CDR1 VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 28, una región CDR2 VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 25, y una región CDR3 VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 29; y
- (d) una región CDR1 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 21, una región CDR2 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 22, una región CDR3 VH que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 23, una región CDR1 VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 30, una región CDR2 VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 25, y una región CDR3 VL que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 31.
2. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo también se une al receptor de interleucina 6 (IL-6R).
3. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo es un isotipo de IgG o en el que dicho anticuerpo es un isotipo de IgG1.
4. El anticuerpo de la reivindicación 1, en el que dicho anticuerpo comprende una región variable de cadena pesada y una región variable de cadena ligera seleccionadas entre el grupo que consiste en:
- (a) una secuencia variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 2 y una secuencia variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4;
- (b) una secuencia variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC ID N°: 2 y una secuencia variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 6;
- (c) una secuencia variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC ID N°: 8 y una secuencia variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 10; y
- (c) una secuencia variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC ID N°: 12 y una secuencia variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 14,
- o en el que dicho anticuerpo comprende una secuencia variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada entre la SEC ID N°: 2 y una secuencia variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID N°: 4.
5. Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes y un vehículo.
6. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en un método para aliviar el síntoma de un indicio clínico asociado con artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis, esclerosis múltiple o asma.
7. El anticuerpo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para uso en un método para aliviar un síntoma de un cáncer, enfermedad autoinmunitaria o trastorno inflamatorio.
8. El anticuerpo para uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en las que dicho sujeto es un ser humano.



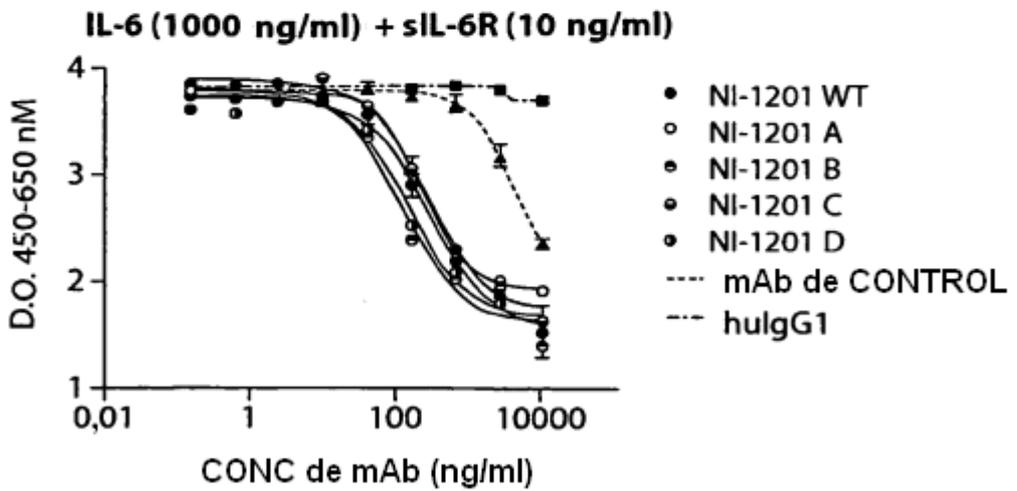
**Fig. 1A**



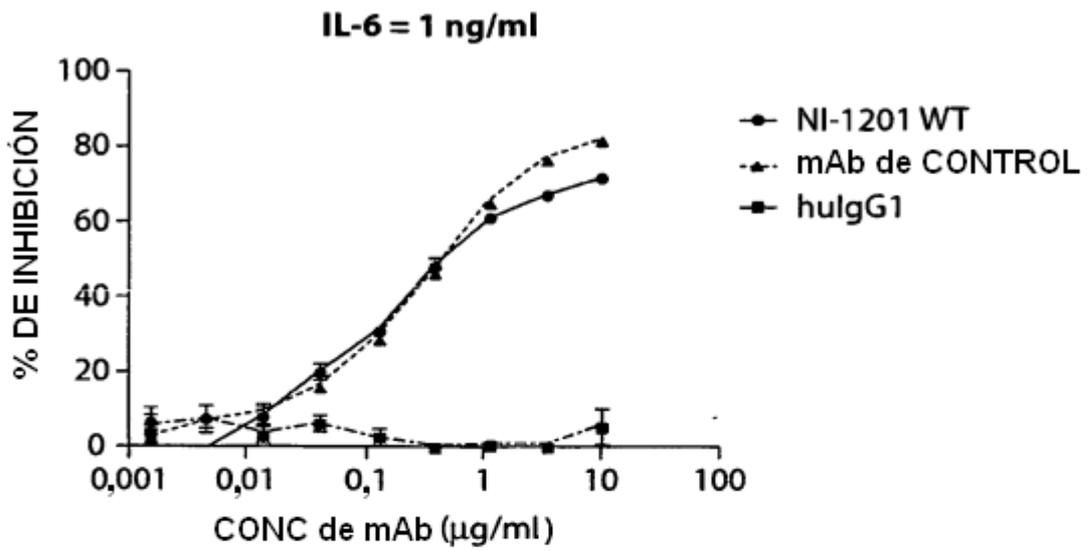
**Fig. 1B**



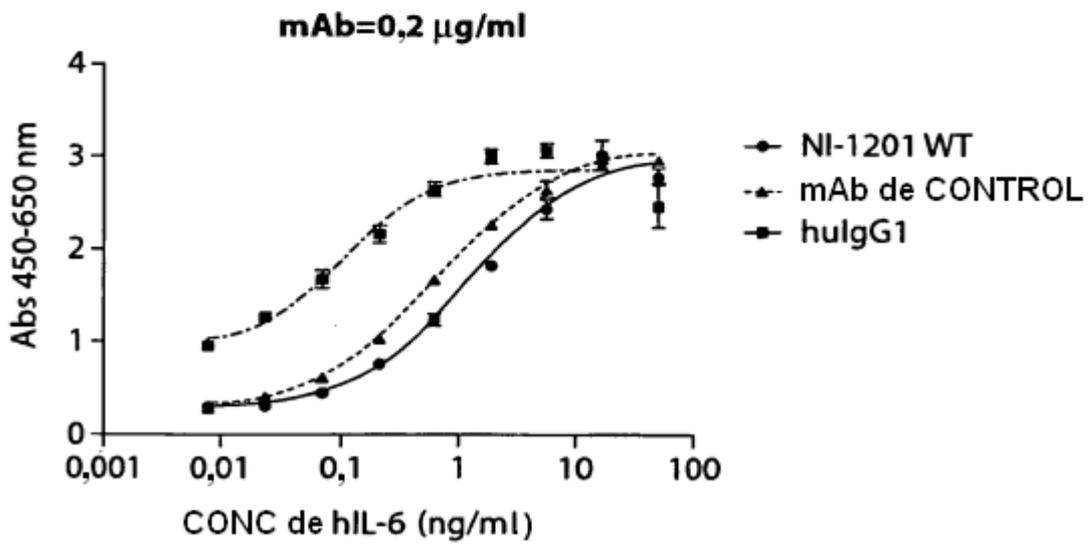
**Fig. 1C**



**Fig. 1D**



**Fig. 2A**



**Fig. 2B**

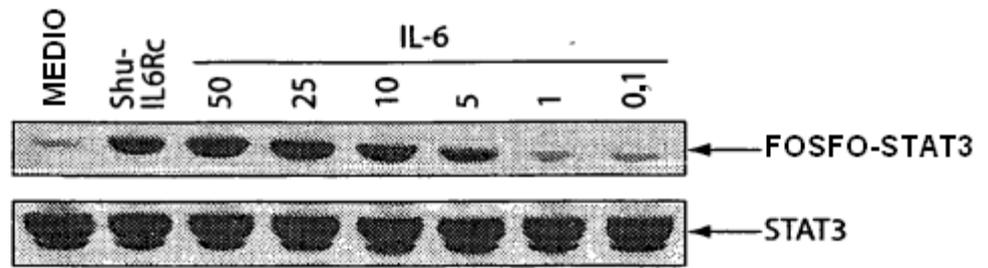


Fig. 3A

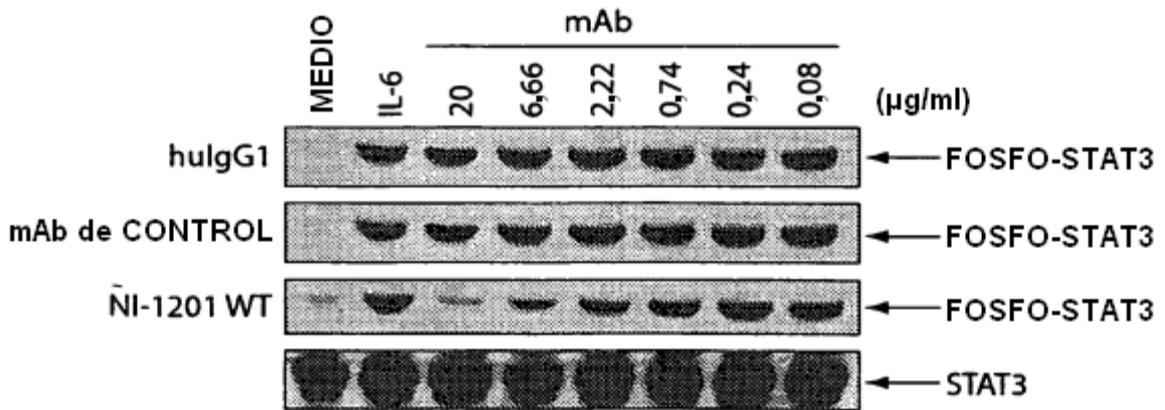
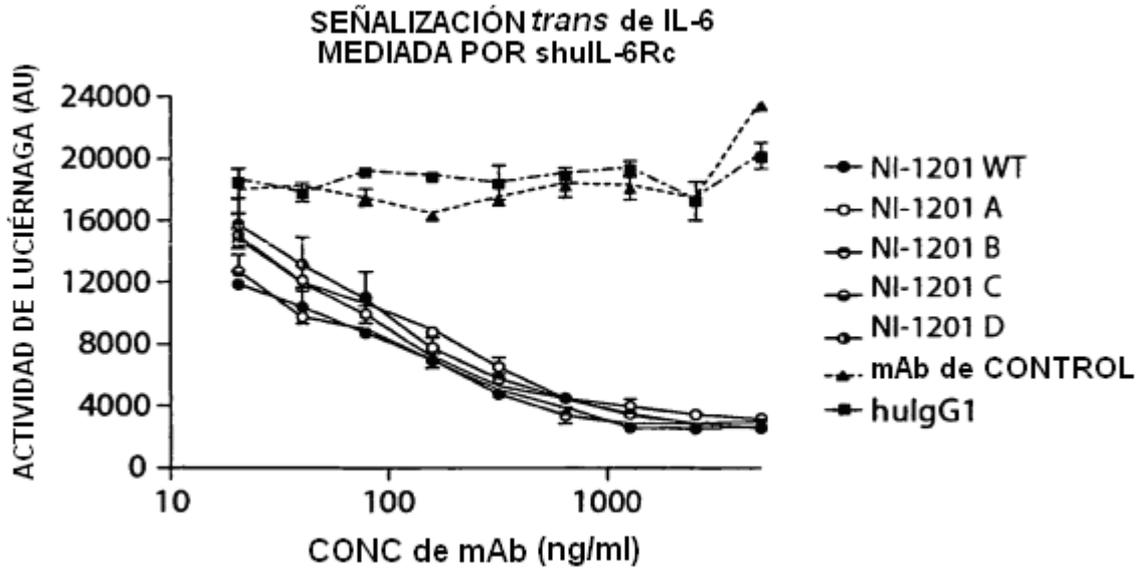
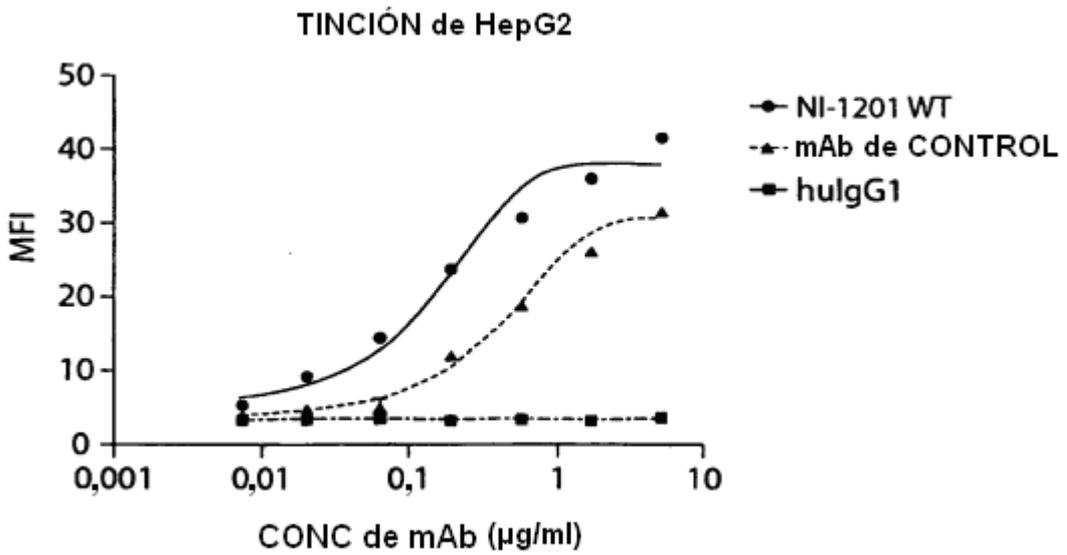


Fig. 3B



**Fig. 4**



**Fig. 5**

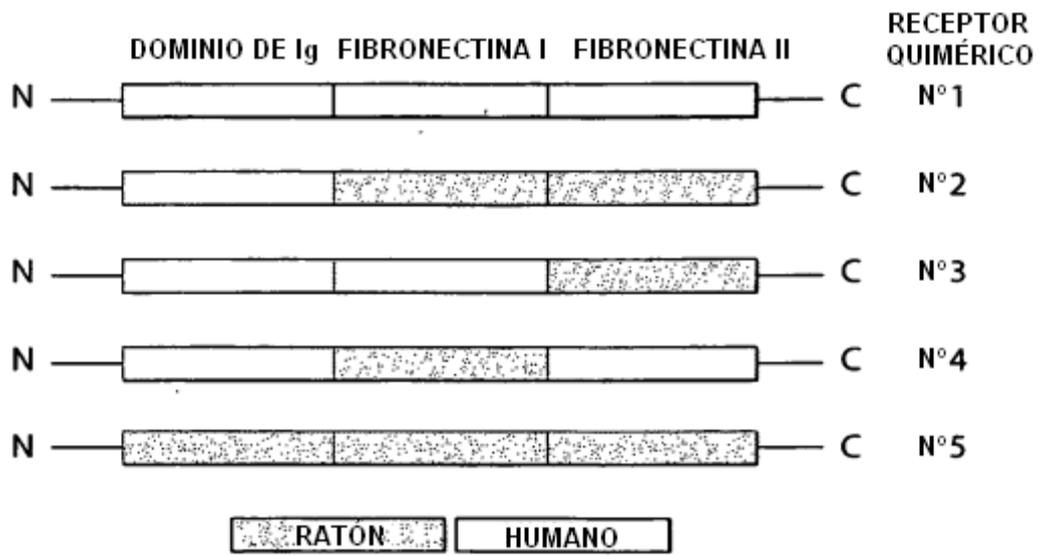


Fig. 6A

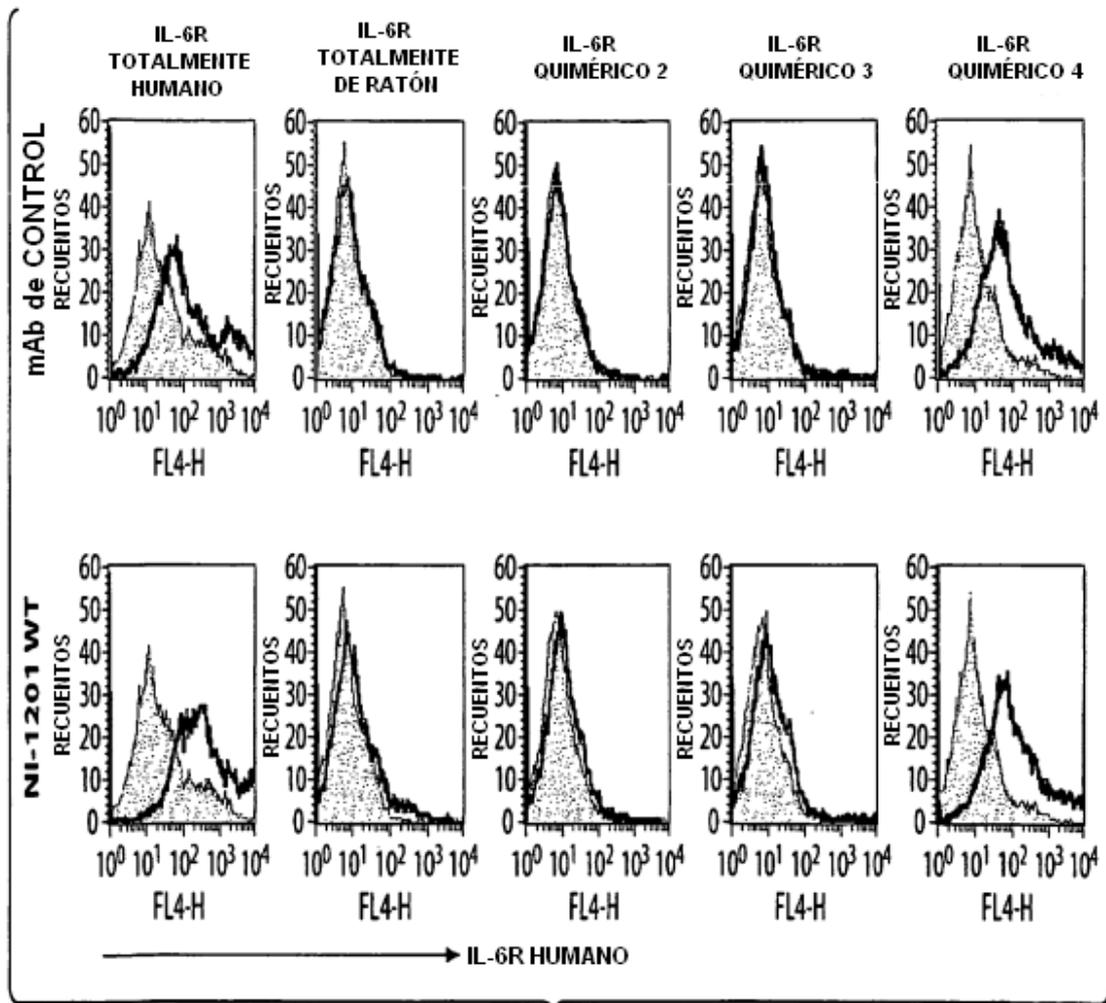


Fig. 6B

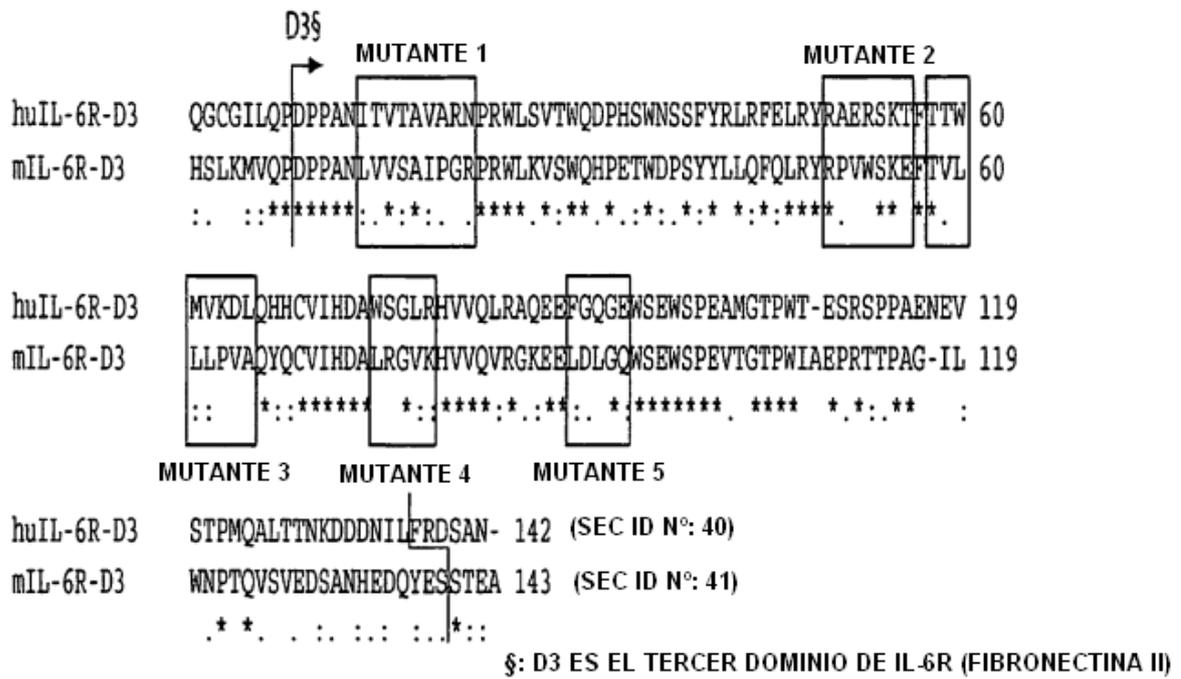


Fig. 6C

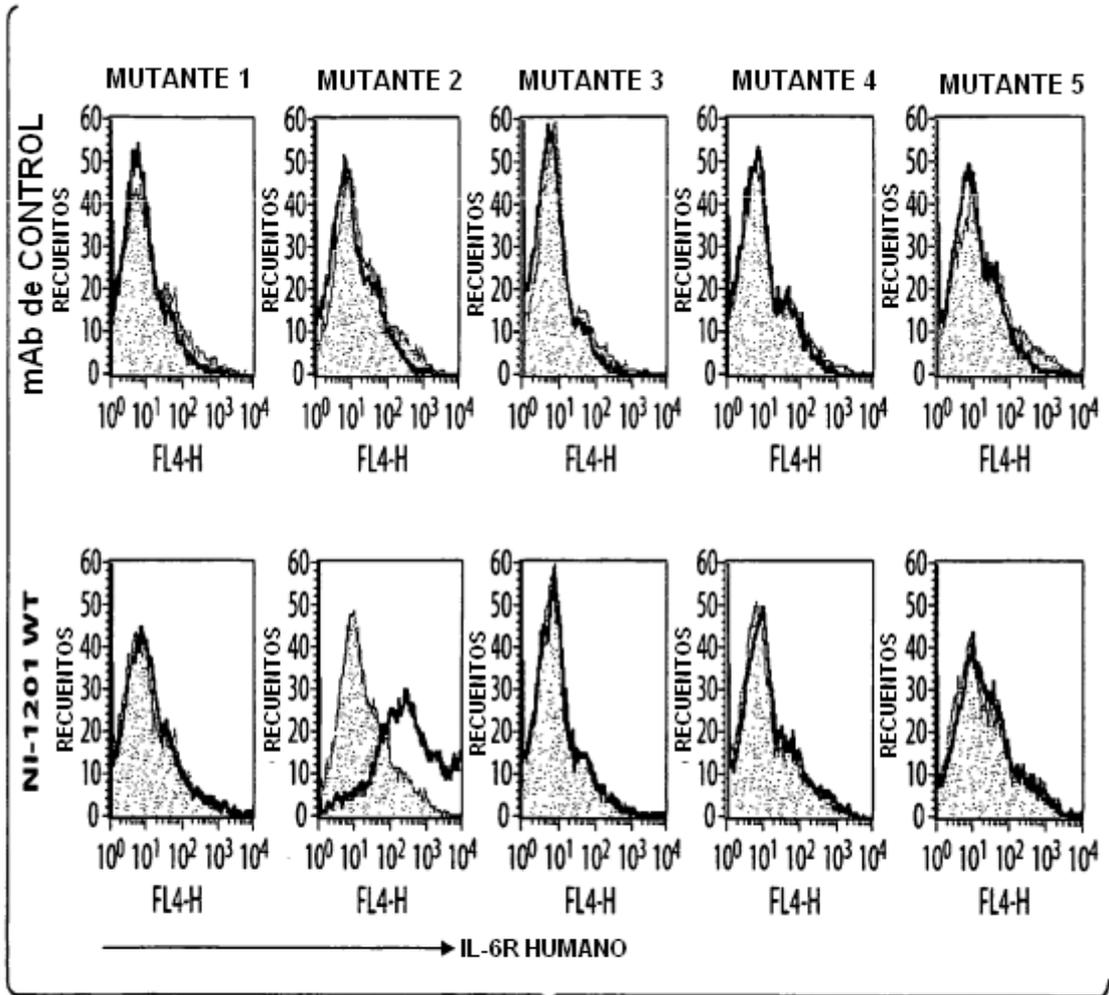


Fig. 6D

HUMANO FRENTA A	HOMOLOGÍA (%)	REACTIVIDAD CRUZADA
CINOMOLGO	97	SI
RATÓN	53	NO
RATA	54	NO

Fig. 7A

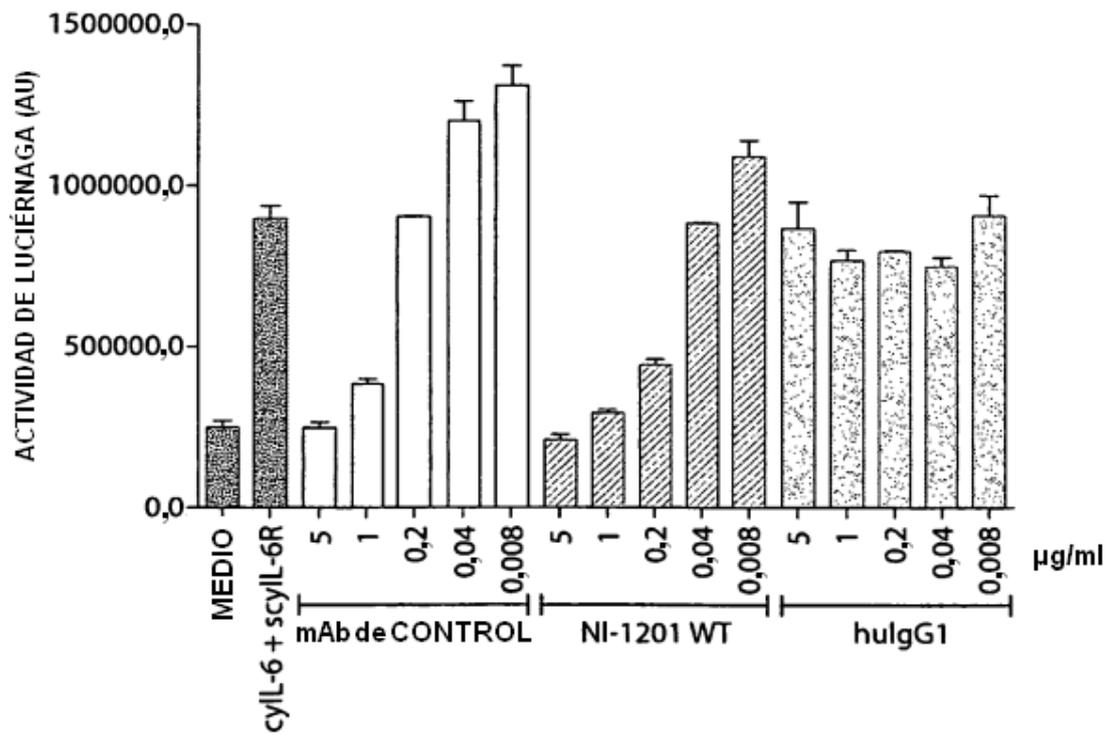


Fig. 7B