

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 618 550**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2007 PCT/GB2007/004527**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2008 WO08065378**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2007 E 07824720 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.02.2017 EP 2087005**

54 Título: **Anticuerpos anti-IL-6 humana**

30 Prioridad:

30.11.2006 US 861704 P

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

21.06.2017

73 Titular/es:

**ASTRAZENECA AB (50.0%)
151 85 Södertälje, SE y
MEDIMMUNE LIMITED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MALLINDER, PHILIP;
LANE, STEVEN GODFREY y
CRUWYS, SIMON CHARLES**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques
o Bemerkungen) en el folleto original publicado
por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 618 550 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 humana

5 Descripción

La presente invención se refiere a miembros de unión, especialmente moléculas de anticuerpo, que inhiben efectos biológicos de IL-6. Los miembros de unión son útiles para el tratamiento de trastornos asociados a IL-6, que incluyen enfermedades inflamatorias y tumores.

10 La interleucina 6 (IL-6) es una citocina pro-inflamatoria pleiotrópica de 26 kDa producida por una variedad de tipos de células, que incluyen fibroblastos estimulados, monocitos y células endoteliales, que forman la principal fuente de IL-6 *in vivo*. Células tales como linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, queratinocitos, osteoblastos y varios otros pueden producir IL-6 con la estimulación. La IL-6 también se expresa de líneas celulares tumorales y células tumorales, por ejemplo, células de carcinoma de pulmón, cáncer de próstata, mieloma, hipernefoma y mixoma cardíaco [1, 2]. En afecciones no inflamatorias, la IL-6 es secretada de tejido adiposo [3].

20 La regulación de la expresión de IL-6 depende del tipo de célula que está produciéndola. En células de mieloma múltiple, la IL-6 parece actuar en un bucle de retroalimentación positiva - estimulando las células para crecer, además de producir más IL-6 [4, 5]. En otros tipos de células, la IL-6 parece inhibir el crecimiento y la activación de células y puede actuar de regulador negativo para algunas citocinas pro-inflamatorias.

25 Para iniciar la señalización celular, la IL-6 se une con baja afinidad a un receptor transmembranario, el receptor de IL-6 alfa (también denominado IL-6R α , IL-6Ra, IL-6R, gp80 o CD126) para formar un complejo "IL-6:IL-6Ra". Este complejo se une al receptor de señal de gp130; IL-6R α y gp130 juntos forman un sitio de unión de IL-6 de alta afinidad, e inducen la formación de un hexámero compuesto de dos copias cada una de IL-6, IL-6Ra y gp130 [6]. No se requieren los dominios transmembranarios y citoplásmicos de IL-6Ra para la transducción de señales, ya que la IL-6Ra también existe como forma secretada soluble (sIL-6R o sIL-6Ra). El receptor soluble se produce tanto por corte y empalme diferencial del mensajero de IL-6Ra como por eliminación proteolítica. sIL-6R es capaz de formar un complejo ligando-receptor con IL-6, "IL-6:sIL-6Ra". Este complejo puede unirse a gp130 en células y así inicia la señalización celular en células positivas para gp130, aunque aquellas células no expresan IL-6Ra. Así, sIL-6R tiene la posibilidad de ensanchar el repertorio de células sensibles a IL-6, y se cree que desempeña una función importante en inflamación mediada por IL-6 [7].

35 Se ha elucidado una estructura cristalina del ligando de IL-6 humana [6]. Se han resuelto la estructura cristalina del dominio extracelular de IL-6Ra humana [8], y la estructura hexamérica del complejo IL-6/IL-6R/gp130 [9]. Estas estructuras combinadas con estudios de mutagénesis han identificado tres sitios sobre la superficie de IL-6 que participan en la actividad funcional de la IL-6 en complejo con los diversos componentes del receptor. Los restos del sitio 1 participan en la interacción entre IL-6 e IL-6Ra. Los restos del sitio 2 participan en la interacción entre IL-6 y el dominio de unión a citocina de gp130. Los restos en el sitio 3 de IL-6 participan en la interacción con el dominio similar a Ig del segundo gp130 en el complejo hexamérico. También se ha identificado un cuarto sitio en IL-6 donde IL-6 interacciona con la segunda molécula de IL-6 en el complejo hexamérico IL-6/IL-6R/gp130 [10].

45 Se han aislado varios anticuerpos monoclonales de ligando anti-IL-6. Se han realizado estudios de mapeo que muestran que éstos se unen a diferentes sitios de unión, como se ha descrito anteriormente, sobre la superficie de IL-6 humana [11, 12, 13, 14, 15].

50 También se han generado varios anticuerpos monoclonales anti-IL-6Ra y mapeado sus sitios de unión sobre IL-6Ra [16, 14, 15, 17].

55 IL-6 pertenece a una familia de citocinas, que incluyen Interleucina-11 (IL-11), factor neurotrófico ciliar (CNTF), oncostatina M (OsM), factor inhibidor de leucemia (LIF), citocina similar a cardiotrofina (CLC) y cardiotrofina 1 (CT-1). Cada uno de los miembros de esta familia tiene sus propias subunidades alfa específicas de receptor y forman complejos con la subunidad de receptor común gp130. La alteración elegida como diana del gen gp130 es embríonicamente letal [18, 19].

Todos los miembros de la familia de IL-6 pueden inducir la expresión de proteínas de fase aguda de hepatocitos.

60 La señalización de IL-6 implica fosforilación de tirosina por las cinasas de la familia JAK, y posterior activación de dos cascadas de señalización intracelular importantes, las vías de SHP2/ERK MAPK y STAT1/3, que conducen a la expresión génica mediante NF-IL-6 y AP-1 [18, 20].

IL-6 muestra un amplio espectro de funciones biológicas que incluyen:

65 hematopoyesis, inducción de respuestas de fase aguda, activación de linfocitos T, estimulación de la secreción de anticuerpos, defensa del huésped contra infección, activación de células de mieloma y osteoclastos [21, 22].

Para una revisión de los efectos de IL-6 véase la ref. [23]. IL-6 se identificó originalmente como un factor de diferenciación de linfocitos B generado por linfocitos T [24], pero posteriormente se ha identificado como un potente activador y factor promotor del crecimiento de muchos tipos de células. Induce la maduración final de linfocitos B en células productoras de anticuerpo y es un factor accesorio esencial para la activación y proliferación de linfocitos T. Estudios han mostrado que IL-6 participa en la activación de linfocitos T auto-reactivos y la proliferación y diferenciación de linfocitos T citotóxicos. IL-6 participa en la hematopoyesis como un cofactor que causa la activación y diferenciación de células madre hemopoyéticas. El efecto de IL-6 sobre la respuesta de fase aguda también está bien documentado [25]. IL-6 induce una variedad de proteínas de fase aguda que incluyen fibrinógeno, alfa-anti-quimotripsina, amiloide A del suero y proteína C reactiva de hepatocitos humanos. Las proteínas de fase aguda controlan respuestas inmunitarias e inflamación y tienen efectos sobre el remodelado de tejido. El nivel en suero de IL-6 se correlaciona bien con el de proteína C reactiva en una variedad de patologías, sugiriendo una función causal de IL-6 en la respuesta de fase aguda. También se ha mostrado que la IL-6 se produce por osteoblastos y parece estar implicada en la activación de osteoclastos y resorción ósea [26, 27, 28]. Paradójicamente se ha sugerido que IL-6 no solo tiene funciones como una citocina pro-inflamatoria, sino que también puede, en ciertas circunstancias y tipos de células, disminuir los efectos de otras citocinas pro-inflamatorias, conduciendo a una reducción en la inflamación.

Debido a que la IL-6 tiene una variedad de efectos biológicos, la elevación de IL-6 participa como citocina clave en una variedad de indicaciones de enfermedad. Se ha mostrado que los niveles de IL-6 circulante se elevan en enfermedades tales como artritis reumatoide, enfermedad de Castleman, artritis idiopática juvenil y enfermedad de Crohn [29]. Debido a esto, la IL-6 participa en la conducción de la patología en estas indicaciones inflamatorias. Además, se ha mostrado que una variedad de tipos de tumor se estimulan por IL-6, que incluye melanoma, carcinoma de células renales, sarcoma de Kaposi, carcinoma de ovario, linfoma, leucemia, mieloma múltiple y carcinoma de próstata [30]. Además, se ha informado de elevados niveles en circulación de IL-6 en varios cánceres. En algunas indicaciones de cáncer se han usado niveles de IL-6 elevados como indicadores de pronóstico de la enfermedad.

Debido a la función de IL-6 en enfermedad, se ha desarrollado una variedad de anticuerpos monoclonales anti-IL-6 humana murinos y quiméricos como posibles terapias.

El documento US5856135 describe un anticuerpo humano reformado para IL-6, derivado de un anticuerpo monoclonal de ratón "SK2".

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

El documento WO2004/020633 (EP1536012) describe una molécula de anticuerpo scFv humana para IL-6 aislada usando tecnología de presentación en fagos. Se informa que scFv tiene una afinidad de 13 nM.

El documento WO 2006/119115 desvela un anticuerpo anti-IL-6, que incluye ácidos nucleicos aislados que codifican al menos un anticuerpo anti-IL-6, vectores, células huésped, animales transgénicos o plantas, y métodos de preparación y uso de los mismos tienen aplicaciones en composiciones, métodos y dispositivos de diagnóstico y/o terapéuticos.

El documento WO 2004/039826 desvela anticuerpos anti-IL-6 quiméricos, humanizados o injertados en derivados del anticuerpo CLB-8 murino.

Se ha usado un anticuerpo anti-IL-6 murino, elsilimomab (también conocido como B-E8) para tratar pacientes con mieloma múltiple [31, 32], carcinoma de células renales [33] y artritis reumatoide [i] y se observaron mejoras en ciertos marcadores de diagnóstico en pacientes tratados con las tres enfermedades. También se ha usado BE-8 para tratar pacientes positivos para el VIH con linfoma de células grandes inmunoblásticas o polimórficas [35] con alivio de síntomas sistémicos (es decir, fiebre, sudores, caquexia) y supresión del crecimiento espontáneo del linfoma en aproximadamente el 50 % de los pacientes.

Sin embargo, la rápida eliminación de este anticuerpo y las posibles reacciones anafilácticas debido a la producción de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA) a elsilimomab han limitado su uso en la clínica [36].

En general, el uso clínico de anticuerpos monoclonales murino está limitado, ya que tales anticuerpos frecuentemente inducen HAMA. Frecuentemente se producen HAMA dirigidos contra la parte Fc de la inmunoglobulina de ratón, produciendo la rápida eliminación de mAb anti-IL-6 y la posible reacción anafiláctica [36]. También se sabe que la farmacocinética de los anticuerpos de ratón en seres humanos es diferente de los anticuerpos humanos que tienen semividas más cortas y elevadas tasas de eliminación.

Para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos murinos en seres humanos, se han construido anticuerpos quiméricos con regiones variables de ratón y regiones constantes humanas. Se ha usado un anticuerpo anti-IL-6 humano-ratón quimérico cCLB8 (conocido como CNTO 328) para tratar pacientes con mieloma múltiple [5, 37], con

estabilización de la enfermedad observada en la mayoría de pacientes.

Sin embargo, aunque los anticuerpos quiméricos son menos inmunogénicos que los mAb murinos, se ha informado de respuestas de anticuerpos anti-quiméricos humanos (HACA) [38].

5 Se han llevado a cabo estudios de mapeo en cCLB8 que muestran que es un inhibidor del sitio I de actividad de IL-6. Brakenhoff et al [39] demostraron que cCLB8 se une a mutantes de delección del extremo amino de IL-6 Pro46, Ser49, Glu51, Ile53, Asp54 y también se une a mutantes de delección Asp62 y Met77 (sin embargo a afinidad reducida). Los mismos autores muestran que cCLB8 inhibe IL-6 no mutante, pero no la delección 5 del extremo C en un ensayo de proliferación de células B9 y que cCLB8 no se unirá a IL-6 del C-4 que tiene delecionados los 4 últimos restos de aminoácido del extremo C. Estos datos sugieren que cCLB8 se une a un epítipo que implica a los restos del extremo C de IL-6.

15 Kalai et al. [17] demostraron que cCLB8 dejó de reconocer los mutantes de IL-6 F106E, F102E/F106E o R207E/R210E. Sin embargo, el anticuerpo no reconoce los mutantes de IL-6 R207E y R207W. La unión de cCLB8 a los mutantes R207W y R207E es aproximadamente el 50 % de aquella en comparación con el no mutante, que sugiere que los restos F106 y R210 participan en el epítipo de unión de cCLB8 y el resto R207 participa en la unión, pero tiene menos efecto que los restos F106 y R210. cCLB8 se une a los mutantes del sitio I de IL-6 R196M, K199N/Q203L y Q203L con 100 % de actividad en comparación con no mutante. Brakenhoff et al. [13] demostraron que cCLB8 se une a las siguientes variantes de IL-6; Q182H, N183K, W185Q, W185G, W185R, T190P, Q182H/Q184P, W185R/S197N, Q187E/T190P, I164L/L186R/M189I, que no es sorprendente, ya que la mayoría de éstos están distalmente separados de los restos del sitio 1 de IL-6.

25 Se ha recalcado además el efecto positivo de inhibir la señalización de IL-6 en cáncer y enfermedades inflamatorias por el uso del anticuerpo anti-IL-6Ra humanizado Tocilizumab (también conocido como hPM-1, MRA y Actemra). Éste es una versión humanizada del anticuerpo anti-IL6Ra murino PM-1. El tratamiento de pacientes con este anticuerpo ha demostrado ser eficaz en varias enfermedades, que incluyen artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil, enfermedad de Crohn, trastorno mieloproliferativo, enfermedad de Castleman y lupus eritematoso sistémico [40].

30 Los presentes inventores han tenido éxito en aislar miembros de unión altamente potentes, de alta afinidad, para IL-6. Debido a su alta afinidad y potencia, y su rendimiento en estudios funcionales como se describe en el presente documento, los miembros de unión de la invención son particularmente adecuados para su uso en tratamiento terapéutico y/o de diagnóstico del cuerpo humano o animal.

35 En la presente invención, el miembro de unión es una molécula de anticuerpo aislada para IL-6 humana que comprende un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112 y un dominio VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117.

40 Los miembros de unión son útiles para tratar trastornos asociados a IL-6, como se describe en detalle en cualquier parte en el presente documento.

45 Un anticuerpo anti-IL-6 humano para el tratamiento de enfermedades inflamatorias y cáncer proporciona ventajas significativas con respecto a enfoques existentes. Por ejemplo, anticuerpos humanos no inducen respuestas HAMA o HACA, y tienen una semivida *in vivo* más larga en comparación con anticuerpos no humanos o quiméricos.

50 Los presentes inventores también han reconocido que los miembros de unión para IL-6 ofrecen ventajas significativas en comparación con miembros de unión para IL-6Ra, especialmente en términos de administración *in vivo* y tratamiento, como se describe en cualquier parte en el presente documento.

55 Como se describe en más detalle en los ejemplos, los presentes inventores aislaron una molécula de anticuerpo parental, designada CAN022D10, con un conjunto de secuencias de CDR como se muestra en la Tabla 7. Mediante un proceso de optimización los presentes inventores generaron un panel de clones de anticuerpo: Anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23, con secuencias de CDR derivadas de las secuencias de CDR de origen y que tienen sustituciones en las posiciones indicadas en la Tabla 7.

60 Así, por ejemplo, puede observarse de la Tabla 7 que el Anticuerpo 2 tiene una secuencia de HCDR1 de origen en la que el resto de Kabat 35 se sustituye por Thr (SEQ ID NO: 13). Los Anticuerpos 14 y 22 contienen un resto adicional, es decir, una inserción de aminoácido, en HCDR3: Ile en el resto de Kabat 100D, que no está presente en la secuencia de HCDR3 de origen SEQ ID NO: 5. Los Anticuerpos 7, 8, 10, 16-19, 21 y 23 no contienen el resto de Kabat 95 en LCDR3, mientras que LCDR3 de origen (SEQ ID NO: 10) comprende Pro en el resto de Kabat 95. HCDR3 de origen, y las secuencias de HCDR3 de todos los anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23, tienen Trp en el resto de Kabat 95 y Asp en el resto de Kabat 101, que indica que H95 Trp y H101 Asp pueden contribuir a la unión y/o potencia para IL-6 en miembros de unión de la invención.

65 Las secuencias del dominio VH, dominio VL y de CDR del anticuerpo de origen CAN022D10, y de los anticuerpos 2,

3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23 como se describen en el presente documento, se muestran en el listado adjunto de secuencias.

5 En el presente documento se describen miembros de unión que se ha mostrado que neutralizan IL-6 con alta potencia. Neutralización significa la inhibición de una actividad biológica de IL-6. Los miembros de unión descritos en el presente documento pueden neutralizar una o más actividades de IL-6. La actividad biológica inhibida es normalmente la unión de IL-6 a uno o más de sus componentes de unión. Por ejemplo, la actividad biológica inhibida puede ser la unión de IL-6 a IL-6R α transmembranario y/o soluble. Esto se demuestra en los siguientes ensayos, que se describen brevemente aquí y más adelante en más detalle: El ensayo de TF-1 muestra que los miembros de
10 unión descritos en el presente documento inhiben la unión de IL-6 a IL-6Ra de membrana ya que las células TF-1 no parecen producir IL-6Ra soluble. Como tales, los miembros de unión descritos en el presente documento, por tanto, inhiben la unión de IL-6 al receptor de membrana. En el ensayo de fibroblastos sinoviales, los miembros de unión descritos en el presente documento inhiben la unión de IL-6 a IL-6Ra soluble ya que sIL-6Ra necesita ser añadido a este ensayo para que funcione. IL-1beta añadida induce la producción de IL-6 endógena, que cuando es inhibida por
15 un miembro de unión de la presente invención previene la producción de VEGF.

Como se describe en el presente documento, puede inhibirse la unión de IL-6 de primate humano o no humano, por ejemplo cinomolgo, a IL-6R α , por ejemplo un miembro de unión puede inhibir la unión de IL-6 humana madura a IL-6R α .
20

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

25 Puede determinarse la neutralización de la potencia de un miembro de unión. La potencia se expresa normalmente como un valor de CI_{50} , en nM a menos que se establezca de otro modo. En ensayos funcionales, CI_{50} es la concentración de un miembro de unión que reduce una respuesta biológica el 50 % de su máximo. En estudios de unión a ligando, CI_{50} es la concentración que reduce la formación del complejo ligando-receptor el 50 % del nivel de unión específica máxima. CI_{50} puede calcularse representando el % de respuesta biológica máxima en función del
30 log de la concentración del miembro de unión, y usando un programa de software, tal como Prism (GraphPad) u Origen (Origen Labs) para ajustar una función sigmoide a los datos para generar valores de CI_{50} . La potencia puede determinarse o medirse usando uno o más ensayos conocidos para el experto y/o como se describen o refieren en el presente documento.

35 La neutralización de la actividad de IL-6 por un miembro de unión en un ensayo descrito en el presente documento, por ejemplo el ensayo de proliferación de TF-1 u otros ensayos basados en células descritos más adelante, indica que el miembro de unión se une y neutraliza IL-6. Otros métodos que pueden usarse para determinar la unión de un miembro de unión a IL-6 incluyen ELISA, transferencia Western, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad y ensayos bioquímicos.
40

Se demostró que los miembros de unión descritos en el presente documento se unían y neutralizaban efectos biológicos de IL-6 humana endógena, como se muestra en un ensayo de inhibición de la liberación de VEGF de fibroblastos sinoviales humanos en respuesta a IL-6 humana endógena, informado en los Ejemplos 1.7 y 2.7 en el presente documento. En este ensayo, fibroblastos sinoviales de pacientes con artritis reumatoide producen IL-6 en
45 respuesta a la estimulación con IL-1 β y IL-6R α soluble, conduciendo a la secreción inducida por IL-6 de VEGF. La IL-6 producida por los fibroblastos sinoviales humanos representa así la IL-6 humana endógena. La IL-6 endógena es la diana molecular para el tratamiento médico en seres humanos, así que la neutralización de IL-6 endógena es un indicador importante del potencial terapéutico de los miembros de unión. Como los ensayos se realizaron con fibroblastos sinoviales obtenidos de pacientes con artritis reumatoide, los resultados son particularmente relevantes para usar los miembros de unión para tratar artritis reumatoide. La potencia de neutralización de moléculas de anticuerpo optimizadas probadas en el ensayo de liberación de VEGF superó la del anticuerpo anti-IL-6 conocido CNTO-328.
50

Un miembro de unión descrito en el presente documento puede tener una CI_{50} inferior a 50 nM, por ejemplo inferior a 5 nM, por ejemplo inferior a 1 nM en un ensayo de inhibición de la liberación de VEGF de fibroblastos sinoviales humanos con IL-1 β humana 0,6 pM e IL-6R α humana soluble 2,4 nM.
55

Se sabe que la IL-6 endógena es una mezcla de formas glucosiladas y no glucosiladas. Se ha demostrado la unión de un miembro de unión descrito en el presente documento a IL-6 endógena en el ensayo de fibroblastos sinoviales, ya que este ensayo utiliza IL-6 de fibroblastos sinoviales humanos, es decir, IL-6 endógena.
60

Un miembro de unión descrito en el presente documento puede inhibir la proliferación inducida por IL-6 de células TF-1. TF-1 es una línea celular premeioloide humana establecida de un paciente con eritroleucemia (Kitamura et al 1989). La línea celular TF-1 requiere la presencia de un factor de crecimiento para supervivencia y proliferación.
65 Células TF-1 de factores de crecimiento individuales pueden responder para incluir IL-6, GM-CSF y oncostatina M. Un miembro de unión descrito en el presente documento puede tener una CI_{50} inferior a 100 nM, por ejemplo inferior

a 20 nM, 10 nM o 1 nM, por ejemplo inferior a 100 pM, 70 pM, 50 pM, 40 pM, 30 pM, 20 pM o 10 pM, en un ensayo para inhibición de la proliferación de células TF-1 en respuesta a IL-6 humana 20 pM. Como se describe en el presente documento (véase el Ejemplo 1.5), se mostró que una IgG de origen "CAN022D10" tenía una CI_{50} en el ensayo de proliferación de TF-1 de aproximadamente 93 nM, y los presentes inventores generaron posteriormente

5 variantes optimizadas de CAN022D10 que tienen potencia sustancialmente elevada (CI_{50} generalmente inferior a 100 pM), como se muestra en los Ejemplos 2.2, 2.5 y 2.6 (Tablas 3, 4 y 5, respectivamente). En particular, se midió que los valores de CI_{50} para algunos de los clones optimizados eran bajos como 5 pM o menos, por ejemplo el Anticuerpo 7, Anticuerpo 17 y Anticuerpo 18 de la IgG de línea germinal, que representa potencia de neutralización

10 extremadamente alta de estos anticuerpos.

Un miembro de unión descrito en el presente documento puede inhibir la proliferación inducida por IL-6 de células B9. Las células B9 son un sub-clon de la línea celular de hibridoma de linfocitos B murina, B13.29, seleccionada basándose en su respuesta específica a IL-6. Las células B9 requieren IL-6 para la supervivencia y proliferación y responden a concentraciones muy bajas de IL-6. Como tal, puede evaluarse la proliferación de estas células en

15 presencia de un anticuerpo contra IL-6 y determinarse la afinidad del anticuerpo. El Ejemplo 2.10 en el presente documento muestra que el Anticuerpo 18 inhibió la proliferación de células B9 en respuesta a IL-6, y mostró alta afinidad en este ensayo.

La producción de auto-anticuerpos en artritis reumatoide es sobre todo de la clase IgM. SKW6.4 es una línea de linfocitos B linfoblastoide humana que secreta IgM clónica. Tras la estimulación con IL-6, estas células secretan IgM, así se percibió que este ensayo era relevante para artritis reumatoide. Pueden usarse células SKW6.4 en un ensayo para determinar la potencia de miembros de unión para neutralizar IL-6, determinando la inhibición de la secreción de IgM en respuesta a IL-6. Un miembro de unión descrito en el presente documento puede tener una CI_{50} inferior a

20 10 pM, por ejemplo inferior a 5 pM, en un ensayo de inhibición de células SKW6.4 de secreción de IgM en respuesta a IL-6 humana 100 pM. Se mostró que el Anticuerpo 18 neutralizaba efectos de IL-6 en este ensayo - véase el Ejemplo 2.11 (Tabla 9).

Se describen en el presente documento miembros de unión de alta afinidad por IL-6 humana. También se demostró la alta afinidad por IL-6 de mono cinomolgo. Un miembro de unión descrito en el presente documento puede unirse a

30 IL-6 humana y/o IL-6 de cinomolgo con una K_D de no más de 1 nM, por ejemplo no más de 100 pM, 50 pM, 30 pM o 10 pM. La K_D puede determinarse por resonancia de plasmones superficiales, por ejemplo BIAcore®. Se describen mediciones BIAcore® de afinidad en el presente documento en el Ejemplo 2.9. Sorprendentemente, se encontró que la afinidad de los Anticuerpos 7 y 18 estaba más allá del límite medible usando el instrumento BIAcore®, que indica un valor de K_D inferior a 10 pM.

Como se describe en cualquier parte en el presente documento, la resonancia de plasmones superficiales implica pasar un analito en fase fluida sobre un ligando unido a un soporte, y determinar la unión entre el analito y el ligando. La resonancia de plasmones superficiales puede realizarse, por ejemplo, pasando IL-6 en fase fluida sobre un

40 miembro de unión unido a un soporte. Los datos de resonancia de plasmones superficiales pueden ajustarse a un modelo de datos de analito monovalente. Puede calcularse una constante de afinidad K_d a partir de la relación de constantes de velocidad k_d/k_a como se ha determinado por resonancia de plasmones superficiales usando un modelo de datos de analito monovalente.

La afinidad de un miembro de unión por IL-6 puede calcularse alternativamente por análisis de Schild, por ejemplo basándose en un ensayo de inhibición de la proliferación de células TF-1 en respuesta a concentraciones variadas de IL-6 humana. Un miembro de unión descrito en el presente documento puede tener una afinidad inferior a 10 pM, por ejemplo inferior a 1 pM, como se calcula por análisis de Schild. Como se informa en el Ejemplo 2.10 en el presente documento, la afinidad del Anticuerpo 18 por IL-6 humana se calculó como 0,4 pM usando análisis de

50 Schild.

Un miembro de unión descrito en el presente documento puede opcionalmente no reaccionar de forma cruzada con uno o más, o todos, de los siguientes: factor inhibidor de leucemia (LIF), factor neurotrófico ciliar (CNTF), IL-11 u oncostatina M.

55 Un miembro de unión descrito en el presente documento puede opcionalmente no reaccionar de forma cruzada con IL-6 de rata, IL-6 de ratón y/o IL-6 de perro.

La reactividad cruzada de miembros de unión para unión a otras proteínas o IL-6 no humana puede probarse, por ejemplo, en un ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo para la inhibición de la unión de IL-6 humana al

60 miembro de unión inmovilizado sobre un soporte, tal como el ensayo de competición por epítipo DELFIA® como se describe en el Ejemplo 1.6. Por ejemplo, cualquiera o todos de LIF, CNTF, IL-11, oncostatina M, IL-6 de rata e IL-6 de ratón puede no mostrar inhibición, menos del 50 % de inhibición, o puede tener una CI_{50} superior a 0,5 mM o superior a 1 mM en el ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo para la inhibición de la unión de IL-6 humana marcada al miembro de unión inmovilizado sobre un soporte. Por ejemplo, cualquiera o todos de LIF, CNTF, IL-11,

65 oncostatina M, IL-6 de rata y IL-6 de ratón puede mostrar no inhibición o puede tener una CI_{50} de al menos 10 o 100 veces superior a la de IL-6 humana no marcada en el ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo para probar la

reactividad cruzada. En este ensayo, se usa IL-6 humana madura no mutante marcada a una concentración final de Kd de su interacción con el miembro de unión.

5 Un miembro de unión descrito en el presente documento puede reaccionar de forma cruzada con IL-6 de cinomolgo. La reactividad cruzada puede determinarse como inhibición de la unión de IL-6 humana marcada al miembro de unión inmovilizado sobre un soporte, en el ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo descrito anteriormente. Por ejemplo, la IL-6 de cinomolgo puede tener una CI_{50} inferior a 5 nM, por ejemplo inferior a 2,5 nM, por ejemplo aproximadamente 1 nM, en este ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo. La IL-6 de cinomolgo puede tener una CI_{50} inferior a 10 veces diferente, por ejemplo inferior a 5 veces diferente, de la CI_{50} de IL-6 humana sin marcar en este ensayo.

10 Un protocolo detallado para el ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo para determinar la reactividad cruzada se proporciona en la sección de Materiales y métodos. Ejemplos de datos de reactividad cruzada obtenidos en este ensayo se muestran en la Tabla 2 en el Ejemplo 1.6.

15 Como se informa en el Ejemplo 2.8, los miembros de unión descritos en el presente documento mostraron alta reactividad cruzada con IL-6 de cinomolgo, y no mostraron o limitaron la reactividad cruzada con IL-6 de rata, ratón o de perro.

20 Los datos de reactividad cruzada indican que los miembros de unión descritos en el presente documento se unen a un epítipo en IL-6 que está conservado entre las secuencias de IL-6 humana y de cinomolgo, y es diferente en la secuencia de IL-6 de ratón, rata y de perro en comparación con la secuencia humana.

25 Se cree que los miembros de unión descritos en el presente documento se unen a la región del "sitio 1" de IL-6, que es la región que interacciona con IL-6R α . Los miembros de unión descritos en el presente documento pueden así inhibir competitivamente la unión de IL-6 a IL-6R α , neutralizando así los efectos biológicos de IL-6 que están mediados por IL-6R α .

30 Los presentes inventores investigaron la capacidad de uno de los anticuerpos descritos en el presente documento, Anticuerpo 18, para unirse a IL-6 humana mutante, en la que se manipularon mutaciones en los restos del sitio 1. Como se describe en el Ejemplo 3, los presentes inventores identificaron mutaciones en IL-6 humana que produjeron unión reducida por el Anticuerpo 18, que indica que los restos mutados participaron en el reconocimiento por el Anticuerpo 18 y pueden formar parte del epítipo en IL-6 unido por este anticuerpo.

35 Por ejemplo, en un ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo para la inhibición de la unión de IL-6 humana no mutante marcada al Anticuerpo 18 inmovilizado sobre un soporte, no se observó inhibición para la IL-6 humana mutante de Arg207Glu (SEQ ID NO: 177), que indica que el Anticuerpo 18 se une a IL-6 humana en el resto Arg207.

40 Como el Anticuerpo 18 y los Anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 19, 21, 22 y 23 se derivaron todos de un anticuerpo CAN22C10 de origen, y todos tienen CDR estructuralmente relacionadas, se espera que todas estas moléculas de anticuerpo se unan al mismo epítipo de solapamiento o muy similar. Por consiguiente, también se espera que los resultados del mapeo de epítopos obtenidos con el Anticuerpo 18 sean representativos de CAN22D10, los otros anticuerpos optimizados descritos en el presente documento.

45 Un miembro de unión descrito en el presente documento puede unirse a IL-6 humana en Phe102 y/o Ser204. Un miembro de unión descrito en el presente documento puede también unirse a IL-6 humana en Arg207. Opcionalmente, un miembro de unión puede unirse a restos flanqueantes o restos estructuralmente próximos en la molécula de IL-6, además de unirse a Phe102 y/o Ser 204. Convenientemente, la numeración de restos se corresponde con IL-6 humana de longitud completa (SEQ ID NO: 161). Sin embargo, la unión puede determinarse usando IL-6 humana madura. La unión a restos de IL-6 es como se ha determinado por mutagénesis dirigida al sitio, como se explica a continuación.

50 La mutagénesis de aminoácidos individuales y regiones de proteínas con el fin de correlacionar la estructura con la actividad es muy conocida para un experto en la materia y se ha usado para definir regiones de proteínas que se unen a anticuerpos [41]. La unión a y/o neutralización de IL-6 humana mutante puede usarse para evaluar si un miembro de unión se une a Phe102, Ser204 y/o Arg207. La ausencia de unión o neutralización, o unión o neutralización significativamente reducida, con IL-6 mutante en comparación con no mutante indica que un miembro de unión se une al resto mutado.

60 La unión a un resto en IL-6 puede determinarse usando IL-6 mutada en el resto seleccionado en un ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo de inhibición de la unión de IL-6 humana no mutante humana al miembro de unión inmovilizado sobre un soporte, en la que la IL-6 humana madura no mutante marcada está a una concentración final igual a la Kd de su interacción con el miembro de unión. Un ejemplo de este ensayo y datos de competición obtenidos se muestran en el Ejemplo 3, con resultados presentados en la Tabla 10. Si la IL-6 mutante no inhibe la unión de IL-6 no mutante marcada al miembro de unión, o si la IL-6 mutante tiene una CI_{50} superior a la de la IL-6 no mutante sin marcar (por ejemplo, superior a 10 veces o 100 veces mayor), esto indica que el resto

mutado está unido por el miembro de unión.

IL-6 humana mutante en Phe102Glu (SEQ ID NO: 175), IL-6 humana mutante en Ser204Glu (SEQ ID NO: 176) y/o IL-6 humana mutante en Arg207Glu (SEQ ID NO: 177) pueden no mostrar inhibición, o pueden tener una CI_{50} superior a 100 veces mayor que la CI_{50} de IL-6 humana no mutante (SEQ ID NO: 165), en un ensayo de fluorescencia resuelta en el tiempo para la inhibición de IL-6 humana no mutante marcada que se une a un miembro de unión de la invención inmovilizado sobre un soporte, en la que la IL-6 humana no mutante marcada está a una concentración final igual a la K_d de su interacción con el miembro de unión.

Un miembro de unión descrito en el presente documento puede opcionalmente no unirse a y/o neutralizar IL-6 humana mutante que tiene una mutación en el resto Phe102, Ser204 y/o Arg207, por ejemplo mutación Phe102Glu, Ser204Glu, Ser204Tyr y/o Arg207Glu. Ejemplos de secuencias de IL-6 humana mutante son SEQ ID NOS: 175-177). Así, un miembro de unión descrito en el presente documento puede no inhibir la unión de una o más de estas moléculas de IL-6 mutantes a IL-6R α .

Un miembro de unión descrito en el presente documento puede comprender una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una molécula de anticuerpo humana. El miembro de unión normalmente comprende un dominio VH y/o VL de anticuerpo. Los dominios VH y VL de miembros de unión también se describen en el presente documento. Dentro de cada uno de los dominios VH y VL están regiones determinantes de la complementariedad ("CDR") y regiones estructurales ("FR"). Un dominio VH comprende un conjunto de HCDR y un dominio VL comprende un conjunto de LCDR. Una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VH de anticuerpo que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de VH y una región estructural. Puede comprender alternativamente o también un dominio VL de anticuerpo que comprende una CDR1, CDR2 y CDR3 de VL y una región estructural. Una región estructural de dominio VH o VL comprende cuatro regiones estructurales, FR1, FR2, FR3 y FR4, intercaladas con CDR en la siguiente estructura:

FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4.

Ejemplos de dominios VH y VL de anticuerpo y CDR comprendidas en los miembros de unión descritos en el presente documento son como se enumeran en el listado de secuencias adjunto que forma parte de la presente divulgación. CDR adicionales se desvelan a continuación y en la Tabla 7. Como se describe en el presente documento, un "conjunto de CDR" comprende CDR1, CDR2 y CDR3. Así, un conjunto de HCDR se refiere a HCDR1, HCDR2 y HCDR3, y un conjunto de LCDR se refiere a LCDR1, LCDR2 y LCDR3. A menos que se establezca de otro modo, un "conjunto de CDR" incluye HCDR y LCDR. Normalmente, los miembros de unión de la invención son anticuerpos monoclonales.

Un miembro de unión descrito en el presente documento puede comprender un sitio de unión al antígeno dentro de una molécula no de anticuerpo, normalmente proporcionada por una o más CDR, por ejemplo, un conjunto de CDR en un armazón de proteína no de anticuerpo, como se trata además más adelante.

En el presente documento se describe un miembro de unión que comprende el conjunto de origen de CDR como se muestra en la Tabla 7 para CAN022D10 de origen, en el que HCDR1 es SEQ ID NO: 3 (restos de Kabat 31-35), HCDR2 es SEQ ID NO: 4 (restos de Kabat 50-65), HCDR3 es SEQ ID NO: 5 (restos de Kabat 95-102), LCDR1 es SEQ ID NO: 8 (restos de Kabat 24-34), LCDR2 es SEQ ID NO: 9 (restos de Kabat 50-56) y LCDR3 es SEQ ID NO: 10 (restos de Kabat 89-97).

Un miembro de unión descrito en el presente documento puede comprender una o más CDR como se describen en el presente documento, por ejemplo una CDR3, y opcionalmente también una CDR1 y CDR2 para formar un conjunto de CDR. La CDR o conjunto de CDR pueden ser una CDR de origen o conjunto de origen de CDR, o puede ser una CDR o conjunto de CDR de cualquiera de los anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 o 23, o puede ser una variante de los mismos como se describe en el presente documento.

Por ejemplo, un miembro de unión o un dominio VL descrito en el presente documento puede comprender una LCDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 120.

Un miembro de unión puede comprender un conjunto de CDR de H y/o L del anticuerpo de origen o cualquiera de los anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 o 23 con una o más mutaciones de aminoácido dentro del conjunto desvelado de CDR de H y/o L. Las mutaciones de aminoácidos son sustituciones, deleciones o inserciones de un aminoácido. Por ejemplo, puede haber hasta 20, por ejemplo hasta 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 o 2 mutaciones, por ejemplo, sustituciones, dentro del conjunto de CDR de H y/o L. Por ejemplo, puede haber hasta 6, 5, 4, 3 o 2 mutaciones, por ejemplo sustituciones, en HCDR3 y/o puede haber hasta 6, 5, 4, 3 o 2 mutaciones, por ejemplo sustituciones, en LCDR3. HCDR3 y/o LCDR3 pueden contener opcionalmente una inserción o deleción de un aminoácido en comparación con el conjunto desvelado de H y/o LCDR. Las sustituciones puede ser, por ejemplo, en las posiciones sustituidas en cualquiera de los Anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 o 23, como se muestra en la Tabla 7. Así, las sustituciones pueden estar opcionalmente en números de Kabat seleccionados de los siguientes:

ES 2 618 550 T3

resto de Kabat 35 en HCDR1;
resto de Kabat 64 en HCDR2;
resto de Kabat 96, 97, 98, 99, 100, 100A, 100B, 100C y/o 102 en HCDR3;
resto de Kabat 34 en LCDR1;
5 resto de Kabat 89, 90, 91, 92, 93, 94, 96 o 97 en LCDR3.

Las mutaciones de aminoácido pueden comprender mutaciones como se muestra en la Tabla 7, por ejemplo sustituciones de aminoácido como se indica.

10 Por ejemplo, un miembro de unión o un dominio VH descrito en el presente documento puede comprender la HCDR1 de origen con el resto de Kabat Ile 35 sustituido por Thr o Val.

Un miembro de unión o un dominio VH descrito en el presente documento puede comprender la HCDR2 de origen con el resto de Kabat Lys 64 sustituido por Arg.

15 Un miembro de unión o un dominio VH puede comprender la HCDR3 de origen con una o más de las siguientes mutaciones:

20 resto de Kabat Ala 96 sustituido por Glu;
resto de Kabat Asp 97 sustituido por Glu o Asn;
resto de Kabat Asp 98 sustituido por Gly, Glu o His;
resto de Kabat His 99 sustituido por Gly o Thr;
resto de Kabat Tyr 100 sustituido por Pro, Asn, Arg, Trp o Ala;
resto de Kabat Tyr 100A sustituido por Ala, Arg, Thr, Gly, Asn, Pro o Ser;
25 resto de Kabat 100B sustituido por His, Trp, Gln, Pro o Thr;
resto de Kabat Ile 100C sustituido por Ala, Val, His, Tyr o Leu;
Ile insertada en el resto de Kabat 100D;
resto de Kabat Val 102 está sustituido por Leu, His, Met o Ile.

30 Así, un miembro de unión o un dominio VH descrito en el presente documento puede comprender una HCDR3 en la que el resto de Kabat 100D es Ile o en la que el resto de Kabat 100D está ausente.

Un miembro de unión o un dominio VL descrito en el presente documento puede comprender la LCDR1 de origen en la que el resto de Kabat Ala 34 está sustituido por Thr.

35 Un miembro de unión de un dominio VL descrito en el presente documento puede comprender la LCDR3 de origen con una o más de las siguientes mutaciones:

40 resto de Kabat Gln 89 sustituido por Met o Ala;
resto de Kabat Gln 90 sustituido por Asn, Ser o Ala;
resto de Kabat Ser 91 sustituido por Asn, Gly, Ala o His;
resto de Kabat Tyr 92 sustituido por Trp, Ser, Lys o Phe;
resto de Kabat Ser 93 sustituido por Leu, Lys, Arg o Ala;
resto de Kabat Thr 94 sustituido por Ala, Gly o Pro;
45 resto de Kabat Pro 95 deletado;
resto de Kabat Trp 96 sustituido por Gly;
resto de Kabat Thr 97 sustituido por Ser.

50 Así, un miembro de unión o un dominio VL descrito en el presente documento puede comprender una LCDR3 en la que el resto de Kabat 95 es Pro o en la que el resto de Kabat 95 está ausente.

En el presente documento se describe un miembro de unión aislado para IL-6 humana que comprende un conjunto de CDR: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que el conjunto de CDR tiene 22 o menos alteraciones de aminoácido, por ejemplo hasta 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 alteraciones, o ninguna alteración, de un conjunto de CDR en el que:

60 HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3;
HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4;
HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 115;
LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8;
LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9; y
LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 120.

65 Una alteración de aminoácido puede ser una sustitución, inserción o deleción. Ejemplos de posiciones de Kabat que pueden estar sustituidas, y ejemplos de sustituciones de restos, se tratan a continuación, y la Tabla 7 ilustra algunas de las sustituciones.

Como se muestra en la Tabla 7, la longitud de HCDR3 y LCDR3 varió entre diferentes anticuerpos optimizados descritos en el presente documento. Con respecto a las CDR de origen de CAN022D10, se observó una inserción entre los restos de Kabat 100 a 102 (mostrados en la Tabla 7 en el resto de Kabat 100D) en algunos anticuerpos, y se observó una delección entre los restos de Kabat 92 a 97 en otros anticuerpos. La delección en el resto de Kabat 95 no se observó en combinación con la inserción. Así, puede ser ventajoso que las secuencias de HCDR3 de 12 restos más largas se combinen con las secuencias de LCDR3 de 9 restos más largas, y puede ser ventajoso que las secuencias de HCDR3 de 11 restos más cortas se combinen con las secuencias de LCDR3 de 8 restos más cortas.

Según el sistema de numeración de Kabat, los restos de LCDR3 están numerados de 89 a 97. Las secuencias de LCDR3 más cortas de 9 restos no están previstas por el sistema de numeración de Kabat. Los miembros de unión descritos en el presente documento pueden tener una LCDR3 más corta de 9 restos, por ejemplo LCDR3 puede tener 8 restos de longitud, como se muestra en la Tabla 7. Los presentes inventores numeran los 8 restos de LCDR3 89, 90, 91, 92, 93, 94, 96 y 97, respectivamente. En la Tabla 7, la delección es así mostrada en el resto de Kabat 95. Sin embargo, se apreciará que el efecto de la delección es reducir la longitud de la secuencia de LCDR3, y que en principio podría considerarse que la delección se hace en cualquiera de los restos 89 a 97, por ejemplo cualquiera de los restos 92 a 97.

En HCDR3, el sistema de numeración de Kabat admite la variabilidad en la longitud de CDR por extensión del sistema de numeración entre los restos de Kabat 100 y 101, por ejemplo que incluye el resto 100A para una HCDR3 de 9 restos, más 100B para una HCDR3 de 10 restos, más 100C para una HCDR3 de 11 restos, más 100D para una HCDR3 de 12 restos, según sea apropiado. En la Tabla 7, la inserción de un aminoácido adicional en HCDR3 de algunos de los clones optimizados con respecto a HCDR3 de origen se muestra en el resto de Kabat 100D. Sin embargo, se apreciará que en principio puede considerarse que esta inserción se hace en cualquiera de los restos de Kabat 100 a 102.

Como se demuestra en el presente documento, pueden estar presentes una o más inserciones o delecciones en una o más CDR de un miembro de unión, por ejemplo una HCDR3 y/o LCDR3. Por ejemplo, un miembro de unión de la invención puede comprender un conjunto de CDR de cualquiera de los Anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23, o una variante de los mismos, como se describe en el presente documento, en el que cada CDR tiene opcionalmente una inserción para aumentar la longitud de la CDR por un resto o tiene una delección de un resto para reducir la longitud de la CDR por un resto. Pueden hacerse inserciones y/o delecciones en HCDR y/o una LCDR, por ejemplo en una HCDR3 y/o en una LCDR3.

Por ejemplo, un miembro de unión puede comprender, por ejemplo, un conjunto de CDR que tienen 20 o menos sustituciones de aminoácidos en un conjunto de CDR en el que:

HCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3;
 HCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4;
 HCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 115;
 LCDR1 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8;
 LCDR2 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 9; y
 LCDR3 tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 120;

en el que el miembro de unión tiene opcionalmente una inserción de un resto para aumentar la longitud de la HCDR3 o una delección de un resto para reducir la longitud de la HCDR3, y/o tiene una inserción de un resto para aumentar la longitud de la LCDR3 o una delección de un resto para reducir la longitud de LCDR3.

Un miembro de unión descrito en el presente documento puede tener una inserción de un resto en HCDR3 de SEQ ID NO: 115 y/o una inserción de un resto en LCDR3 de SEQ ID NO: 120.

Pueden hacerse inserciones o delecciones en cualquier punto en las CDR. Por ejemplo, en HCDR3, las inserciones o delecciones pueden ser de cualquiera de los restos de Kabat 95-102, por ejemplo cualquiera de los restos de Kabat 100-102. Por ejemplo, en LCDR3, las inserciones o delecciones pueden ser de cualquiera de los restos de Kabat 89 a 97, por ejemplo cualquiera de los restos de Kabat 92 a 97.

Un miembro de unión o dominio VH descrito en el presente documento puede comprender una HCDR1 en la que el resto de Kabat 35 es Ile, Thr o Val.

Un miembro de unión o dominio VH descrito en el presente documento puede comprender una HCDR2 en la que el resto de Kabat 64 es Lys o Arg.

Un miembro de unión o dominio VH descrito en el presente documento puede comprender una HCDR3 en la que el resto de Kabat 95 es Trp y/o el resto de Kabat 101 es Asp.

Un miembro de unión o dominio VH descrito en el presente documento puede comprender una HCDR3, en la que:

ES 2 618 550 T3

el resto de Kabat 96 es Ala o Glu;
el resto de Kabat 97 es Asp, Glu o Asn;
el resto de Kabat 98 es Asp, Gly, Glu o His;
el resto de Kabat 99 es His, Gly o Thr;
5 el resto de Kabat 100 es Pro, Tyr, Asn, Arg, Trp o Ala;
el resto de Kabat 100A es Pro, Tyr, Ala, Arg, Thr, Gly, Asn, Pro o Ser;
el resto de Kabat 100B es Trp, Tyr, His, Gln, Pro o Thr;
el resto de Kabat 100C es Ile, Ala, Val, His, Tyr o Leu; y
el resto de Kabat 102 es Leu, Val, His, Met o Ile.

10 Un miembro de unión o dominio VL descrito en el presente documento puede comprender una LCDR1 en la que el resto de Kabat 34 es Ala o Thr.

15 Un miembro de unión o dominio VL descrito en el presente documento puede comprender una LCDR3 en la que:

el resto de Kabat 89 es Gln, Met o Ala;
el resto de Kabat 90 es Gln, Asn, Ser o Ala;
el resto de Kabat 91 es Ser, Asn, Gly, Ala o His;
20 el resto de Kabat 92 es Trp, Tyr, Ser, Lys o Phe;
el resto de Kabat 93 es Leu, Ser, Lys, Arg o Ala;
el resto de Kabat 94 es Gly, Thr, Ala o Pro;
el resto de Kabat 96 es Gly o Trp; y
el resto de Kabat 97 es Ser o Thr.

25 En el presente documento se describen miembros de unión que comprenden una HCDR1, HCDR2 y/o HCDR3 del anticuerpo de origen o cualquiera de los anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23, y/o una LCDR1, LCDR2 y/o LCDR3 del anticuerpo de origen o cualquiera de los anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23, por ejemplo, un conjunto de CDR del anticuerpo de origen o cualquiera de los anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23 mostrados en la Tabla 7.

30 Por ejemplo, un miembro de unión descrito en el presente documento puede comprender un conjunto de CDR: HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 y LCDR3, en el que: HCDR1 es SEQ ID NO: 113; HCDR2 es SEQ ID NO: 114; HCDR3 es SEQ ID NO: 115; LCDR1 es SEQ ID NO: 118; LCDR2 es SEQ ID NO: 119; y LCDR3 es SEQ ID NO: 120, representando las CDR del Anticuerpo 18.

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

40 También se describen en el presente documento un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR de los anticuerpos de origen o cualquiera de los anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23, y/o un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR de los anticuerpos de origen o cualquiera de los anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23.

45 Normalmente, un dominio VH se empareja con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión al antígeno del anticuerpo, aunque como se ha tratado adicionalmente más adelante puede usarse un dominio VH o VL solo para unirse al antígeno. El dominio VH del anticuerpo 2 puede emparejarse con el dominio VL del anticuerpo 2, de manera que se forma un sitio de unión al antígeno de anticuerpo que comprende tanto los dominios VH como VL del anticuerpo 2. Se proporcionan realizaciones análogas para los otros dominios VH y VL desvelados en el presente documento. En otros aspectos, VH del anticuerpo 2 se empareja con un dominio VL distinto de VL del anticuerpo. La promiscuidad de la cadena ligera está bien establecida en la materia. Otra vez, se proporcionan aspectos análogos por la invención para los otros dominios VH y VL desvelados en el presente documento.

50 Así, VH de los anticuerpos de origen o de cualquiera de los anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23 puede emparejarse con VL de los anticuerpos de origen o de cualquiera de los anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23.

55 Un miembro de unión puede comprender una molécula de anticuerpo que tiene una o más CDR, por ejemplo, un conjunto de CDR, dentro de una región estructural de anticuerpo. Por ejemplo, pueden injertarse una o más CDR o un conjunto de CDR de un anticuerpo en una región estructural (por ejemplo, región estructural humana) para proporcionar una molécula de anticuerpo. Las regiones estructurales pueden ser de secuencias de segmentos de genes de línea germinal humana. Así, la región estructural puede estar formada en línea germinal, por lo que uno o más restos dentro de la región estructural se cambian para coincidir con los restos en la posición equivalente en la región estructural más similar de la línea germinal humana. El experto pueden seleccionar un segmento de línea germinal que es el más próximo en secuencia a la secuencia de la región estructural del anticuerpo antes de la formación en la línea germinal y probar la afinidad o actividad de los anticuerpos para confirmar que la formación en la línea germinal no reduce significativamente la unión al antígeno o potencia en los ensayos descritos en el

presente documento. Las secuencias de segmentos de genes de línea germinal son conocidas para aquellos expertos en la materia y puede accederse a ellas, por ejemplo, de la compilación VBase.

5 Un miembro de unión descrito en el presente documento puede ser una molécula de anticuerpo humano aislado que tiene un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR en una región estructural de la línea germinal humana, por ejemplo Vh3_DP_86_(3-66). Así, las regiones estructurales del dominio VH FR1, FR2 y/o FR3 pueden comprender regiones estructurales del segmento de genes de línea germinal humana Vh3_DP-86_(3-66) y/o pueden formarse en la línea germinal mutando restos de la región estructural para coincidir con los restos de la región estructural de este segmento de genes de línea germinal humana. FR4 puede comprender una región estructural de
10 segmento JH2 de línea germinal humana j. La secuencia de aminoácidos de FR1 de VH puede ser SEQ ID NO: 167. La secuencia de aminoácidos de FR2 de VH puede ser SEQ ID NO: 168. La secuencia de aminoácidos de FR3 de VH puede ser SEQ ID NO: 169. La secuencia de aminoácidos de FR4 de VH puede ser SEQ ID NO: 170.

15 Normalmente, el miembro de unión también tiene un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR, por ejemplo en una región estructural de la línea germinal humana, por ejemplo Vk1_L12. Así, las regiones estructurales del dominio VL pueden comprender regiones estructurales FR1, FR2 y/o FR3 de segmento de genes de línea germinal humana Vk1_L12 y/o pueden formarse en la línea germinal mutando restos de la región estructural para coincidir con los restos de la región estructural de este segmento de gen de línea germinal humana. FR4 puede comprender una región estructural de segmento JK2 de línea germinal humana j. La secuencia de aminoácidos de FR1 de VL
20 puede ser SEQ ID NO: 171. La secuencia de aminoácidos de FR2 de VL puede ser SEQ ID NO: 172. La secuencia de aminoácidos de FR3 de VL puede ser SEQ ID NO: 173. La secuencia de aminoácidos de FR4 de VL puede ser SEQ ID NO: 174.

25 Un dominio VL formado en la línea germinal puede o puede no formarse en la línea germinal en el resto o restos de Vernier, pero normalmente no está.

Una molécula de anticuerpo o un dominio VH descrito en el presente documento puede comprender el siguiente conjunto de regiones estructurales de la cadena pesada:

30 FR1 SEQ ID NO: 167;
FR2 SEQ ID NO: 168;
FR3 SEQ ID NO: 169;
FR4 SEQ ID NO: 170;

35 o puede comprender dicho conjunto de regiones estructurales de la cadena pesada con uno, dos, tres, cuatro o cinco alteraciones de aminoácido, por ejemplo, sustituciones.

Una molécula de anticuerpo o un dominio VL descrito en el presente documento puede comprender el siguiente conjunto de regiones estructurales de la cadena ligera:

40 FR1 SEQ ID NO: 171;
FR2 SEQ ID NO: 172;
FR3 SEQ ID NO: 173;
FR4 SEQ ID NO: 174;

45 o puede comprender dicho conjunto de regiones estructurales de la cadena ligera con una, dos, tres, cuatro o cinco alteraciones de aminoácido, por ejemplo sustituciones.

Una alteración de aminoácido puede ser una sustitución, una inserción o una deleción.

50 Por ejemplo, una molécula de anticuerpo descrita en el presente documento puede comprender un conjunto de regiones estructurales de la cadena pesada y ligera, en el que

55 FR1 de cadena pesada es SEQ ID NO: 167;
FR2 de cadena pesada es SEQ ID NO: 168;
FR3 de cadena pesada es SEQ ID NO: 169;
FR4 de cadena pesada es SEQ ID NO: 170;
FR1 de cadena ligera es SEQ ID NO: 171;
FR2 de cadena ligera es SEQ ID NO: 172;
60 FR3 de cadena ligera es SEQ ID NO: 173;
FR4 de cadena ligera es SEQ ID NO: 174;

o puede comprender dicho conjunto de regiones estructurales de la cadena pesada y ligera con 10 o menos, por ejemplo cinco o menos, alteraciones de aminoácido, por ejemplo sustituciones. Por ejemplo, puede haber una o dos
65 sustituciones de aminoácido en dicho conjunto de regiones estructurales de la cadena pesada y ligera.

Una molécula de anticuerpo no formada en la línea germinal tiene las mismas CDR, pero diferentes regiones estructurales, en comparación con una molécula de anticuerpo formada en la línea germinal. De las secuencias de anticuerpo mostradas en el presente documento en el listado de secuencias adjunto, las secuencias de anticuerpo N.º 7, 10, 17 y 18 están formadas en la línea germinal. Los anticuerpo formados en la línea germinal 2 a 5, 8, 14, 16, 19 y 21 a 23 pueden producirse por regiones estructurales formadas en la línea germinal de las secuencias de dominios VH y VL mostradas en el presente documento para estos anticuerpos.

El codón 3' cgt, y resto de arginina correspondiente, mostrado en las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para los dominios VL kappa de los Anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23, respectivamente, se incluyeron en las secuencias de scFv y IgG expresadas de estos anticuerpos. El resto de arginina del extremo C de las secuencias se corresponde con el resto de Kabat 108. El origen de este resto y su triplete codificante se explica más adelante.

Para expresar la cadena ligera de la IgG, se proporcionó una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena ligera de anticuerpo, que comprende un primer exón que codifica el dominio VL, un segundo exón que codifica el dominio CL, y un intrón que separa el primer exón y el segundo exón. Bajo circunstancias normales, el intrón se empalma por procesamiento de ARNm celular, uniéndose el extremo 3' del primer exón con el extremo 5' del segundo exón. Así, cuando el ADN que tiene dicha secuencia de nucleótidos se expresó como ARN, el primer y segundo exones se empalmaron juntos. La traducción del ARN empalmado produce un polipéptido que comprende el dominio VL y el dominio CL.

La elección de dominio constante es significativa porque para cadenas ligeras kappa el aminoácido de puente es arginina, formado por el codón cga, donde la primera citosina está codificada en el exón 1 y la guanina y adenina están codificadas en el exón 2.

Después del empalme, para los Anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23, la Arg en el resto de Kabat 108 está codificada por la última base (c) de la secuencia de la región estructural 4 del dominio VL y las dos primeras bases (gt) del dominio CL.

El resto de arginina en el resto de Kabat 108 puede considerarse que es el resto del extremo C del dominio VL de la molécula de anticuerpo.

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

La competición entre los miembros de unión puede ensayarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo usando ELISA y/o marcando una molécula indicadora específica para un miembro de unión que puede detectarse en presencia de uno o varios de otros miembros de unión sin marcar, para permitir la identificación de miembros de unión que se unen al mismo epítipo o un epítipo solapante. Tales métodos son fácilmente conocidos para un experto habitual en la materia, y se describen en más detalle en el presente documento (véase la descripción detallada, y los ensayos de competición por epítipo en la sección Materiales y métodos de los ejemplos.) Así, otro aspecto descrito en el presente documento proporciona un miembro de unión que comprende un sitio de unión de anticuerpo humano al antígeno que compite con una molécula de anticuerpo, por ejemplo una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH y/o VL, CDR por ejemplo HCDR3 o conjunto de CDR del anticuerpo de origen o cualquiera de los anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23, para la unión a IL-6.

Aspectos adicionales descritos en el presente documento proporcionan un ácido nucleico aislado que comprende una secuencia que codifica un miembro de unión, dominio VH y/o dominio VL descrito en el presente documento, y métodos de preparación de un miembro de unión, un dominio VH y/o un dominio VL de la invención, que comprenden expresar dicho ácido nucleico en condiciones para provocar la producción de dicho miembro de unión, dominio VH y/o dominio VL, y recuperarlo.

Otro aspecto descrito en el presente documento proporciona ácido nucleico, generalmente aislado, que codifica una secuencia de CDR de VH o CDR de VL desvelada en el presente documento.

Otro aspecto proporciona una célula huésped que contiene o transformada con ácido nucleico descrito en el presente documento.

Aspectos adicionales descritos en el presente documento proporcionan composiciones que contienen miembros de unión descritos en el presente documento, y su uso en métodos de unión, inhibición y/o neutralización de IL-6, que incluyen métodos de tratamiento del cuerpo humano o animal por terapia.

Los miembros de unión descritos en el presente documento pueden usarse en un método de tratamiento o diagnóstico, tal como un método de tratamiento (que puede incluir tratamiento profiláctico) de una enfermedad o trastorno en el cuerpo humano o animal (por ejemplo, en un paciente humano), que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de un miembro de unión descrito en el presente documento. Condiciones tratables

usando los miembros de unión descritos en el presente documento incluyen cualquiera en la que IL-6 desempeñe una función, como se trata en detalle en cualquier parte en el presente documento.

Estos y otros aspectos de la invención se describen en más detalle a continuación.

5

Terminología

Es conveniente señalar aquí que "y/o", donde se use en el presente documento, es para ser considerado como divulgación específica de cada una de las dos características especificadas o componentes con o sin el otro. Por ejemplo "A y/o B" debe considerarse como divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, justamente como si cada uno se expusiera individualmente en el presente documento.

10

IL-6 y receptor de IL-6

15 IL-6 es interleucina 6. IL-6 también puede denominarse en el presente documento "el antígeno".

La secuencia de aminoácidos de longitud completa de IL-6 humana es SEQ ID NO: 161. Esta secuencia se escinde *in vivo* para eliminar un péptido conductor del extremo N, para producir IL-6 madura. La IL-6 humana madura tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 165. La secuencia madura representa la IL-6 circulante *in vivo*, que es el antígeno diana para aplicaciones terapéuticas y de diagnóstico *in vivo* como se describe en el presente documento. Por consiguiente, la IL-6 referida en el presente documento es normalmente IL-6 humana madura, a menos que se indique lo contrario por el contexto.

20

IL-6 puede conjugarse con una marca detectable, tal como HIS FLAG, por ejemplo para su uso en ensayos como se describen en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse una proteína de fusión que comprende IL-6 conjugada con una secuencia de HIS FLAG. Una secuencia de IL-6 humana marcada con HIS FLAG es SEQ ID NO: 162.

25

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

30

El receptor de IL-6 referido en el presente documento es normalmente el receptor de IL-6 humana, a menos que se indique lo contrario. Una secuencia de aminoácidos de IL-6Ra humana soluble (sIL-6Ra, sIL-6R) es SEQ ID NO: 163. Una secuencia de aminoácidos de IL-6Ra transmembranario humano es SEQ ID NO: 164.

35

IL-6 se une a IL-6Ra para formar un complejo, IL-6:IL-6Ra. El complejo puede ser tanto soluble (con sIL-6Ra) como unido a membrana (con IL-6Ra transmembranario). Cuando IL-6Ra es la forma soluble, el complejo se designa IL-6:sIL-6Ra. Referencias a IL-6:IL-6Ra pueden incluir IL-6 complejada con IL-6Ra transmembranario o con IL-6Ra soluble, a menos que se indique lo contrario por el contexto.

40

gp130

gp130 es un receptor para el complejo IL-6:IL-6Ra. La clonación y caracterización de gp130 se informa en Hibi et al, Cell 63:1149-1157 (1990). Una secuencia de gp130 humano se explica en SEQ ID NO: 166.

45

Miembro de unión

Éste describe un miembro de un par de moléculas que se unen entre sí. Los miembros de un par de unión pueden derivarse naturalmente o producirse completa o parcialmente sintéticamente. Un miembro del par de moléculas tiene un área sobre su superficie, o una cavidad, que se une a y es, por tanto, complementaria a una organización espacial y polar particular del otro miembro del par de moléculas. Ejemplos de tipos de pares de unión son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, receptor de hormona-hormona, receptor-ligando, enzima-sustrato. La presente invención se refiere a reacciones tipo antígeno-anticuerpo.

50

Un miembro de unión normalmente comprende una molécula que tiene un sitio de unión al antígeno. Por ejemplo, un miembro de unión puede ser una molécula de anticuerpo o una proteína no de anticuerpo que comprende un sitio de unión al antígeno. En la presente invención, el miembro de unión es una molécula de anticuerpo.

55

Puede proporcionarse un sitio de unión al antígeno por medio de reordenamiento de CDR en armazones de proteína no de anticuerpo, tales como fibronectina o citocromo B, etc. [42, 43, 44], o aleatorizando o mutando restos de aminoácido de un bucle dentro de un armazón de proteína para conferir especificidad de unión por una diana deseada. Se han revisado los armazones para manipular novedosos sitios de unión en proteínas en detalle por Nygren et al. [44]. Los armazones de proteína para miméticos de anticuerpo se desvelan en el documento WO/0034784, en el que los inventores describen proteínas (miméticos de anticuerpo) que incluyen un dominio tipo III de fibronectina que tiene al menos un bucle aleatorizado. Puede proporcionarse un armazón adecuado en el que injertar una o más CDR, por ejemplo un conjunto de HCDR, por cualquier miembro de dominio de la superfamilia de

60

65

genes de inmunoglobulina. El armazón puede ser una proteína humana o no humana. Una ventaja de un armazón de proteína no de anticuerpo es que puede proporcionar un sitio de unión al antígeno en una molécula de armazón que es más pequeña y/o más fácil de fabricar que al menos algunas moléculas de anticuerpo. El pequeño tamaño de un miembro de unión puede conferir propiedades fisiológicas útiles, tales como una capacidad de entrar en las células, penetrar profundo en tejidos o llegar a dianas dentro de otras estructuras, o de unirse dentro de cavidades de proteína del antígeno diana. El uso de sitios de unión al antígeno en armazones de proteína no de anticuerpo se revisa en Wess, 2004 [45]. Son típicas proteínas que tienen un esqueleto estable y uno o más bucles variables, en las que la secuencia de aminoácidos del bucle o bucles está específicamente o aleatoriamente mutada para crear un sitio de unión al antígeno que se une al antígeno diana. Tales proteínas incluyen los dominios de unión a IgG de proteína A de *S. aureus*, transferrina, tetranectina, fibronectina (por ejemplo, 10^o dominio tipo III de fibronectina), lipocalinas, además de gamma-cristalina y otros armazones de Affilin™ (Scil Proteins). Ejemplos de otros enfoques incluyen "microcuerpos" sintéticos basados en ciclotidos - proteínas pequeñas que tienen enlaces disulfuro intramoleculares, microproteínas (Versabodies™, Amunix) y proteínas de repetición de ankirina (DARPin, Molecular Partners).

Además de las secuencias de anticuerpo y/o un sitio de unión al antígeno, un miembro de unión descrito en el presente documento puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo que forman un péptido o polipéptido, tales como un dominio plegado, o para conferir a la molécula otra característica funcional, además de capacidad de unirse al antígeno. Los miembros de unión descritos en el presente documento pueden llevar una marca detectable, o pueden conjugarse con una toxina o un resto de direccionamiento o enzima (por ejemplo, mediante un enlace o conector de peptidilo). Por ejemplo, un miembro de unión puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio enzimático), además de un sitio de unión al antígeno, en el que el sitio de unión al antígeno se une al antígeno y así dirige el sitio catalítico al antígeno. El sitio catalítico puede inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo por escisión.

Aunque, como se indica, las CDR pueden ser llevadas por armazones no de anticuerpo, la estructura para llevar una CDR o un conjunto de CDR descrito en el presente documento generalmente será una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o porción sustancial de la misma en la que la CDR o conjunto de CDR está localizada en una localización correspondiente a las CDR o conjunto de CDR de dominios variables de anticuerpos VH y VL que existen de forma natural codificados por genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y localizaciones de dominio variable de inmunoglobulinas pueden determinarse por referencia a Kabat, et al., 1987 [46], y actualizaciones del mismo. Están disponibles varios recursos en línea académicos y comerciales para buscar en esta base de datos. Por ejemplo, véase la ref. [47] y el recurso en línea asociado, actualmente en la dirección web de <http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>.

Por región CDR o CDR, está previsto indicar las regiones hipervariables de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina como se define por Kabat *et al.* 1991 [48], y ediciones posteriores. Un anticuerpo normalmente contiene 3 CDR de cadena pesada y 3 CDR de cadena ligera. El término CDR se usa aquí con el fin de indicar, según el caso, una de estas regiones o varias, o incluso la totalidad de estas regiones que contienen la mayoría de los restos de aminoácido responsables de la unión por afinidad del anticuerpo por el antígeno o el epítope que reconoce.

Entre las seis secuencias de CDR cortas, la tercera CDR de la cadena pesada (HCDR3) tiene una mayor variabilidad de tamaño (mayor diversidad esencialmente debido a los mecanismos de reordenamiento de los genes que dan lugar a ella). Puede ser tan corta como 2 aminoácidos, aunque el tamaño más largo es 26. La longitud de CDR también puede variar según la longitud que puede ser acomodada por la región estructural subyacente particular. Funcionalmente, la HCDR3 desempeña una función en parte en la determinación de la especificidad del anticuerpo [refs. 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56].

HCDR1 puede tener 5 aminoácidos de longitud, que consiste en los restos de Kabat 31-35.

HCDR2 puede tener 17 aminoácidos de longitud, que consiste en los restos de Kabat 50-65.

HCDR3 puede tener 11 o 12 aminoácidos de longitud, que consiste en los restos de Kabat 95-102, opcionalmente que incluye el resto de Kabat 100D.

LCDR1 puede tener 11 aminoácidos de longitud, que consiste en los restos de Kabat 24-34.

LCDR2 puede tener 7 aminoácidos de longitud, que consiste en los restos de Kabat 50-56.

LCDR3 puede tener 8 o 9 aminoácidos de longitud, que consiste en los restos de Kabat 89-97, opcionalmente que incluye resto de Kabat 95.

Molécula de anticuerpo

Ésta describe una inmunoglobulina tanto natural como producida parcialmente o completamente sintéticamente. El término también cubre cualquier polipéptido o proteína que comprende un sitio de unión al antígeno de anticuerpo. Debe entenderse aquí que la invención no se refiere a los anticuerpos en forma natural, es decir, que no están en su entorno natural, sino que han sido capaces de aislarse u obtenerse por purificación de fuentes naturales, o incluso obtenidos por recombinación genética, o por síntesis química, y que pueden entonces contener aminoácidos no naturales como se describirá después. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión al antígeno

de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, moléculas tales como Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb y Fd. Se han manipulado diversas otras moléculas de anticuerpo que incluyen uno o más sitios de unión al antígeno de anticuerpo, que incluyen, por ejemplo, Fab2, Fab3, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos y minicuerpos. Se describen moléculas de anticuerpo y métodos para su construcción y uso en [57].

5 Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que se unen al antígeno diana. Tales técnicas pueden implicar introducir ADN que codifica la región variable de inmunoglobulina, o las CDR, de un anticuerpo en las regiones constantes, o regiones constantes más regiones estructurales, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por
10 ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400, y un conjunto importante de bibliografía posterior. Un hibridoma u otra célula que produce un anticuerpo puede someterse a mutación genética u otros cambios, que pueden o pueden no alterar la especificidad de unión de anticuerpos producidos.

15 Como los anticuerpos pueden modificarse de varias formas, el término "molécula de anticuerpo" debe interpretarse como que cubre cualquier miembro de unión o sustancia que tiene un sitio de unión al antígeno de anticuerpo con la especificidad requerida y/o unión al antígeno. Así, este término cubre fragmentos y derivados de anticuerpo, que incluyen cualquier polipéptido que comprende un sitio de unión al antígeno de anticuerpo, tanto natural como completamente o parcialmente sintético. Por tanto, se incluyen moléculas quiméricas que comprenden un sitio de
20 unión al antígeno de anticuerpo, o equivalente, fusionadas con otro polipéptido (por ejemplo, derivadas de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo). La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describen en los documentos EPA-0120694 y EP-A-0125023, y un conjunto importante de bibliografía posterior.

Técnicas adicionales disponibles en la materia de la manipulación de anticuerpos han hecho posible aislar
25 anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, pueden prepararse hibridomas humanos como se describe por Kontermann & Dubel [58]. La presentación en fagos, otra técnica establecida para generar miembros de unión, se ha descrito en detalle en muchas publicaciones, tales como Kontermann & Dubel [58] y el documento WO92/01047 (tratado además más adelante), y patentes de EE.UU. US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650,
30 US6492160, US6521404.

Pueden usarse ratones transgénicos, en los que los genes de anticuerpo de ratón están inactivados y se sustituyen funcionalmente con genes de anticuerpo humano mientras que dejan intactos otros componentes del sistema inmunitario del ratón, para aislar anticuerpos humanos [59]. Pueden producirse anticuerpos humanizados usando
35 técnicas conocidas en la materia, tales como las desveladas en, por ejemplo, los documentos WO91/09967, US 5,585,089, EP592106, US 565,332 y WO93/17105. Además, el documento WO2004/006955 describe métodos de humanización de anticuerpos, basados en seleccionar secuencias de la región estructural de la región variable de genes de anticuerpo humano comparando tipos de estructura de CDR canónicas para secuencias de CDR de la región variable de un anticuerpo no humano con tipo de estructura de CDR canónica para CDR correspondientes de
40 una biblioteca de secuencias de anticuerpo humano, por ejemplo segmentos de genes de anticuerpo de línea germinal. Regiones variables de anticuerpo humano que tienen tipos de estructura de CDR canónica similar para las CDR no humanas forman un subconjunto de secuencias de anticuerpo humano de miembros del que seleccionar secuencias de la región estructural humana. Los miembros del subconjunto pueden clasificarse además por similitud de aminoácidos entre las secuencias de CDR humanas y no humanas. En el método del documento
45 WO2004/006955, las primeras posiciones de las secuencias humanas están seleccionadas para proporcionar las secuencias de la región estructural para construir un anticuerpo quimérico que sustituye funcionalmente secuencias de CDR humanas con los homólogos de CDR no humanos usando las regiones estructurales humanas de miembros del subconjunto seleccionadas, proporcionándose así un anticuerpo humanizado de alta afinidad y baja inmunogenicidad sin necesidad de comparar secuencias de la región estructural entre los anticuerpos no humanos y
50 humanos. También se desvelan anticuerpos quiméricos hechos según el método.

Pueden crearse moléculas sintéticas de anticuerpo por expresión de genes generados por medio de oligonucleótidos sintetizados y ensamblados dentro de vectores de expresión adecuados, por ejemplo como se describe por Knappik
55 *et al.* [60] o Krebs *et al.* [61].

Se ha mostrado que fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de antígenos de unión. Ejemplos de fragmentos de unión son (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un único anticuerpo; (iv) el fragmento dAb [62, 63, 64], que consiste en un dominio VH o VL; (v) regiones CDR
60 aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii); moléculas Fv monocatenarias (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL están unidos por un conector peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión al antígeno [65, 66]; (viii) dímeros Fv monocatenarios biespecíficos (documento PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica (documento WO94/13804; [67]). Pueden estabilizarse moléculas de
65 Fv, scFv o diacuerpo por la incorporación de puentes de disulfuro que unen los dominios VH y VL [68]. También pueden prepararse minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 [69]. Otros ejemplos de

fragmentos de unión son Fab', que se diferencian de los fragmentos Fab por la adición de algunos restos en el extremo carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada, que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo, y Fab'-SH, que es un fragmento Fab' en el que el (los) resto(s) de cisteína de los dominios constantes poseen un grupo tiol libre.

5 Qui *et al.* [70] describieron moléculas de anticuerpo que solo contenían dos CDR unidas por una región estructural. CDR3 del dominio VH o VL se unió al bucle de CDR1 o CDR2 del otro dominio. El enlace fue mediante el extremo C de la CDR1 o CDR2 seleccionada al extremo N de CDR3, mediante una región FR. Qui *et al.* seleccionaron la región FR que tiene el menor número de parches hidrófobos. Se encontró que la principal combinación para el anticuerpo probado era CDR1 de VL unida por FR2 de VH a CDR3 de VH (VHCDR1-VHFR2-VLCDR3). A un peso molecular de aproximadamente 3 kDa, estas moléculas de anticuerpo ofrecen ventajas en términos de penetración de tejido mejorada en comparación con inmunoglobulinas completas (aprox. 150 kDa) o scFv (aprox. 28 kDa).

15 Los fragmentos de anticuerpo descritos en el presente documento pueden obtenerse a partir de una molécula de anticuerpo de origen o cualquiera de las moléculas de anticuerpo 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23, por métodos tales como digestión por enzimas, por ejemplo pepsina o papaína y/o por escisión de los puentes disulfuro por reducción química. En otro modo, los fragmentos de anticuerpo descritos en el presente documento pueden obtenerse por técnicas de recombinación genética, asimismo bien conocidas para el experto en la materia o incluso por síntesis de péptidos por medio de, por ejemplo, sintetizadores de péptidos automáticos, tales como aquellos suministrados por la empresa Applied Biosystems, etc., o por síntesis y expresión de ácidos nucleicos.

20 Fragmentos de anticuerpo funcionales descritos en el presente documento incluyen cualquier fragmento funcional cuya semivida aumenta por una modificación química, especialmente por PEGilación, o por incorporación en un liposoma.

25 Un dAb (anticuerpo de dominio) es un fragmento de unión a antígeno monomérico pequeño de un anticuerpo, concretamente la región variable de una cadena pesada o ligera de anticuerpo [64]. dAb de VH se producen naturalmente en camélidos (por ejemplo, camello, llama) y pueden producirse inmunizando un camélido con un antígeno diana, aislando linfocitos B específicos de antígeno y clonando directamente genes dAb de linfocitos B individuales. Los dAb también son producibles en cultivo celular. Su pequeño tamaño, buena solubilidad y estabilidad a la temperatura los hace particularmente fisiológicamente útiles y adecuados para la selección y maduración por afinidad. Están siendo desarrollados dAb de VH de camélido para uso terapéutico con el nombre "Nanobodies™". Un miembro de unión descrito en el presente documento puede ser un dAb que comprende un dominio VH o VL sustancialmente como se explica en el presente documento, o un dominio VH o VL que comprende un conjunto de CDR sustancialmente como se explica en el presente documento.

40 Los anticuerpos biespecíficos o bifuncionales forman una segunda generación de anticuerpos monoclonales en la que se combinan dos regiones variables diferentes en la misma molécula [71]. Su uso se ha demostrado tanto en el campo del diagnóstico como en el campo de la terapia a partir de su capacidad para reclutar algunas funciones efectoras o para dirigir varias moléculas sobre la superficie de células tumorales. Si van a usarse anticuerpos biespecíficos, éstos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que pueden fabricarse en una variedad de formas [72], por ejemplo prepararse químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpos biespecíficos mencionados anteriormente. Estos anticuerpos pueden obtenerse por métodos químicos [73, 74] o métodos somáticos [75, 76], pero asimismo y preferencialmente por técnicas de ingeniería genética que permiten que se fuerce la heterodimerización y así facilitar el proceso de purificación del anticuerpo buscado [77]. Ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen aquellos de la tecnología BiTE™ en la que pueden usarse los dominios de unión de dos anticuerpos con diferente especificidad y unirse directamente mediante péptidos flexibles cortos. Esto combina dos anticuerpos en una cadena de polipéptidos única corta. Pueden construirse diacuerpos y scFv sin una región Fc, usando solo dominios variables, reduciendo posiblemente los efectos de la reacción anti-idiotípica.

50 Pueden construirse anticuerpos biespecíficos como IgG enteras, como Fab'2 biespecífico, como Fab'PEG, como diacuerpos o incluso como scFv biespecífico. Además, pueden unirse dos anticuerpos biespecíficos usando métodos rutinarios conocidos en la materia para formar anticuerpos tetravalentes. También pueden ser particularmente útiles diacuerpos biespecíficos, a diferencia de anticuerpos completos biespecíficos, debido a que pueden ser fácilmente construidos y expresados en *E. coli*. Pueden seleccionarse fácilmente diacuerpos (y muchos otros polipéptidos, tales como fragmentos de anticuerpo) de especificidades de unión apropiadas usando presentación en fagos (documento WO94/13804) de bibliotecas. Si un brazo del diacuerpo va a mantenerse constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra IL-6, entonces puede prepararse una biblioteca donde el otro brazo se varía y se selecciona un anticuerpo de especificidad apropiada. Pueden prepararse anticuerpos completos biespecíficos por métodos de ingeniería alternativos como se describe en Ridgeway et al., 1996 [78].

65 Están disponibles en la materia diversos métodos para obtener anticuerpos contra IL-6. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, especialmente de origen humano, murino, quimérico o humanizado, que pueden obtenerse según los métodos convencionales bien conocidos para el experto en la materia.

En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, especialmente de origen murino, es posible referirse a técnicas que se describen en particular en el manual "Antibodies" [79] o a la técnica de preparación de hibridomas como se describe por Köhler y Milstein [80].

- 5 Pueden obtenerse anticuerpos monoclonales, por ejemplo, a partir de los linfocitos B de un animal inmunizado contra IL-6, o uno de sus fragmentos que contienen el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales. Fragmentos y péptidos o polipéptidos adecuados que los comprenden se describen en el presente documento, y pueden usarse para inmunizar animales para generar anticuerpos contra IL-6. Dicha IL-6, o uno de sus fragmentos, puede producirse especialmente según los métodos de trabajo usuales, por recombinación genética a partir de una
- 10 secuencia de ácidos nucleicos contenida en la secuencia de ADNc que codifica IL-6 o fragmento de la misma, por síntesis de péptidos a partir de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia de péptidos de la IL-6 y/o fragmento de la misma.

- 15 Los anticuerpos monoclonales pueden, por ejemplo, purificarse en una columna de afinidad sobre la que la IL-6 o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales, ha sido previamente inmovilizada. Más particularmente, los anticuerpos monoclonales pueden purificarse por cromatografía sobre proteína A y/o G, seguido o no seguido de cromatografía de intercambio iónico que tiene como objetivo eliminar los contaminantes de proteína residual, además del ADN y el LPS, en sí mismo, seguido o no seguido de cromatografía de exclusión sobre gel Sepharose con el fin de eliminar los posibles agregados debido a la presencia
- 20 de dímeros o de otros multímeros. En una realización, la totalidad de estas técnicas puede usarse simultáneamente o sucesivamente.

Sitio de unión al antígeno

- 25 Describe la parte de una molécula que se une a y es complementaria a todo o parte del antígeno diana. En una molécula de anticuerpo se denomina el sitio de unión al antígeno de anticuerpo, y comprende la parte del anticuerpo que se une a y es complementaria a todo o parte del antígeno diana. Si un antígeno es grande, un anticuerpo puede solo unirse a una parte particular del antígeno, parte que se denomina un epítipo. Un sitio de unión a antígeno del anticuerpo puede estar provisto de uno o más dominios variables de anticuerpo. Un sitio de unión a antígeno del anticuerpo puede comprender una región variable de la cadena ligera del anticuerpo (VL) y una región variable de la
- 30 cadena pesada del anticuerpo (VH).

- El documento WO2006/072620 describe la manipulación de sitios de unión al antígeno en bucles estructurales (no CDR) que se extienden entre las hebras beta de dominios de inmunoglobulina. Un sitio de unión a antígeno puede manipularse en una región de una molécula de anticuerpo separada de la localización natural de las CDR, por ejemplo en una región estructural de un dominio VH o VL, o en un dominio constante de anticuerpo, por ejemplo, CH1 y/o CH3. Un sitio de unión al antígeno manipulado en una región estructural puede ser adicional a, o en lugar de, un sitio de unión al antígeno formado por conjuntos de CDR de un dominio VH y VL. Si están presentes múltiples sitios de unión al antígeno en una molécula de anticuerpo, pueden unirse al mismo antígeno (IL-6), aumentando así
- 40 la valencia del miembro de unión. Alternativamente, pueden unirse múltiples sitios de unión al antígeno a diferentes antígenos (IL-6 y uno u otro antígeno), y esto puede usarse para añadir funciones efectoras, prolongar la semivida o mejorar la administración *in vivo* de la molécula de anticuerpo.

Aislado

- 45 Se refiere al estado en el que los miembros de unión descritos en el presente documento, o ácido nucleico que codifica tales miembros de unión, estarán generalmente según la presente divulgación. Así, pueden proporcionarse miembros de unión, dominios VH y/o VL, y que codifican moléculas de ácidos nucleicos y vectores descritos en el presente documento, aislados y/o purificados, por ejemplo de su entorno natural, en forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso de ácido nucleico, libre o sustancialmente libre de ácido nucleico o genes de origen
- 50 distinto de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. Miembros aislados y ácido nucleico aislado estarán libres o sustancialmente libres del material con el que están naturalmente asociados, tales como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural, o el entorno en el que se preparan (por ejemplo, cultivo celular) cuando tal preparación es por tecnología de ADN recombinante puesta en la práctica *in vitro* o *in vivo*. Pueden formularse miembros y ácido nucleico con diluyentes o adyuvantes y todavía aislarse para fines prácticos - por ejemplo, los miembros normalmente se mezclarán con gelatina u otros vehículos si se usan para recubrir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclarán con vehículos o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se usan en diagnóstico o terapia. Los miembros de unión pueden estar glucosilados, tanto naturalmente como por sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NS0 (ECACC 85110503), o pueden estar sin glucosilar (por ejemplo, si se producen por expresión en una
- 60 célula procarionota).

- Preparaciones heterogéneas que comprenden moléculas de anticuerpo anti-IL-6 también forman parte de la invención. Por ejemplo, tales preparaciones pueden ser mezclas de anticuerpos con cadenas pesadas y cadenas pesadas de longitud completa que carecen de lisina del extremo C, con diversos grados de glucosilación y/o con aminoácidos derivatizados, tales como ciclación de un ácido glutámico del extremo N para formar un resto de ácido
- 65

piroglutámico.

Como se usa en el presente documento, la expresión "sustancialmente como se expone" se refiere a que la(s) característica(s) de las CDR relevantes del dominio VH o VL de miembros de unión descritos en el presente documento serán tanto idénticas como altamente similares a las regiones especificadas de las que la secuencia se expone en el presente documento. Como se describe en el presente documento, se contempla que la expresión "altamente similar", con respecto a región (regiones) especificada(s) de uno o más dominios variables, puede hacerse de 1 a aproximadamente 5, por ejemplo de 1 a 4, que incluyen 1 a 3, o 1 o 2, o 3 o 4, sustituciones de aminoácido en el dominio CDR y/o VH o VL.

Breve descripción de la figura

Figura 1. Esta figura muestra el efecto de la administración de un anticuerpo anti-IL-6 (Anticuerpo 18) sobre el aumento de haptoglobina inducida por IL-6 recombinante humana en el ratón *in vivo*.

Descripción detallada de la invención

Como se observa anteriormente, un miembro de unión como se describe en el presente documento modula y puede neutralizar una actividad biológica de IL-6. Como se describe en el presente documento, los miembros de unión a IL-6 descritos en el presente documento pueden optimizarse para neutralizar la potencia. Generalmente, la optimización de potencia implica mutar la secuencia de un miembro de unión seleccionado (normalmente la secuencia del dominio variable de un anticuerpo) para generar una biblioteca de miembros de unión, que entonces se ensayan para potencia y se seleccionan los miembros de unión más potentes. Así, los miembros de unión de "potencia optimizada" seleccionados tienden a tener una potencia más alta que el miembro de unión a partir del cual se generó la biblioteca. Sin embargo, también pueden obtenerse miembros de unión de alta potencia sin optimización, por ejemplo, puede obtenerse un miembro de unión de alta potencia directamente a partir de un cribado inicial, por ejemplo, un ensayo de neutralización bioquímico. Un miembro de unión de "potencia optimizada" se refiere a un miembro de unión con una potencia de neutralización optimizada de una actividad particular o función aguas abajo de IL-6. Los ensayos y potencias se describen en más detalle en cualquier parte en el presente documento. Tanto los miembros de unión de potencia optimizada como no optimizada se describen en el presente documento, además de métodos para la optimización de potencia de un miembro de unión seleccionado. Así, la presente divulgación permite que el experto genere miembros de unión que tienen alta potencia.

Otro aspecto descrito en el presente documento proporciona un método de obtención de uno o más miembros de unión capaces de unirse al antígeno, incluyendo el método poner en contacto una biblioteca de miembros de unión descritos en el presente documento y dicho antígeno, y seleccionar uno o más miembros de unión de la biblioteca capaces de unirse a dicho antígeno.

La biblioteca puede presentarse sobre partículas o complejos moleculares, por ejemplo paquetes genéticos replicables, tales como levadura, partículas bacterianas o de bacteriófago (por ejemplo, T7), virus, células o sistemas de presentación covalentes, ribosómicos u otros *in vitro*, conteniendo cada partícula o complejo molecular ácido nucleico que codifica el dominio variable VH de anticuerpo presentado en él, y opcionalmente también un dominio VL presentado si está presente. La presentación en fagos se describe en el documento WO92/01047 y, por ejemplo, las patentes de EE.UU. US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160 y US6521404.

Tras la selección de miembros de unión capaces de unirse al antígeno y presentarse sobre bacteriófago u otras partículas de biblioteca o complejos moleculares, puede tomarse ácido nucleico de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que presente dicho miembro de unión seleccionado. Tal ácido nucleico puede usarse en la posterior producción de un miembro de unión o un dominio variable VH o VL de anticuerpo por expresión de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico tomada de un bacteriófago u otra partícula o complejo molecular que presente dicho miembro de unión seleccionado.

Un dominio variable VH de anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de un dominio variable VH de anticuerpo de dicho miembro de unión seleccionado puede proporcionarse en forma aislada, como puede un miembro de unión que comprende un dominio VH.

Puede probarse además la capacidad para unir IL-6, también la capacidad para competir con, por ejemplo, una molécula de anticuerpo de origen o una molécula de anticuerpo 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 o 23 (por ejemplo, en formato scFv y/o formato IgG, por ejemplo IgG1) para la unión a IL-6. Puede probarse la capacidad para neutralizar IL-6, como se trata además en cualquier parte en el presente documento.

Un miembro de unión descrito en el presente documento puede unirse a IL-6 con la afinidad de una molécula de anticuerpo de origen u otra, por ejemplo scFv, o uno de los anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23, por ejemplo IgG1, o con una afinidad que es mejor.

Un miembro de unión descrito en el presente documento puede neutralizar una actividad biológica de IL-6 con la potencia de una molécula de anticuerpo de origen u otra, uno de los anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23, por ejemplo, scFv, o IgG1, o con un potencia que es mejor.

5 Pueden compararse la afinidad de unión y la potencia de neutralización de diferentes miembros de unión bajo condiciones apropiadas.

10 Pueden obtenerse variantes de los dominio VH y VL y CDR descritos en el presente documento, que incluyen aquellos para los que las secuencias de aminoácidos se exponen en el presente documento, y que pueden emplearse en miembros de unión descritos en el presente documento, por medio de métodos de alteración o mutación de secuencia y cribado de miembros de unión a antígeno con características deseadas. Ejemplos de características deseadas incluyen, pero no se limitan a:

- 15 • Elevada afinidad de unión por antígeno con respecto a anticuerpos conocidos que son específicos para el antígeno
- Elevada neutralización de una actividad de antígeno con respecto a anticuerpos conocidos que son específicos para el antígeno si la actividad es conocida
- Capacidad competitiva especificada con un anticuerpo o ligando conocido para el antígeno a una relación molar específica
- 20 • Capacidad de inmunoprecipitar el complejo
- Capacidad de unirse a un epítipo especificado
 - Epítipo lineal, por ejemplo secuencia de péptidos identificada usando barrido de unión a péptidos como se describe en el presente documento, por ejemplo usando péptidos cribados en conformación lineal y/o restringida
 - 25 ◦ Epítipo conformacional, formado por restos no continuos
- Capacidad de modular una nueva actividad biológica de IL-6, o molécula aguas abajo.

30 Tales métodos también se proporcionan en el presente documento.

Pueden producirse y usarse variantes de moléculas de anticuerpo desveladas en el presente documento según la presente divulgación. Siguiendo el ejemplo de química computacional en aplicar técnicas de análisis multifactorial de datos a las relaciones estructura/propiedad-actividad [81] pueden derivarse relaciones cuantitativas de actividad-propiedad de anticuerpos usando técnicas matemáticas muy conocidas, tales como regresión estadística, reconocimiento y clasificación de patrones [82, 83, 84, 85, 86, 87]. Las propiedades de anticuerpos pueden derivar de modelos empíricos y teóricos (por ejemplo, análisis de restos de contacto probables o propiedad fisicoquímica calculada) de secuencia de anticuerpos, estructuras funcionales y tridimensionales, y estas propiedades pueden considerarse individualmente y en combinación.

40 Un sitio de unión al antígeno de anticuerpo compuesto de un dominio VH y un dominio VL está normalmente formado por seis bucles de polipéptido: tres del dominio variable de la cadena ligera (VL) y tres del dominio variable de la cadena pesada (VH). El análisis de anticuerpos de estructura atómica conocida tiene relaciones elucidadas entre la secuencia y la estructura tridimensional de los sitios de combinación de anticuerpo [88, 89]. Estas relaciones implican que, excepto por la tercera región (bucle) en dominios VH, los bucles de sitio de unión tienen una de un pequeño número de conformaciones de la cadena principal: estructuras canónicas. Se ha mostrado que la estructura canónica formada en un bucle particular se determina por su tamaño y la presencia de ciertos restos en sitios clave en tanto el bucle como en las regiones estructurales [88, 89].

50 Este estudio de relación secuencia-estructura puede usarse para la predicción de aquellos restos en un anticuerpo de secuencia conocida, pero de una estructura tridimensional desconocida, que son importantes en el mantenimiento de la estructura tridimensional de sus bucles de CDR y, por lo tanto, mantienen la especificidad de unión. Estas predicciones pueden ser respaldadas por comparación de las predicciones con la salida de los experimentos de optimización de ejemplo. En un enfoque estructural, puede crearse un modelo de la molécula de anticuerpo [90] usando cualquier paquete libremente disponible o comercial, tal como WAM [91]. Un paquete de software de visualización y análisis de proteínas, tal como Insight II (Accelrys, Inc.) o Deep View [92] puede entonces usarse para evaluar posibles sustituciones en cada posición en la CDR. Esta información puede entonces usarse para hacer sustituciones que probablemente tienen un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad.

60 Las técnicas requeridas para hacer sustituciones dentro de secuencias de aminoácidos de CDR, dominios VH o VL de anticuerpos y miembros de unión generalmente están disponibles en la materia. Pueden hacerse secuencias de variante, con sustituciones que puede o puede no predecirse que tengan un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad, y probarse para la capacidad para unirse a y/o neutralizar IL-6 y/o para cualquier propiedad deseada.

65 Pueden emplearse las variantes de secuencia de aminoácidos de dominio variable de cualquiera de los dominios VH

y VL cuyas secuencias se han desvelado específicamente en el presente documento según la presente divulgación, como se trata.

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

Otro aspecto descrito en el presente documento es una molécula de anticuerpo que comprende un dominio VH que tiene al menos el 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio VH de cualquiera de los anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23 mostrados en el listado de secuencias adjunto, y/o que comprende un dominio VL que tiene al menos el 60, 70, 80, 85, 90, 95, 98 o el 99 % de identidad de secuencia de aminoácidos con un dominio VL de cualquiera de los anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23 mostrados en el listado de secuencias adjunto. Los algoritmos que pueden usarse para calcular el % de identidad de dos secuencias de aminoácidos incluyen, por ejemplo, BLAST [93], FASTA [94], o el algoritmo de Smith-Waterman [95], por ejemplo, empleando parámetros por defecto.

Variantes particulares pueden incluir una o más alteraciones de secuencias de aminoácidos (adición, deleción, sustitución y/o inserción de un resto de aminoácido).

Pueden hacerse alteraciones en una o más regiones estructurales y/o una o más CDR. Las alteraciones normalmente no producen pérdida de función, así un miembro de unión que comprende una secuencia de aminoácidos así alterada puede retener una capacidad para unirse y/o neutralizar IL-6. Puede retener la misma capacidad de unión y/o neutralización cuantitativa que un miembro de unión en el que no se hace la alteración, por ejemplo como se mide en un ensayo descrito en el presente documento. El miembro de unión que comprende una secuencia de aminoácidos así alterada puede tener una capacidad mejorada de unirse a y/o neutralizar IL-6. La alteración puede comprender sustituir uno o más restos de aminoácido con un aminoácido que no existen de forma natural o no estándar, modificar uno o más restos de aminoácido en una forma que no existe de forma natural o no estándar, o insertar uno o más aminoácidos que no existen de forma natural o no estándar en la secuencia. Ejemplos de números y localizaciones de alteraciones en las secuencias de la invención se describen en cualquier parte en el presente documento. Los aminoácidos que existen de forma natural incluyen los 20 L-aminoácidos "estándar" identificados como G, A, V, L, I, M, P, F, W, S, T, N, Q, Y, C, K, R, H, D, E por sus códigos estándar de una sola letra. Los aminoácidos no estándar incluyen cualquier otro resto que pueda ser incorporado en un esqueleto de polipéptido o resultar de la modificación de un resto de aminoácido existente. Los aminoácidos no estándar puede ser que existen de forma natural o que no existen de forma natural. Se conocen en la materia varios aminoácidos no estándar que existen de forma natural, tales como 4-hidroxiprolina, 5-hidroxisilina, 3-metilhistidina, N-acetilserina, etc. [96]. Aquellos restos de aminoácido que están derivatizados en su posición N-alfa solo se localizaran en el extremo N de una secuencia de aminoácidos. Normalmente, en la presente invención, un aminoácido es un L-aminoácido, pero puede ser un D-aminoácido. La alteración puede, por tanto, comprender modificar un L-aminoácido en, o sustituirlo con, un D-aminoácido.

También se conocen formas metiladas, acetiladas y/o fosforiladas de los aminoácidos, y los aminoácidos en la presente invención pueden someterse a tal modificación.

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

El uso de aminoácidos no estándar y/o que no existen de forma natural aumenta la diversidad estructural y funcional, y así puede aumentar las posibilidades de lograr la unión de IL-6 deseada y neutralizar las propiedades en un miembro de unión de la invención. Adicionalmente, se ha mostrado que los D-aminoácidos y análogos tienen diferentes perfiles farmacocinéticos en comparación con los L-aminoácidos estándar, debido a la degradación *in vivo* de polipéptidos que tienen L-aminoácidos después de la administración a un animal, por ejemplo, un ser humano, que significa que los D-aminoácidos son ventajosos para algunas aplicaciones *in vivo*.

Pueden generarse regiones VH o VL novedosas que llevan secuencias derivadas de CDR de la invención usando mutagénesis al azar de uno o más genes VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones dentro del dominio variable entero. Una técnica tal se describe por Gram *et al.* [97], que usó PCR propensa a error. En algunas realizaciones, se hacen una o dos sustituciones de aminoácidos dentro de un dominio variable entero o conjunto de CDR.

Otro método que puede usarse es dirigir la mutagénesis a regiones CDR de genes VH o VL. Tales técnicas se desvelan por Barbas *et al.* [98] y Schier *et al.* [99].

Todas las técnicas anteriormente descritas se conocen como tales en la materia y el experto será capaz de usar tales técnicas para proporcionar miembros de unión de la invención usando metodología rutinaria en la materia.

5 Otro aspecto descrito en el presente documento proporciona un método de obtención de un sitio de unión al antígeno de anticuerpo para IL-6, comprendiendo el método proporcionar a modo de adición, delección, sustitución o inserción uno o más aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de un dominio VH expuesto en el presente documento, un dominio VH que es una variante de secuencia de aminoácidos del dominio VH, opcionalmente combinar el dominio VH así proporcionado con uno o más dominios VL, y probar el dominio VH o la combinación VH/VL o combinaciones para identificar un miembro de unión o un sitio de unión al antígeno de anticuerpo para IL-6
10 y opcionalmente con una o más propiedades deseadas, por ejemplo, la capacidad de neutralizar la actividad de IL-6. Dicho dominio VL puede tener una secuencia de aminoácidos que es sustancialmente como se expone en el presente documento. Puede emplearse un método análogo en el que una o más variantes de secuencia de un dominio VL desvelado en el presente documento se combinan con uno o más dominios VH.

15 Como se observa anteriormente, una secuencia de aminoácidos de CDR como se expone sustancialmente en el presente documento puede ser llevada como una CDR en un dominio variable de anticuerpo humano o una porción sustancial del mismo. Las secuencias de HCDR3 sustancialmente como se exponen en el presente documento representan realizaciones de la presente invención y cada una de éstas puede ser llevada como una HCDR3 en un dominio variable de la cadena pesada humana o una porción sustancial de los mismos.

20 Los dominios variables empleados descritos en el presente documento pueden obtenerse o derivar de cualquier línea germinal o dominio variable humano reordenado, o pueden ser un dominio variable sintético basado en secuencias consenso o reales de dominios variables humanos conocidos. Un dominio variable puede derivar de un anticuerpo no humano. Puede introducirse una secuencia de CDR de la invención (por ejemplo, CDR3) en un repertorio de dominios variables que carecen de una CDR (por ejemplo, CDR3), usando tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, Marks *et al.* [100] describen métodos de producción de repertorios de dominios variables de anticuerpos en los que cebadores consenso dirigidos a o adyacentes al extremo 5' del área de dominio variable se usan conjuntamente con cebadores consenso para la tercera región estructural de genes VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios VH variables que carecen de una CDR3. Marks *et al.* describen además
25 como este repertorio puede combinarse con una CDR3 de un anticuerpo particular. Usando técnicas análogas, las secuencias derivadas de CDR3 descritas en el presente documento pueden barajarse con repertorios de dominios VH o VL que carecen de una CDR3, y los dominios VH o VL completos barajados combinarse con un dominio VL o VH similar para proporcionar miembros de unión descritos en el presente documento. El repertorio puede entonces presentarse en un sistema de huésped adecuado, tal como el sistema de presentación en fagos del documento WO92/01047 o cualquiera de un gran conjunto de bibliografía posterior, que incluye Kay, Winter & McCafferty [101], de manera que puedan seleccionarse miembros de unión adecuados. Un repertorio puede consistir en cualquiera de 10^4 miembros individuales hacia arriba, por ejemplo al menos 10^5 , al menos 10^6 , al menos 10^7 , al menos 10^8 , al menos 10^9 o al menos 10^{10} miembros o más. Otros sistemas de huésped adecuados incluyen, pero no se limitan a, presentación en levadura, presentación bacteriana, presentación en T7, presentación viral, presentación en células,
35 presentación en ribosomas y presentación covalente.
40

Un método de preparación de un miembro de unión para antígeno de IL-6 se describe en el presente documento, método que comprende:

- 45 (a) proporcionar un repertorio de partida de ácidos nucleicos que codifica un dominio VH que tanto incluye una CDR3 que va a sustituirse como que carece de una región que codifica CDR3;
(b) combinar dicho repertorio con un ácido nucleico donante que codifica una secuencia de aminoácidos sustancialmente como se expone en el presente documento para una CDR3 de VH de forma que dicho ácido nucleico donante se inserte en la región CDR3 en el repertorio, de manera que se proporcione un repertorio de
50 productos de ácidos nucleicos que codifican un dominio VH;
(c) expresar los ácidos nucleicos de dicho repertorio de productos;
(d) seleccionar un miembro de unión para IL-6; y
(e) recuperar dicho miembro de unión o ácido nucleico que lo codifica.

55 De nuevo, puede emplearse un método análogo en el que una CDR3 de VL de la invención se combina con un repertorio de ácidos nucleicos que codifica un dominio VL que tanto incluye una CDR3 que va a sustituirse como que carece de una región que codifica CDR3.

60 Similarmente, pueden injertarse una o más, o las CDR, en un repertorio de dominios VH o VL que son entonces cribadas para un miembro de unión o miembros de unión para IL-6.

Por ejemplo, puede emplearse una o más de HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del anticuerpo de origen o anticuerpo 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 o 23 o el conjunto de HCDR del anticuerpo de origen o anticuerpo 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 o 23, y/o puede emplearse una o más de LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del anticuerpo de origen o anticuerpo 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 o 23 o el conjunto de LCDR del anticuerpo de origen o anticuerpo 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 o 23.
65

Similarmente, pueden emplearse otros dominios VH y VL, conjuntos de CDR y conjuntos de HCDR y/o conjuntos de LCDR desvelados en el presente documento.

5 Una porción sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina puede comprender al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones estructurales intermedias. La porción también puede incluir al menos aproximadamente el 50 % de cualquiera o ambas de la primera y cuarta regiones estructurales, siendo el 50 % del extremo C de la primera región estructural y el 50 % del extremo N de la cuarta región estructural. Restos adicionales en el extremo N o extremo C de la parte sustancial del dominio variable pueden ser aquellos no normalmente asociados a regiones de dominio variable que existen de forma natural. Por ejemplo, la construcción de miembros de unión descritos en el
10 presente documento hecha por técnicas de ADN recombinante puede producir la introducción de restos del extremo N o C codificados por conectores introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de conectores para unir dominios variables de la invención con secuencias de proteínas adicionales que incluyen regiones constantes de anticuerpo, otros dominios variables (por ejemplo, en la producción de diacuerpos) o marcas detectables/funcionales como se trata en más detalle en
15 cualquier parte en el presente documento.

Aunque en algunos aspectos descritos en el presente documento los miembros de unión comprenden un par de dominios VH y VL, los dominios de unión individuales basados en cualquier secuencia del dominio VH o VL forman aspectos adicionales de la invención. Se sabe que los dominios de inmunoglobulina individuales, especialmente los
20 dominios VH, son capaces de unirse a dianas de antígeno en una manera específica. Por ejemplo, véase la discusión de dAb anterior.

En el caso de cualquiera de los dominios de unión individuales, estos dominios pueden usarse para cribar dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión de dos dominios capaz de unirse a IL-6. Esto puede
25 lograrse por métodos de cribado de presentación en fagos usando el llamado enfoque combinatorio doble jerárquico como se desvela en el documento WO92/01047, en el que una colonia individual que contiene tanto un clon de la cadena H como L se usa para infectar una biblioteca de clones completa que codifica la otra cadena (L o H) y el miembro de unión de dos cadenas resultante se selecciona según técnicas de presentación en fagos, tales como aquellas descritas en esa referencia. Esta técnica también se desvela en Marks et al, arriba [100].
30

Miembros de unión descritos en el presente documento pueden comprender además regiones constantes de anticuerpo o partes de las mismas, por ejemplo regiones constantes de anticuerpo humano o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio VL puede unirse en su extremo C a dominios constantes de la cadena ligera de anticuerpo que incluye cadenas C_κ o C_λ humanas. Similarmente, un miembro de unión basado en un dominio VH puede unirse
35 en su extremo C a toda o parte (por ejemplo, un dominio CH1) de una cadena pesada de la inmunoglobulina derivada de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo IgG, IgA, IgE e IgM, y cualquiera de las sub-clases de isotipo, particularmente IgG1 y IgG4. La IgG1 es ventajosa, debido a su función efectora y facilidad de fabricación. También puede ser útil cualquier variante de región constante sintética u otra variante de región constante que tenga estas propiedades y establezca regiones variables como se describe en el presente documento.
40

Los miembros de unión descritos en el presente documento pueden estar marcados con una marca detectable o funcional. Así, un miembro de unión o molécula de anticuerpo puede estar presente en forma de un
45 inmunoconjugado para obtener una señal detectable y/o cuantificable. Un inmunoconjugado puede comprender una molécula de anticuerpo de la invención conjugada con marca detectable o funcional. Una marca puede ser cualquier molécula que produzca o pueda ser inducida para producir una señal, que incluye, pero no se limita a, agentes fluorescentes, radiomarcas, enzimas, quimioluminiscentes o fotosensibilizadores. Así, la unión puede detectarse y/o medirse detectando fluorescencia o luminiscencia, radiactividad, actividad enzimática o absorbancia de luz.

Marcas adecuadas incluyen, a modo de ilustración y no limitación,
50

- enzimas, tales como fosfatasa alcalina, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa ("G6PDH"), alfa-D-galactosidasa, glucosa oxidasa, glucosa amilasa, anhidrasa carbónica, acetilcolinesterasa, lisozima, malato deshidrogenasa y peroxidasa, por ejemplo, peroxidasa de rábano picante;
- colorantes;
- 55 - marcas fluorescentes o agentes fluorescentes, tales como fluoresceína y sus derivados, fluorocromo, compuestos y derivados de rodamina, GFP (GFP de "Proteína verde fluorescente"), dansilo, umbeliferona, ficoeritrina, ficocianina, alofocianina, o-ftaldehído y fluorescamina; fluoróforos tales como criptatos y quelatos de lantánidos, por ejemplo, europeo, etc. (Perkin Elmer y Cis Biointernational),
- marcas quimioluminiscentes o quimioluminiscentes, tales como isoluminol, luminol y los dioxetanos;
- 60 - marcas bio-luminiscentes, tales como luciferasa y luciferina;
- sensibilizadores;
- coenzimas;
- sustratos de enzima;
- 65 - radiomarcas que incluyen, pero no se limitan a, bromo77, carbono14, cobalto57, flúor8, galio67, galio 68, hidrógeno3 (tritio), indio111, indio113m, yodo123m, yodo125, yodo126, yodo131, yodo133, mercurio107, mercurio203, fósforo32, renio99m, renio101, renio105, rutenio95, rutenio97, rutenio103, rutenio105, escandio47,

selenio75, azufre35, tecnecio99, tecnecio99m, telurio121m, telurio122m, telurio125m, tulio165, tulio167, tulio168, itrio199 y otras radiomarcas mencionadas en el presente documento;

- partículas, tales como látex o partículas de carbono; sol metálico; cristalita; liposomas; células, etc., que pueden marcarse además con un colorante, catalizador u otro grupo detectable;
- moléculas tales como biotina, digoxigenina o 5-bromodesoxiuridina;
- restos de toxina, tales como, por ejemplo, un resto de toxina seleccionado de un grupo de exotoxina de *Pseudomonas* (PE o un fragmento citotóxico o mutante del mismo), toxina diftérica o un fragmento citotóxico o mutante del mismo, una toxina botulínica A, B, C, D, E o F, ricina o un fragmento citotóxico de la misma, por ejemplo, ricina A, abrina o un fragmento citotóxico de la misma, saporina o un fragmento citotóxico de la misma, toxina antiviral de hierba carmín o un fragmento citotóxico de la misma y briodina 1 o un fragmento citotóxico de la misma.

Enzimas y coenzimas adecuadas se desvelan en Litman, et al., documento US4275149, y Boguslaski, et al., documento US4318980. Agentes fluorescentes y quimioluminiscentes adecuados se desvelan en Litman, et al., documento US4275149. Marcas adicionales incluyen restos químicos, tales como biotina que puede detectarse mediante la unión a un resto detectable similar específico, por ejemplo avidina o estreptavidina marcada. Puede unirse marcas detectables a anticuerpos de la invención usando química convencional conocida en la materia.

Pueden prepararse inmunoconjugados o sus fragmentos funcionales por métodos conocidos para el experto en la materia. Pueden acoplarse a enzimas o a marcas fluorescentes directamente o por la mediación de un grupo espaciador o de un grupo de enlace, tal como un polialdehído, como glutaraldehído, ácido etilendiaminatetraacético (EDTA), ácido dietileno-triaminapentaacético (DTPA), o en presencia de agentes de acoplamiento, tales como aquellos mencionados anteriormente para los conjugados terapéuticos. Los conjugados que contienen marcas de tipo fluoresceína pueden prepararse mediante reacción con un isotiocianato.

Pueden usarse los métodos conocidos para el experto en la materia que existen para el acoplamiento de los radioisótopos terapéuticos a los anticuerpos tanto directamente como mediante un agente quelante, tal como EDTA, DTPA mencionados anteriormente, para los radioelementos que pueden usarse en diagnóstico. Es asimismo posible realizar el marcado con sodio125 por el método de cloramina T [102] o incluso con tecnecio99m por la técnica de Crockford et al., (US4424200) o unirse mediante DTPA como se describe por Hnatowich (documento US4479930).

Hay numerosos métodos por los que la marca puede producir una señal detectable por medios externos, por ejemplo, por examen visual, radiación electromagnética, calor y reactivos químicos. La marca puede también unirse a otro miembro de unión que une el anticuerpo de la invención, o a un soporte.

La marca puede producir directamente una señal y, por tanto, no se requieren componentes adicionales para producir una señal. Numerosas moléculas orgánicas, por ejemplo agentes fluorescentes, son capaces de absorber luz ultravioleta y visible, donde la absorción de luz transfiere energía a estas moléculas y las eleva a un estado de energía excitado. Esta energía absorbida se disipa entonces por emisión de luz a una segunda longitud de onda. Esta emisión de segunda longitud de onda también puede transferir energía a una molécula de aceptor marcada, y disiparse la energía resultante de la molécula de aceptor por emisión de luz, por ejemplo, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (FRET). Otras marcas que producen directamente una señal incluyen isótopos radiactivos y colorantes.

Alternativamente, la marca puede necesitar otros componentes para producir una señal, y el sistema productor de señal incluiría entonces todos los componentes requeridos para producir una señal medible, que pueden incluir sustratos, coenzimas, potenciadores, enzimas adicionales, sustancias que reaccionan con productos enzimáticos, catalizadores, activadores, cofactores, inhibidores, secuestrantes, iones metálicos, y una sustancia de unión específica requerida para la unión de sustancias generadoras de señal. Una discusión detallada de sistemas productores de señal adecuados puede encontrarse en Ullman, et al., documento US5185243. En el presente documento se describe un método que comprende causar o permitir la unión de un miembro de unión como se ha proporcionado en el presente documento a IL-6. Como se indica, tal unión puede tener lugar *in vivo*, por ejemplo siguiendo la administración de un miembro de unión, o ácido nucleico que codifica un miembro de unión, o puede tener lugar *in vitro*, por ejemplo en ELISA, transferencia Western, inmunocitoquímica, inmunoprecipitación, cromatografía de afinidad y ensayos bioquímicos o basados en célula, tales como un ensayo de proliferación celular de TF-1.

La presente divulgación también proporciona medir niveles de antígeno directamente, empleando un miembro de unión según la invención, por ejemplo, en un sistema biosensor. Por ejemplo, la presente invención comprende un método de detección y/o medición de la unión a IL-6, que comprende, (i) exponer dicho miembro de unión a IL-6 y (ii) detectar la unión de dicho miembro de unión a IL-6, en el que la unión se detecta usando cualquier método o marca detectable descrito en el presente documento. Esto, y cualquier otro método de detección de la unión descrito en el presente documento, puede ser directamente interpretado por la persona que realiza el método, por ejemplo, observando visualmente una marca detectable. Alternativamente, este método, o cualquier otro método de detección de la unión descrito en el presente documento, puede producir un informe en forma de una autorradiografía, una fotografía, una impresión de ordenador, un informe de citometría de flujo, un gráfico, un diagrama, un tubo de

ensayo o recipiente o pocillo que contiene el resultado, o cualquier otra representación visual o física de un resultado del método.

5 Puede determinarse la cantidad de unión del miembro de unión a IL-6. La cuantificación puede relacionarse con la cantidad de antígeno en una muestra de prueba, que puede ser de interés diagnóstico. El cribado de la unión de IL-6 y/o la cuantificación de la misma puede ser útil, por ejemplo, en el cribado de pacientes para enfermedades o trastornos referidos en el presente documento y/o cualquier otra enfermedad o trastorno que implique la expresión y/o actividad anómala de IL-6.

10 Un método de diagnóstico descrito en el presente documento puede comprender (i) obtener un tejido o muestra de fluido de un sujeto, (ii) exponer dicha muestra de tejido o de fluido a uno o más miembros de unión de la presente invención; y (iii) detectar IL-6 unida en comparación con una muestra de control, en el que un aumento en la cantidad de unión de IL-6 en comparación con el control puede indicar un nivel anómalo de la expresión o actividad de IL-6. Las muestras de tejido o fluido que van a probarse incluyen sangre, suero, orina, material de biopsia, tumores, o cualquier tejido que se sospecha que contiene niveles de IL-6 anómalos. Los sujetos que dan positivo para niveles de IL-6 anómalos o actividad también pueden beneficiarse de los métodos de tratamiento desvelados después en el presente documento.

20 Aquellos expertos en la materia son capaces de elegir un modo adecuado de determinación de la unión del miembro de unión a un antígeno según su preferencia y conocimiento general, en vista de los métodos desvelados en el presente documento.

25 Las reactividades de miembros de unión en una muestra pueden determinarse por cualquier medio apropiado. El radioinmunoensayo (RIA) es una posibilidad. El antígeno marcado radiactivo se mezcla con antígeno sin marcar (la muestra de prueba) y se deja que se una al miembro de unión. El antígeno unido se separa físicamente del antígeno no unido y se determina la cantidad de antígeno radiactivo unida al miembro de unión. Cuanto más antígeno haya en la muestra de prueba menos antígeno radiactivo se unirá al miembro de unión. También puede usarse un ensayo de unión competitivo con antígeno no radiactivo, usando antígeno o un análogo asociado a una molécula indicadora. La molécula indicadora puede ser un fluorocromo, fósforo o colorante láser con características de absorción o emisión espectralmente aisladas. Fluorocromos adecuados incluyen fluoresceína, rodamina, ficoeritrina y Texas Red, y quelatos o criptatos de lantánido. Colorantes cromogénicos adecuados incluyen diaminobencidina.

35 Otros indicadores incluyen partículas coloidales macromoleculares o material en partículas, tales como perlas de látex que están coloreadas, son magnéticas o paramagnéticas, y agentes biológica o químicamente activos que pueden producir señales directa o indirectamente detectables para ser visualmente observadas, electrónicamente detectadas o registradas de otro modo. Estas moléculas pueden ser enzimas, que catalizan reacciones que se desarrollan, o cambian de color o producen, por ejemplo, cambios en propiedades eléctricas. Pueden ser molecularmente excitables, de forma que las transiciones electrónicas entre los estados de energía produzcan absorciones o emisiones espectrales características. Pueden incluir entidades químicas usadas conjuntamente con biosensores. Pueden emplearse sistemas de detección de biotina/avidina o biotina/estreptavidina y fosfatasa alcalina.

45 Pueden usarse las señales generadas por conjugados de miembro de unión-indicador individuales para derivar datos absolutos o relativos cuantificables de la unión del miembro de unión relevante en muestras (normal y prueba).

50 Un kit que comprende un miembro de unión descrito en el presente documento también se describe en el presente documento. En el kit, el miembro de unión puede estar marcado para permitir su reactividad en una muestra que va a determinarse, por ejemplo como se describe además más adelante. Adicionalmente, el miembro de unión puede o puede no estar unido a un soporte sólido. Los componentes de un kit están generalmente estériles y en viales sellados u otros recipientes. Pueden emplearse kits en el análisis de diagnóstico u otros métodos para los que son útiles los miembros de unión. Un kit puede contener instrucciones para el uso de los componentes en un método, por ejemplo un método según la presente divulgación. Materiales secundarios para ayudar a o para permitir realizar un método tal pueden incluirse dentro de un kit de la invención. Los materiales secundarios incluyen un segundo miembro de unión diferente que se une al primer miembro de unión y está conjugado con una marca detectable (por ejemplo, una marca fluorescente, isótopo radiactivo o enzima). Los kits basados en anticuerpo también pueden comprender perlas para realizar una inmunoprecipitación. Cada componente de los kits está generalmente en su recipiente adecuado propio. Así, estos kits generalmente comprenden recipientes distintos adecuados para cada miembro de unión. Además, los kits pueden comprender instrucciones para realizar el ensayo y métodos para interpretar y analizar los datos resultantes del rendimiento del ensayo.

60 También se describe en el presente documento el uso de un miembro de unión como antes para medir los niveles de antígeno en un ensayo de competición, es decir, un método de medición del nivel de antígeno en una muestra empleando un miembro de unión descrito en el presente documento en un ensayo de competición. Esto puede ser si no se requiere la separación física de antígeno unido de sin unir. La unión de una molécula indicadora al miembro de unión de manera que se produzca un cambio físico u óptico tras la unión es una posibilidad. La molécula indicadora puede generar señales directa o indirectamente detectables, que pueden ser cuantificables. El enlace de moléculas

indicadoras puede ser directa o indirectamente, covalentemente, por ejemplo mediante un enlace peptídico, o no covalentemente. El enlace mediante un enlace peptídico puede ser como resultado de la expresión recombinante de una fusión génica que codifica el anticuerpo y la molécula indicadora.

5 Diversos aspectos descritos en el presente documento se extienden a un miembro de unión que compite por la unión a IL-6 con cualquier miembro de unión definido en el presente documento, por ejemplo el anticuerpo de origen o cualquiera de los anticuerpos 2, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 14, 16, 17, 18, 19, 21, 22 y 23, por ejemplo en formato de IgG1. La competición entre los miembros de unión puede ensayarse fácilmente *in vitro*, por ejemplo marcando una molécula indicadora específica para un miembro de unión que puede detectarse en presencia de otro(s) miembro(s) de unión sin marcar, para permitir la identificación de miembros de unión que se unen al mismo epítotope o un epítotope de solapamiento. La competición puede determinarse, por ejemplo, usando ELISA, en el que la IL-6 se inmoviliza a una placa y se añade a la placa un primer miembro de unión etiquetado o marcado junto con uno o varios de otros miembros de unión sin etiquetar o sin marcar. La presencia de un miembro de unión sin etiquetar que compite con el miembro de unión etiquetado se observa por una disminución en la señal emitida por el miembro de unión etiquetado.

Por ejemplo, en el presente documento se describe un método de identificación de un compuesto de unión a IL-6, que comprende (i) inmovilizar IL-6 a un soporte, (ii) poner en contacto dicha IL-6 inmovilizada simultáneamente o de un modo escalonado con al menos un miembro de unión etiquetado o marcado según la invención y uno o más compuestos de unión de prueba sin etiquetar o sin marcar, y (iii) identificar un nuevo compuesto de unión a IL-6 observando una disminución en la cantidad de marca unida del miembro de unión etiquetado. Tales métodos pueden realizarse en un modo de alto rendimiento usando un formato de múltiples pocillos o de matriz. Tales ensayos también pueden realizarse en solución. Véase, por ejemplo, el documento U.S. 5.814.468. Como se ha descrito anteriormente, la detección de la unión puede ser directamente interpretada por la persona que realiza el método, por ejemplo, observando visualmente una marca detectable, o una disminución en la presencia de la misma. Alternativamente, los métodos de unión descritos en el presente documento puede producir un informe en forma de una autorradiografía, una fotografía, una impresión de ordenador, un informe de citometría de flujo, un gráfico, un diagrama, un tubo de ensayo o recipiente o pocillo que contiene el resultado, o cualquier otra representación visual o física de un resultado del método.

También pueden usarse ensayos de competición en el mapeo de epítotos. En un caso, el mapeo de epítotos puede usarse para identificar el epítotope unido por miembro de unión de IL-6 que opcionalmente puede tener características de neutralización y/o modulación optimizadas. Un epítotope tal puede ser lineal o conformacional. Un epítotope conformacional puede comprender al menos dos fragmentos diferentes de IL-6, en el que dichos fragmentos están posicionados en proximidad entre sí cuando IL-6 se pliega en su estructura terciaria o cuaternaria para formar un epítotope conformacional que es reconocido por un inhibidor de IL-6, tal como un miembro de unión de IL-6-. En la prueba de competición puede emplearse un fragmento de péptido del antígeno, especialmente un péptido que incluye o consiste esencialmente de un epítotope de interés. Puede usarse un péptido que tiene la secuencia de epítotope más uno o más aminoácidos en cualquier extremo. Los miembros de unión descritos en el presente documento pueden ser de forma que su unión por el antígeno se inhiba por un péptido con o que incluye la secuencia dada.

En el presente documento se describe además un ácido nucleico aislado que codifica un miembro de unión descrito en el presente documento. El ácido nucleico puede incluir ADN y/o ARN. Un aspecto descrito en el presente documento proporciona un ácido nucleico que codifica una CDR o conjunto de CDR o dominio VH o dominio VL o sitio de unión al antígeno de anticuerpo o molécula de anticuerpo, por ejemplo, scFv o IgG1, descrito en el presente documento.

También se describen en el presente documento construcciones en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o de expresión que comprenden al menos un polinucleótido como antes.

También se describe en el presente documento una célula huésped recombinante que comprende una o más construcciones como antes. Un ácido nucleico que codifica cualquier CDR o conjunto de CDR o dominio VH o dominio VL o sitio de unión al antígeno de anticuerpo o molécula de anticuerpo, por ejemplo scFv o IgG1 como se ha proporcionado, forma él mismo un aspecto de la presente divulgación, al igual que un método de producción del producto codificado, método que comprende la expresión de ácido nucleico codificante para el mismo. La expresión puede lograrse convenientemente cultivando bajo condiciones apropiadas células huésped recombinantes que contienen el ácido nucleico. Tras la producción por expresión de un dominio VH o VL, o miembro de unión, puede aislarse y/o purificarse usando cualquier técnica adecuada, entonces se usa según sea apropiado.

El ácido nucleico descrito en el presente documento puede comprender ADN o ARN y puede ser completa o parcialmente sintético. Referencia a una secuencia de nucleótidos como se explica en el presente documento engloba una molécula de ADN con la secuencia especificada, y engloba una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que U se sustituye por T, a menos que el contexto lo requiera de otro modo.

Un aspecto todavía adicional descrito en el presente documento proporciona un método de producción de un dominio variable VH de anticuerpo, incluyendo el método causar la expresión del ácido nucleico codificante. Un

método tal puede comprender cultivar células huésped en condiciones para la producción de dicho dominio variable VH de anticuerpo.

5 Métodos análogos para la producción de dominios variables VL y miembros de unión que comprenden un dominio VH y/o VL se describen en el presente documento.

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

10 Sistemas de clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de células huésped diferentes son bien conocidos. Células huésped adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células vegetales, hongos filamentosos, levadura y sistemas de baculovirus y plantas transgénicas y animales. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en células procariotas está bien establecida en la materia. Para una revisión véase, por ejemplo, Plücker [103]. Un huésped bacteriano común es *E. coli*.

La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para aquellos expertos en la materia como una opción para la producción de un miembro de unión [104, 105, 106]. Líneas celulares de mamífero disponibles en la materia para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster bebé, células de melanoma de ratón NS0, células de mieloma de rata YB2/0, células renales embrionarias humanas, células de retina embrionaria humana y muchas otras.

25 Pueden elegirse o construirse vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, que incluyen secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea apropiado. Los vectores pueden ser plásmidos, por ejemplo, fagémido, o virales, por ejemplo, bacteriófago, según sea apropiado [107]. Muchas técnicas conocidas y protocolos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en Ausubel *et al.* [108].

30 Otro aspecto descrito en el presente documento proporciona una célula huésped que contiene ácido nucleico como se ha desvelado en el presente documento. Una célula huésped tal puede estar *in vitro* y puede estar en cultivo. Una célula huésped tal puede estar *in vivo*. La presencia *in vivo* de la célula huésped puede permitir la expresión intracelular de los miembros de unión descritos en el presente documento como "intracuerpos" o anticuerpos intracelulares. Pueden usarse intracuerpos para terapia génica.

40 Un aspecto adicional descrito en el presente documento proporciona un método que comprende introducir el ácido nucleico descrito en el presente documento en una célula huésped. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para células eucariotas, técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección mediada por liposomas y transducción usando retrovirus u otros virus, por ejemplo variolovacuna o, para células de insecto, baculovirus. La introducción de ácido nucleico en la célula huésped, en particular una célula eucariota, puede usar un sistema viral o basado en plásmido. El sistema de plásmido puede mantenerse episómicamente o puede incorporarse en la célula huésped o en un cromosoma artificial. La incorporación puede ser tanto por integración al azar como dirigida de una o más copias de loci individuales o múltiples. Para células bacterianas, técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección usando bacteriófago.

50 La introducción puede ir seguida de producir o permitir la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando células huésped en condiciones para la expresión del gen. La purificación del producto esperado puede lograrse por métodos conocidos para un experto en la materia.

El ácido nucleico descrito en el presente documento puede integrarse en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula huésped. La integración puede promoverse por la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, según las técnicas convencionales.

55 También se describe en el presente documento un método que comprende usar una construcción como se ha establecido anteriormente en un sistema de expresión con el fin de expresar un miembro de unión o polipéptido como antes.

60 Hay evidencia de participación de IL-6 en una variedad de trastornos, como se trata en cualquier parte en el presente documento. Los miembros de unión descritos en el presente documento pueden, por tanto, usarse en un método de diagnóstico o tratamiento de un trastorno asociado a IL-6. Un trastorno tal puede, por ejemplo, ser un trastorno inflamatorio y/o autoinmunitario tal como, por ejemplo, artritis reumatoide, osteoartritis, caquexia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, artritis idiopática juvenil, asma, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn o aterosclerosis. También puede usarse un miembro de unión descrito en el presente documento para tratar un trastorno tal como un tumor y/o cáncer.

Los miembros de unión descritos en el presente documento pueden también usarse en un método de diagnóstico o tratamiento de al menos una enfermedad relacionada con IL-6, en un paciente, animal, órgano, tejido o célula, que incluye, pero no se limita a:

- 5 (las vías respiratorias) enfermedades obstructivas de las vías respiratorias que incluyen enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC); asma, tal como asma bronquial, alérgica, intrínseca, extrínseca y por polvo, particularmente asma crónica o inveterada (por ejemplo, asma tardía e hipersensibilidad de las vías respiratorias); bronquitis; rinitis aguda, alérgica, atrófica y rinitis crónica que incluye rinitis caseosa, rinitis hipertrófica, rinitis purulenta, rinitis seca y rinitis medicamentosa; rinitis membranosa que incluye rinitis cruposa, fibrinosa y pseudomembranosa y rinitis escrofulosa; rinitis estacional que incluyen rinitis nerviosa (fiebre del heno) y rinitis vasomotora, sinusitis, fibrosis pulmonar idiopática (IPF); sarcoidosis, pulmón del granjero y enfermedades relacionadas, síndrome disneico del adulto, neumonitis por hipersensibilidad, pulmón fibroide y neumonía intersticial idiopática;
- 10
- 15 (hueso y articulaciones) artritis reumatoide, artritis crónica juvenil, artritis juvenil de aparición sistémica, espondiloartropatías seronegativas (incluyendo espondilitis anquilosante, artritis psoriásica y enfermedad de Reiter), enfermedad de Behcet, síndrome de Sjögren y esclerosis sistémica, gota, osteoporosis y osteoartritis;
- 20 (piel) psoriasis, dermatitis atópica, dermatitis de contacto y otras dermatosis eccematosas, dermatitis alérgica de contacto, dermatitis seborreica, liquen plano, esclerodermia, pénfigo, penfigoide bulloso, epidermólisis bullosa, urticaria, angioedema, vasculitis, eritemas, eosinofilia cutáneas, uveítis, alopecia areata, conjuntivitis alérgica y conjuntivitis vernal;
- 25 (tubo gastrointestinal) úlcera gástrica, celiacía, proctitis, gastroenteritis eosinofílica, mastocitosis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, síndrome antifosfolípidos), alergias alimentarias que tienen efectos remotos del intestino, por ejemplo, migraña, rinitis y eccema;
- 30 (otros tejidos y enfermedad sistémica) caquexia, esclerosis múltiple, aterosclerosis, síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), glomerulonefritis proliferativa mesangial, síndrome nefrótico, nefritis, nefritis glomerular, insuficiencia renal aguda, hemodiálisis, uremia, lupus eritematoso localizado o discoide, lupus eritematoso sistémico, enfermedad de Castleman, tiroiditis de Hashimoto, miastenia grave, diabetes tipo I, diabetes insulinoresistente de tipo B, anemia de células falciformes, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, síndrome nefrótico, fascitis eosinofílica, síndrome de hiper-IgE, vasculitis sistémica / granulomatosis de Wegener, orquitis/procedimientos de reversión de la vasectomía, lepra lepromatosa, hepatitis inducida por el alcohol, síndrome de Sézary y púrpura trombocitopénica idiopática; adherencias postoperatorias, nefrosis, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, síndrome de sepsis, sepsis Gram-positiva, sepsis Gram-negativa, sepsis negativa en cultivo, sepsis fúngica, fiebre neutropénica, pancreatitis aguda, urosepsis, enfermedad de Graves, enfermedad de Raynaud, citotoxicidad mediada por anticuerpos, reacciones de hipersensibilidad tipo III, síndrome de POEMS (síndrome de polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal y de cambios en la piel),
- 35 enfermedad mixta del tejido conjuntivo, enfermedad idiopática de Addison, diabetes mellitus, hepatitis crónica activa, cirrosis biliar primaria, vitiligo, síndrome post-IM (cardiotomía), hipersensibilidad de tipo IV, granulomas debidos a organismos intracelulares, enfermedad de Wilson, hemacromatosis, deficiencia de alfa-I-antitripsina, retinopatía diabética, tiroiditis de Hashimoto, evaluación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, tiroiditis, encefalomiелitis, enfermedad pulmonar crónica neonatal, linfocitosis hemofagocítica familiar, alopecia, radioterapia (por ejemplo, que incluye, pero no se limita a, astenia, anemia, caquexia, y similares), intoxicación crónica por salicilato, apnea del sueño, obesidad, insuficiencia cardíaca y meningococemia;
- 40
- 45 (rechazo de aloinjerto) agudo y crónico tras, por ejemplo, trasplante de riñón, corazón, hígado, pulmón, páncreas, médula ósea, hueso, intestino delgado, piel, cartílago y córnea; y enfermedad crónica de injerto contra huésped;
- 50 (enfermedad maligna) leucemia, leucemia linfoblástica aguda (LLA), leucemia aguda, LLA de linfocitos T, linfocitos B o FAB, leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia mielóide aguda (LMA), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células pilosas, síndrome mielodisplásico (SMD), cualquier linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, cualquier linfoma maligno, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, carcinoma de células renales, carcinoma colorrectal, carcinoma prostático, carcinoma pancreático, carcinoma nasofaríngeo, histiocitosis maligna, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia de tumor maligno, tumores sólidos, adenocarcinomas, sarcomas, melanoma maligno, hemangioma, enfermedad metastásica, resorción ósea relacionada con el cáncer, dolor de huesos relacionado con el cáncer; la supresión de metástasis del cáncer; la mejora de caquexia por cáncer;
- 55
- 60 fibrosis quística, accidente cerebrovascular, lesión por reperfusión en el corazón, cerebro, miembros periféricos y otros órganos;
- 65 heridas por quemadura, traumatismo/hemorragia, exposición a radiación ionizante, úlceras crónicas de la piel;
- enfermedades reproductivas (por ejemplo, trastornos de la ovulación, menstruación e implantación, parto

prematureo, preeclampsia, endometriosis);

(Infecciones) infección bacteriana aguda o crónica, procesos parasíticos o infecciosos agudos y crónicos, que incluyen infecciones bacterianas, virales y fúngicas, infección por VIH/ neuropatía por VIH, meningitis, hepatitis (A, B o C, u otras hepatitis virales similares), artritis séptica, peritonitis, neumonía, epiglotitis, *E. coli* 0157:h7, síndrome urémico hemolítico / púrpura trombocitopénica trombótica, malaria, fiebre hemorrágica del dengue, leishmaniosis, lepra, síndrome de choque tóxico, miositis estreptocócica, gangrena gaseosa, tuberculosis micobacteriana, *Mycobacterium avium intracellulare*, neumonía por *Pneumocystis carinii*, enfermedad inflamatoria pélvica, orquitis/epididimitis, legionella, enfermedad de Lyme, gripe A, virus de Epstein-Barr, síndrome hemofagocítico asociado a virus, encefalitis viral / meningitis aséptica, y similares.

Por consiguiente, en el presente documento se describe un método de tratamiento de un trastorno relacionado con IL-6, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de uno o más miembros de unión descritos en el presente documento solos o en una pauta terapéutica combinada con otro medicamento apropiado conocido en la materia o descrito en el presente documento.

La evidencia de participación de IL-6 en ciertos trastornos se resume en cualquier parte en el presente documento. Además, los datos presentados en el presente documento indican además que los miembros de unión descritos en el presente documento pueden usarse para tratar tales trastornos, que incluyen tratamiento preventivo y reducción de la gravedad de los trastornos. Por consiguiente, un aspecto descrito en el presente documento proporciona un método de tratamiento o reducción de la gravedad de al menos un síntoma de cualquiera de los trastornos mencionados en el presente documento, que comprende administrar a un paciente en necesidad del mismo una cantidad eficaz de uno o más miembros de unión descritos en el presente documento solos o en una pauta terapéutica combinada con otro medicamento apropiado conocido en la materia o descrito en el presente documento de forma que se reduzca la gravedad de al menos un síntoma de cualquiera de los trastornos anteriores.

Así, los miembros de unión descritos en el presente documento son útiles como agentes terapéuticos en el tratamiento de enfermedades o trastornos que implican la expresión y/o actividad de IL-6 y/o IL-6Ra, especialmente expresión/actividad anómala. Un método de tratamiento puede comprender administrar una cantidad eficaz de un miembro de unión descrito en el presente documento a un paciente en necesidad del mismo, en el que se reduce la expresión y/o actividad anómala de IL-6 y/o IL-6Ra. Un método de tratamiento puede comprender (i) identificar un paciente que demuestra niveles anómalos de IL-6:IL-6Ra o actividad, por ejemplo, usando los métodos de diagnóstico descritos anteriormente, y (ii) administrar una cantidad eficaz de un miembro de unión descrito en el presente documento al paciente, en el que se reduce la expresión y/o actividad anómala de IL-6Ra y/o IL-6. Una cantidad eficaz descrita en el presente documento es una cantidad que disminuye la expresión y/o actividad anómala de IL-6 y/o IL-6Ra para reducir o disminuir la gravedad de al menos un síntoma de la enfermedad o trastorno particular que está tratándose, pero no necesariamente curar la enfermedad o trastorno.

En el presente documento se describe además un método de antagonizar al menos un efecto de IL-6, que comprende poner en contacto con o administrar una cantidad eficaz de uno o más miembros de unión descritos en el presente documento de forma que se antagonice dicho al menos un efecto de IL-6. Los efectos de IL-6 que pueden ser antagonizados por los métodos descritos en el presente documento incluyen la unión de IL-6 a gp130, y efectos aguas abajo que surgen como consecuencia de esta unión. Por consiguiente, aspectos adicionales descritos en el presente documento proporcionan métodos de tratamiento que comprenden la administración de un miembro de unión como se proporciona, composiciones farmacéuticas que comprenden un miembro de unión tal, y el uso de un miembro de unión tal en la fabricación de un medicamento para administración, por ejemplo en un método de preparación de un medicamento o composición farmacéutica que comprende formular el miembro de unión con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Un excipiente farmacéuticamente aceptable puede ser un compuesto o una combinación de compuestos que entra en una composición farmacéutica no provocando reacciones secundarias y que permite, por ejemplo, la facilitación de la administración del (de los) compuesto(s) activo(s), un aumento en su esperanza de vida y/o en su eficacia en el cuerpo, un aumento en su solubilidad en solución o incluso una mejora en su conservación. Estos vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y serán adaptados por el experto en la materia en función de la naturaleza y del modo de administración del (de los) compuesto(s) activo(s) elegido(s).

Los miembros de unión descritos en el presente documento normalmente se administrarán en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente, además del miembro de unión. Así, las composiciones farmacéuticas según la presente invención, y para su uso según la presente invención, pueden comprender, además del componente activo, un excipiente farmacéuticamente aceptable, vehículo, tampón, estabilizador u otros materiales bien conocidos para aquellos expertos en la materia. Tales materiales no deben ser tóxicos y no deben interferir con la eficacia del componente activo. La naturaleza precisa del vehículo u otro material dependerá de la vía de administración, que puede ser oral, inhalada, intratraqueal, tópica, intravesicular o mediante inyección, como se trata más adelante.

Composiciones farmacéuticas para administración oral, tales como, por ejemplo, moléculas de anticuerpo de un único dominio (por ejemplo, "nanobodies™"), etc., también se prevén en la presente invención. Tales formulaciones

orales pueden estar en forma de comprimido, cápsula, polvo, líquido o semi-sólido. Un comprimido puede comprender un vehículo sólido, tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un vehículo líquido, tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceite mineral o aceite sintético. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución de sacáridos o glicoles, tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

Para inyección intravenosa, o inyección en el sitio de afección, el componente activo estará en forma de una solución acuosa aceptable por vía parenteral que está libre de pirógenos y tiene pH, isotonicidad y estabilidad adecuados. Aquellos de habilidad relevante en la materia son muy capaces de preparar soluciones adecuadas usando, por ejemplo, vehículos isotónicos, tales como inyección de cloruro sódico, inyección de Ringer, inyección de Ringer con lactato.

Pueden emplearse conservantes, estabilizadores, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos según se requiera que incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, tales como ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio; cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3'-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, tales como albúmina del suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparaginas, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes, tales como EDTA; azúcares, tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sal, tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

Los miembros de unión descritos en el presente documento pueden formularse en formas líquidas, semi-sólidas o sólidas dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la molécula y la vía de administración. Las formulaciones pueden incluir excipientes, o combinaciones de excipientes, por ejemplo: azúcares, aminoácidos y tensioactivos. Las formulaciones líquidas pueden incluir un amplio intervalo de concentraciones de anticuerpo y pH. Pueden producirse formulaciones sólidas por, por ejemplo, liofilización, secado por pulverización o secado por tecnología de fluidos supercríticos. Las formulaciones de miembros de unión dependerán de la vía de administración prevista: por ejemplo, las formulaciones para administración pulmonar puede consistir en partículas con propiedades físicas que garantizan la penetración en el pulmón profundo tras la inhalación; las formulaciones tópicas (por ejemplo, para el tratamiento de cicatrización, por ejemplo, cicatrización dérmica) pueden incluir agentes modificadores de la viscosidad, que prolongan el tiempo que el fármaco está residente en el sitio de acción. Un miembro de unión puede prepararse con un vehículo que protegerá el miembro de unión de la rápida liberación, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes, parches transdérmicos y sistemas de administración microencapsulada. Pueden usarse polímeros biocompatibles biodegradables, tales como etileno-acetato de vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Muchos métodos para la preparación de tales formulaciones son conocidos para aquellos expertos en la materia [109].

El tratamiento puede administrarse por vía oral (tal como, por ejemplo, moléculas de anticuerpo de dominio único (por ejemplo, "nanobodies™")) mediante inyección (por ejemplo, por vía subcutánea, intrarticular, intravenosa, intraperitoneal, intrarterial o intramuscular), por inhalación, intratraqueal, por la vía intravascular (instilación en la vejiga urinaria) o por vía tópica (por ejemplo, intraocular, intranasal, rectal, en heridas, sobre la piel). El tratamiento puede administrarse por infusión pulsada, particularmente con dosis decreciente del miembro de unión. La vía de administración puede ser determinada por las características fisicoquímicas del tratamiento, por consideraciones especiales para la enfermedad o por el requisito para optimizar la eficacia o para minimizar los efectos secundarios. Una vía de administración particular es intravenosa. Otra vía de administración de composiciones farmacéuticas de la presente invención es por vía subcutánea. Se prevé que el tratamiento no se limite a uso en la clínica. Por tanto, también es ventajosa la inyección subcutánea usando un dispositivo libre de aguja.

Una composición puede administrarse sola o en combinación con otros tratamientos, tanto simultáneamente como secuencialmente dependiendo de la afección que vaya a tratarse.

Un miembro de unión descrito en el presente documento puede usarse como parte de una terapia de combinación conjuntamente con un componente medicinal adicional. Pueden usarse tratamientos de combinación para proporcionar efectos sinérgicos significativos, particularmente la combinación de un miembro de unión descrito en el presente documento con uno o varios de otros fármacos. Un miembro de unión descrito en el presente documento puede administrarse simultáneamente o secuencialmente, o como una preparación combinada con otro agente terapéutico o agentes, para el tratamiento de una o más de las afecciones enumeradas en el presente documento.

Un miembro de unión descrito en el presente documento puede usarse como un quimiosensibilizador por el cual puede aumentarse la eficacia terapéutica de agentes citotóxicos, y así puede proporcionarse para administración en combinación con uno o más agentes citotóxicos, tanto simultáneamente como secuencialmente. El miembro de unión puede también usarse como un radiosensibilizador, por el cual puede mejorar la eficacia de radiación, y puede así proporcionarse para administración en combinación con radiación, tanto simultáneamente como

secuencialmente.

Un miembro de unión descrito en el presente documento puede proporcionarse en combinación o adición con uno o más de los siguientes agentes:

- 5
- una citocina o agonista o antagonista de la función de las citocinas (por ejemplo, un agente que actúa sobre las vías de señalización de citocinas, tales como un modulador del sistema SOCS), tal como un alfa-, beta- y/o gamma-interferón; factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-1), sus receptores y proteínas de unión asociadas; interleucinas (IL), por ejemplo una o más de IL-1 a -33, y/o un antagonista o inhibidor de interleucina, tal como anakinra; inhibidores de receptores de miembros de la familia de interleucina o inhibidores de subunidades específicas de tales receptores, un inhibidor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), tal como anticuerpos monoclonales anti-TNF (por ejemplo, infliximab, adalimumab y/o CDP-870) y/o un antagonista del receptor de TNF, por ejemplo una molécula de inmunoglobulina (tal como etanercept) y/o un agente de bajo peso molecular, tal como pentoxifilina;
 - 10
 - 15 - un modulador de linfocitos B, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal que se dirige a linfocitos B (tal como CD20 (rituximab) o MRA-aIL16R) o linfocitos T (por ejemplo, CTLA4-Ig, HuMax IL-15 o Abatacept);
 - un modulador que inhibe la actividad de osteoclastos, por ejemplo, un anticuerpo para RANKL;
 - un modulador de la función de quimiocina o de receptores de quimiocina, tal como un antagonista de CCR1, CCR2, CCR2A, CCR2B, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CCR10 y CCR11 (para la familia C-C); CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4 y CXCR5 y CXCR6 (para la familia C-X-C) y CX₃CR1 para la familia C-X₃-C;
 - 20
 - un inhibidor de metaloproteasas de la matriz (MMP), es decir, una o más de las estromelinas, las colagenasas y las gelatinasas, además de agreganasa, especialmente colagenasa-1 (MMP-1), colagenasa-2 (MMP-8), colagenasa-3 (MMP-13), estromelina-1 (MMP-3), estromelina-2 (MMP-10) y/o estromelina-3 (MMP-11) y/o MMP-9 y/o MMP-12, por ejemplo un agente tal como doxiciclina;
 - 25
 - un inhibidor de la biosíntesis de leucotrieno, inhibidor de 5-lipoxigenasa (5-LO) o antagonista de la proteína activadora de 5-lipoxigenasa (FLAP), tal como zileuton; ABT-761; fenleuton; tepoxalina; Abbott-79175; Abbott-85761; N-(5-sustituido)-tiofeno-2-alkilsulfonamidas; 2,6-di-terc-butilfenolhidrazonas; metoxitetrahidropiranos tales como Zeneca ZD-2138; el compuesto SB-210661; un compuesto de 2-cianonaftaleno sustituido con piridinilo, tal como L-739.010; un compuesto de 2-cianoquinolina, tal como L-746.530; indol y/o un compuesto de quinolina, tal como MK-591, MK-886 y/o BAY x 1005;
 - 30
 - un antagonista del receptor para leucotrienos (LT) B₄, LTC₄, LTD₄ y LTE₄, seleccionado del grupo que consiste en la fenotiazin-3-ona, tal como L-651.392; compuestos de amidino, tales como CGS-25019c; benzoxalaminas, tales como ontazolast; benzenocarboximidamidas, tales como BIIL 284/260; y compuestos, tales como zafirlukast, ablukast, montelukast, pranlukast, verlukast (MK-679), RG-12525, Ro-245913, iralukast (CGP 45715A) y BAY x 7195;
 - 35
 - un inhibidor de la fosfodiesterasa (PDE), tal como una metilxantanina, por ejemplo teofilina y/o aminofilina; y/o un inhibidor selectivo de la isoenzima PDE, por ejemplo un inhibidor de PDE4 y/o inhibidor de la isoforma PDE4D y/o un inhibidor de PDE5;
 - 40
 - un antagonista de receptor de histamina tipo 1, tal como cetirizina, loratadina, desloratadina, fexofenadina, acrivastina, terfenadina, astemizol, azelastina, levocabastina, clorfeniramina, prometazina, ciclizina y/o mizolastina (generalmente administrado por vía oral, tópica o parenteral);
 - un inhibidor de la bomba de protones (tal como omeprazol) o antagonista de receptor de histamina tipo 2 gastroprotector;
 - 45
 - un antagonista del receptor de histamina tipo 4;
 - un agente simpatomimético vasoconstrictor del agonista adrenoceptor alfa-1/alfa-2, tal como propilhexedrina, fenilefrina, fenilpropanolamina, efedrina, pseudofedrina, clorhidrato de nafazolina, clorhidrato de oximetazolina, clorhidrato de tetrahidrozolina, clorhidrato de xilometazolina, clorhidrato de tramazolina y clorhidrato de etilnorepinefrina;
 - 50
 - un agente anticolinérgico, por ejemplo un antagonista de los receptores muscarínicos (M1, M2 y M3), tal como atropina, hioscina, glicopirrolato, bromuro de ipratropio, bromuro de tiotropio, bromuro de oxitropio, pirenzepina y telenzepina;
 - un agonista beta-adrenoceptor (incluyendo los subtipos 1-4 del receptor beta), tal como isoprenalina, salbutamol, formoterol, salmeterol, terbutalina, orciprenalina, mesilato de bitolterol y/o pirbuterol, por ejemplo un enantiómero quiral de los mismos;
 - 55
 - una cromona, por ejemplo cromoglicato de sodio y/o nedocromil sodio;
 - un glucocorticoide, tal como flunisolida, acetónido de triamcinolona, dipropionato de beclometasona, budesonida, propionato de fluticasona, ciclesonida y/o furoato de mometasona;
 - un agente que modula los receptores de hormona nuclear, tales como un PPAR;
 - 60
 - una inmunoglobulina (Ig) o preparación de Ig o un antagonista o anticuerpo que modula la función de Ig, tal como anti-IgE (por ejemplo, omalizumab);
 - otro agente anti-inflamatorio sistémico o tópicamente administrado, por ejemplo talidomida o un derivado de la misma, un retinoide, ditranol y/o calcipotriol;
 - 65
 - combinaciones de aminosalicilatos y sulfapiridina, tales como sulfasalazina, mesalazina, balsalazida y olsalazina; y agentes inmunomoduladores, tales como las tiopurinas; y corticosteroides, tales como budesonida;
 - un agente antibacteriano, por ejemplo un derivado de penicilina, una tetraciclina, un macrólido, una beta-

- lactama, una fluoroquinolona, metronidazol y/o un aminoglucósido inhalado; y/o un agente antiviral, por ejemplo aciclovir, famciclovir, valaciclovir, ganciclovir, cidofovir; amantadina, rimantadina; ribavirina; zanamavir y/o oseltamavir; un inhibidor de la proteasa, tal como indinavir, nelfinavir, ritonavir y/o saquinavir; un inhibidor de la transcriptasa inversa de nucleósido, tal como didanosina, lamivudina, estavudina, zalcitabina, zidovudina; un inhibidor de transcriptasa inversa no de nucleósido, tal como nevirapina, efavirenz;
- un agente cardiovascular, tal como un bloqueante de los canales de calcio, bloqueante beta-adrenoceptor, inhibidor de la enzima convertidora de angiotensina (ACE), antagonista del receptor de angiotensina-2; agente hipolipemiante, tal como una estatina y/o fibrato; un modulador de la morfología de las células sanguíneas, tal como pentoxifilina; un trombolítico y/o un anticoagulante, por ejemplo un inhibidor de la agregación de plaquetas;
 - un agente del SNC, tal como un antidepresivo (tal como sertralina), fármaco anti-parkinsoniano (tal como deprenilo, L-dopa, ropinirol, pramipexol); inhibidor de MAOB, tal como selegina y rasagilina; inhibidor comp, tal como tasmar; inhibidor A-2, inhibidor de la recaptación de dopamina, antagonista de NMDA, agonista de nicotina, agonista de dopamina y/o inhibidor de la óxido nítrico sintasa neuronal) y un fármaco anti-Alzheimer, tal como donepezilo, rivastigmina, tacrina, inhibidor de COX-2, propentofilina o metrifonato;
 - un agente para el tratamiento de dolor agudo y crónico, por ejemplo un analgésico de acción central o periférica, tal como un análogo o derivado de opioides, carbamazepina, fenitoína, valproato de sodio, amitriptilina u otro agente antidepresivo, paracetamol, o agente antiinflamatorio no esteroideo;
 - un agente anestésico local administrado por vía parenteral o tópica (incluyendo inhalada), tal como lignocaína o una análogo de la misma;
 - un agente anti-osteoporosis, por ejemplo un agente hormonal, tal como raloxifeno, o un bifosfonato, tal como alendronato;
 - (i) un inhibidor de triptasa; (ii) un antagonista del factor de activación de plaquetas (PAF); (iii) un inhibidor de la enzima convertidora de interleucina (ICE); (iv) un inhibidor de IMPDH; (v) un inhibidor de moléculas de adhesión que incluyen el antagonista VLA-4; (vi) una catepsina; (vii) un inhibidor de cinasas, por ejemplo un inhibidor de tirosina cinasas (tal como Btk, Itk, Jak3 MAP, ejemplos de inhibidores podrían incluir Gefitinib, mesilato de imatinib), una serina / treonina cinasa (por ejemplo, un inhibidor de MAP cinasa, tal como p38, JNK, proteínas cinasas A, B y C y IKK), o una cinasa implicada en la regulación del ciclo celular (por ejemplo, una cinasa dependiente de ciclina); (viii) un inhibidor de glucosa-6 fosfato deshidrogenasa; (ix) un antagonista del receptor de kinina-B₁ y/o B₂; (x) un agente antigotoso, por ejemplo colchicina; (xi) un inhibidor de xantina oxidasa, por ejemplo, alopurinol; (xii) un agente uricosúrico, por ejemplo, probenecid, sulfipirazona y/o benzbromarona; (xiii) un secretagogo de la hormona de crecimiento; (xiv) factor de crecimiento transformante (TGFβ); (xv) factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); (xvi) factor de crecimiento de fibroblastos, por ejemplo, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF); (xvii) factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF); (xviii) crema de capsaicina; (xix) un antagonista del receptor de taquiquinina NK₁ y/o NK₃, tal como NKP-608C, SB-233412 (talnetant) y/o D-4418; (xx) un inhibidor de elastasa, por ejemplo, UT-77 y/o ZD-0892; (xxi) un inhibidor de la enzima convertidora de TNF-alfa (TACE); (xxii) inhibidor de óxido nítrico sintasa inducido (iNOS) o (xxiii) una molécula homóloga a receptor quimioatrayente expresada en células TH2 (tal como un antagonista de CRTH2); (xxiv) un inhibidor de un agente P38 (xxv) que modula la función de receptores del tipo toll (TLR) y (xxvi) un agente que modula la actividad de receptores purinérgicos, tales como P2X7; (xxvii) un inhibidor de la activación del factor de transcripción, tal como NFκB, API y/o STATS.

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

El miembro de unión también podría usarse en asociación con un agente quimioterapéutico u otro inhibidor de tirosina cinasas en co-administración o en forma de un inmunoconjugado. Los fragmentos de dicho anticuerpo también podrían usarse en anticuerpos biespecíficos obtenidos por mecanismos recombinantes o acoplamiento bioquímico y luego asociando la especificidad del anticuerpo anteriormente descrito con la especificidad de otros anticuerpos capaces de reconocer otras moléculas implicadas en la actividad a la que IL-6 está asociada.

Para el tratamiento de una enfermedad inflamatoria, un miembro de unión descrito en el presente documento puede combinarse con uno o más agentes, tales como agentes antiinflamatorios no esteroideos (en lo sucesivo AINE) que incluyen inhibidores no selectivos de la ciclo-oxigenasa (COX)-1 / COX-2 tanto si se aplican por vía tópica como sistémica, tales como piroxicam, diclofenaco, ácidos propiónicos, tales como naproxeno, flurbiprofeno, fenoprofeno, ketoprofeno y ibuprofeno, fenamatos, tales como ácido mefenámico, indometacina, sulindac, azapropazona, pirazolonas, tales como fenilbutazona, salicilatos, tales como aspirina); inhibidores selectivos de COX-2 (tales como meloxicam, celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, lumarocoxib, parecoxib y etoricoxib); donantes de óxido nítrico inhibidores de la ciclo-oxigenasa (CINOD); glucocorticosteroides (si se administran por vías tópica, oral, intramuscular, intravenosa o intrarticular); metotrexato, leflunomida; hidroxiclороquina, d-penicilamina, auranofina u otras preparaciones de oro parenterales u orales; analgésicos; diacereína; terapias intrarticulares, tales como derivados de ácido hialurónico; y suplementos nutricionales, tales como glucosamina.

Un miembro de unión descrito en el presente documento puede también usarse en combinación con un agente terapéutico existente para el tratamiento de cáncer. Agentes adecuados que van a usarse en combinación incluyen:

- (i) fármacos antiproliferativos/antineoplásicos y combinaciones de los mismos, como se usa en la oncología médica, tales como Gleevec (mesilato de imatinib), agentes alquilantes (por ejemplo, cis-platino, carboplatino, ciclofosfamida, mostaza de nitrógeno, melfalán, clorambucilo, busulfano y nitrosoureas); antimetabolitos (por ejemplo, antifolatos, tales como fluoropirimidinas como 5-fluorouracilo y tegafur, raltitrexed, metotrexato, arabinósido de citosina, hidroxiurea, gemcitabina y paclitaxel); antibióticos antitumorales (por ejemplo, antraciclinas como adriamicina, bleomicina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarubicina, mitomicina-C, dactinomicina y mitramicina); agentes antimetabólicos (por ejemplo, alcaloides de la vinca como vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina, y taxoides como taxol y taxotere); e inhibidores de la topoisomerasa (por ejemplo, epipodofilotoxinas como etopósido y tenipósido, amsacrina, topotecan y camptotecinas);
- (ii) agentes citostáticos tales como antiestrógenos (por ejemplo, tamoxifeno, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno y yodoxifeno), reguladores por disminución de receptores de estrógenos (por ejemplo, fulvestrant), antiandrógenos (por ejemplo, bicalutamida, flutamida, nilutamida y acetato de ciproterona), antagonistas de LHRH o agonistas de LHRH (por ejemplo, goserelina, leuprorelina y buserelina), progestógenos (por ejemplo, acetato de megestrol), inhibidores de aromatasa (por ejemplo, como anastrozol, letrozol, vorazol y exemestano) e inhibidores de 5 α -reductasa tales como finasterida;
- (iii) agentes que inhiben la invasión de células cancerosas (por ejemplo, inhibidores de la metaloproteínasa como marimastat e inhibidores de la función del activador-receptor de plasminógeno de urocinasa);
- (iv) inhibidores de la función del factor de crecimiento, por ejemplo, tales inhibidores incluyen anticuerpos para factores de crecimiento, anticuerpos para receptores de factores de crecimiento (por ejemplo, el anticuerpo anti-erbB2 trastuzumab y el anticuerpo anti-erbB1 cetuximab [C225]), inhibidores de la farnesil transferasa, inhibidores de tirosina cinasas e inhibidores de serina/treonina cinasas, por ejemplo, inhibidores de la familia del factor de crecimiento epidérmico (por ejemplo, inhibidores de tirosina cinasas de la familia de EGFR, tales como: N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metoxi-6-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (gefitinib, AZD1839), N-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metoxietoxi)quinazolin-4-amina (erlotinib, OSI-774) y 6-acrilamido-N-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3-morfolinopropoxi)quinazolin-4-amina (CI 1033)), por ejemplo, inhibidores de la familia de factores de crecimiento derivados de plaquetas y, por ejemplo, inhibidores de la familia de factores de crecimiento de hepatocitos;
- (v) agentes antiangiogénicos, tales como aquellos que inhiben los efectos del factor de crecimiento endotelial vascular (por ejemplo, el anticuerpo anti-factor de crecimiento celular endotelial vascular bevacizumab, compuestos, tales como los desvelados en las solicitudes de patente internacional WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 y WO 98/13354 y compuestos que funcionan por otros mecanismos (por ejemplo, linomida, inhibidores de la función de la integrina $\alpha\beta 3$ y angiostatina);
- (vi) agentes de lesión vascular tales como combretastatina A4 y los compuestos desvelado en las solicitudes de patente internacional WO 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 y WO 02/08213;
- (vii) terapias antisentido, por ejemplo, aquellas que están dirigidas a las dianas enumeradas anteriormente, tales como ISIS 2503, un antisentido anti-ras;
- (viii) enfoques de terapia génica, que incluyen, por ejemplo, enfoques para sustituir genes anómalos tales como enfoques de p53 anómalo o BRCA1 anómalo o BRCA2, GDEPT (terapia de enzima / pro-fármaco dirigida a gen) tales como aquellos usando citosina desaminasa, timidina cinasa o una enzima nitrorreductasa bacteriana y enfoques para aumentar la tolerancia del paciente a quimioterapia o radioterapia tal como terapia génica de resistencia a múltiples fármacos; y
- (ix) enfoques de inmunoterapia, que incluyen, por ejemplo, enfoques *ex vivo* e *in vivo* para aumentar la inmunogenicidad de las células tumorales del paciente, tales como transfección con citocinas tales como interleucina 2, interleucina 4 o factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos, enfoques para reducir la anergia de linfocitos T, enfoques usando células inmunitarias transfectadas tales como células dendríticas transfectadas con citocinas, enfoques usando líneas celulares tumorales transfectadas con citocinas y enfoques usando anticuerpos antiidiotípicos.

Puede usarse un miembro de unión descrito en el presente documento y uno o más de los componentes medicinales adicionales anteriores en la fabricación de un medicamento. El medicamento puede ser para la administración separada o combinada a un individuo y, por consiguiente, puede comprender el miembro de unión y el componente adicional como una preparación combinada o como preparaciones separadas. Pueden usarse preparaciones separadas para facilitar la administración separada y secuencial o simultánea, y permitir la administración de los componentes por diferentes vías, por ejemplo, administración oral y parenteral.

Según la presente invención, las composiciones proporcionadas pueden administrarse a mamíferos. La administración está normalmente en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo ésta suficiente para mostrar beneficio a un paciente. Tal beneficio puede ser al menos mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada, y la velocidad y transcurso de tiempo de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que está tratándose, el mamífero particular que está tratándose, el estado clínico del paciente individual, la causa del trastorno, el sitio de administración de la composición, el tipo de miembro de unión, el método de administración, el programa de administración y otros factores conocidos para los profesionales médicos. La prescripción de tratamiento, por ejemplo decisiones sobre la dosificación, etc., está dentro de la responsabilidad de médicos generales y otros doctores médicos y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o la progresión de una enfermedad que está tratándose. Dosis apropiadas de anticuerpo son muy conocidas en la materia [110, 111]. Pueden usarse dosificaciones específicas indicadas en el presente documento o en el Physician's Desk Reference (2003) como apropiadas para el tipo de medicamento que se administra. Una cantidad terapéuticamente eficaz o

dosis adecuada de un miembro de unión descrito en el presente documento puede determinarse comparando su actividad *in vitro* y actividad *in vivo* en un modelo animal. Se conocen métodos para la extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones y otros animales de prueba a seres humanos. La dosis precisa dependerá de varios factores, que incluyen si el anticuerpo es para diagnóstico, prevención o para el tratamiento, el tamaño y la localización del área que va a tratarse, la naturaleza precisa del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo completo, fragmento o diacuerpo) y la naturaleza de cualquier marca detectable u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis de anticuerpo típica estará en el intervalo 100 µg a 1 g para aplicaciones sistémicas, y 1 a 1 mg para aplicaciones tópicas. Puede administrarse una dosis de carga más alta inicial, seguida de una o más dosis más bajas. Normalmente, el anticuerpo será un anticuerpo completo, por ejemplo el isotipo IgG1. Esto es una dosis para un único tratamiento de un paciente adulto, que puede ajustarse proporcionalmente para niños y lactantes, y también ajustarse para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a intervalos diarios, dos veces a la semana, semanalmente o mensualmente, a criterio del médico. Los tratamientos pueden ser cada dos a cuatro semanas para administración subcutánea y cada cuatro a ocho semanas para administración intravenosa. El tratamiento puede ser periódico, y el periodo entre las administraciones es aproximadamente dos semanas o más, por ejemplo aproximadamente tres semanas o más, aproximadamente cuatro semanas o más, o aproximadamente una vez al mes. El tratamiento puede administrarse antes, y/o después de la cirugía, y/o puede administrarse o aplicarse directamente en el sitio anatómico de tratamiento quirúrgico.

Los miembros de unión de IL-6 descritos en el presente documento pueden ofrecer ventajas en términos de requisitos de dosificación y administración, en comparación con los anticuerpos para sIL-6Ra. Como se indica en cualquier parte en el presente documento, los niveles en circulación de IL-6 son significativamente más bajos que los niveles en circulación de sIL-6Ra en enfermedad. Por consiguiente, el uso de un miembro de unión de IL-6, a diferencia de un miembro de unión anti-IL-6R, tiene ventajas significativas porque la cantidad de fármaco que iba a fabricarse para cada dosis a pacientes puede ser más baja. Además, si la dosis de un terapéutico anti-IL-6 es más baja, puede haber ventajas significativas por que la dosis baja facilita inyecciones subcutáneas, además de inyecciones intravenosas (i.v.). Es bien conocido para aquellos expertos en la materia que la dosificación subcutánea puede limitarse por la cantidad de miembro de unión, por ejemplo molécula de anticuerpo, requerida por dosis. Esto es debido a que las inyecciones subcutáneas están limitadas por el volumen que puede ser inyectado en un sitio en la piel. Normalmente se utilizan volúmenes de inyección subcutánea de 1,2 ml o menos. Como cada vez puede ser más difícil formular un miembro de unión para inyección subcutánea a concentraciones superiores a 50 mg/ml, dosis por encima de 100 mg mediante esta vía normalmente requieren múltiples inyecciones y más molestia para el paciente.

Teniendo una dosis más baja, el terapéutico anti-IL-6 puede también requerir una dosis de "carga" más baja de anticuerpo para inhibir toda la IL-6 sistémica en comparación con el sIL-6Ra sistémico, ya que éste está a concentraciones mayores.

Beneficios adicionales pueden asociarse a dirigir IL-6 en vez del receptor de IL-6, representando ventajas adicionales de miembros de unión descritos en el presente documento en comparación con miembros de unión para IL-6Ra.

Por ejemplo, hay informes de bibliografía que muestran que los niveles en circulación de IL-6 son significativamente más bajos que los niveles en circulación de sIL-6Ra en enfermedad [112, 113]. A medida que los niveles de sIL-6R son significativamente más altos que los niveles de IL-6, puede requerirse más miembro de unión anti-sIL-6R para neutralizar el sIL-6Ra, en comparación con la cantidad de miembro de unión anti-IL-6 requerida para neutralizar IL-6. Por lo tanto, puede necesitarse una dosis más baja de un miembro de unión anti-ligando, en comparación con si se usara un miembro de unión anti-receptor.

El dirigirse al ligando de IL-6 en vez de al receptor de IL-6 puede reducir los niveles de IL-6 en enfermedad, pero todavía permitir que los niveles de IL-6 aumenten durante la infección, donde IL-6 está regulado por incremento como parte de la respuesta inmunitaria.

Kawano et al. [4] mostraron que la IL-6 era un factor de crecimiento potente y mostró que las células de mieloma recién aisladas de pacientes produjeron IL-6 y expresaron sus receptores. Además, el anticuerpo anti-IL-6 inhibe el crecimiento *in vitro* de células de mieloma. Esto es una evidencia directa de que un bucle autocrino está operando en la oncogénesis de mielomas humanos. Posterior a ese estudio, Van Zaanen et al. [5] demostraron que la producción de IL-6 en pacientes con mieloma múltiple disminuye cuando se trata con un anticuerpo anti-ligando de IL-6.

Varios estudios adicionales muestran que IL-6 participa en un bucle de retroalimentación autocrina en otros tipos de células, por ejemplo, células de músculo liso (SMC) [114], células de astroglioma U373-MG [115], adipocitos 3T3 [116], neuronas [117], células endoteliales [118] y células de sarcoma de Kaposi [119]. La inhibición de IL-6 usando un miembro de unión anti-IL6 en enfermedad puede, por tanto, conducir a una disminución en la producción de enfermedad basal de IL-6.

Además, los miembros de unión anti-IL-6 se unen a IL-6 en la circulación sistémica, a diferencia de los miembros de

unión al receptor de IL-6 que necesitan penetrar en el tejido con el fin de ocupar el receptor sobre la superficie de células implicadas en la patología de la enfermedad que va a tratarse.

- 5 Los miembros de unión a IL-6 pueden formar un equilibrio con IL-6 en la circulación sistémica, que tiene el efecto de causar gradientes a través de las barreras, por ejemplo, la membrana sinovial, que tiene el efecto neto de eliminar IL-6 activa de la articulación y formar un complejo inactivo con el miembro de unión. La consecuencia de esto es que un miembro de unión de IL-6 puede tener aparición más rápida y la pauta de dosificación puede ser diferente y posiblemente más fácil de optimizar, en comparación con un miembro de unión de IL-6R.
- 10 La señalización de IL-6 está mediada por la unión de IL-6 a IL-6R y ese complejo de unión a gp130. Dado que la unión de IL-6 y IL-6Ra es de afinidad nanomolar (aproximadamente 5 nM) y que el complejo IL6:IL6R y la unión de gp130 es de afinidad picomolar, un miembro de unión que se dirige a IL-6 se enfrenta a una cantidad más baja de competición para la unión de IL-6 y así puede suprimir una mayor proporción de señalización de IL-6. Aunque esto también puede aplicarse para un miembro de unión que se dirige a IL-6Ra soluble y que previene la formación de complejos IL-6:IL-6Ra, si el IL-6Ra está unido a la membrana, entonces debido a las limitaciones estéricas puede ser más difícil para un anti-IL-6Ra unirse e inhibir el IL-6Ra presentado sobre la membrana.
- 15

Ejemplos

20 Ejemplo 1. Aislamiento de guías

1.1 Selecciones

- 25 Se usaron bibliotecas de presentación en fagos de Fv de cadena única (scFv) humana intacta clonadas en un vector de fagémido basado en el fago filamentoso M13 para las selecciones [120, 121]. Se aislaron anticuerpos scFv específicos anti-IL-6 de las bibliotecas de presentación en fagos usando una serie de ciclos de selección en IL-6 humana recombinante esencialmente como se describe previamente por Vaughan et al [120] y Hawkins et al [122]. En resumen, para las selecciones por bio-inmunopurificación, se adsorbió IL-6 humana en PBS (PBS de Dulbecco, pH 7,4) sobre pocillos de una placa de microtítulo durante la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron con PBS, luego se bloquearon durante 1 h con PBS-Marvel (3 % en peso/volumen). Se añadió fago purificado en PBS-Marvel (3 % en peso/volumen) a los pocillos y se dejó que se uniera a antígeno recubierto durante 1 h. Se eliminó el fago sin unir por una serie de ciclos de lavado usando PBS-Tween (0,1 % en v/v) y PBS. Las partículas de fago unido se eluyeron, se infectaron en bacterias y se rescataron durante la siguiente ronda de selección [120].
- 30

35 1.2 Inhibición de la unión de IL-6 a receptor de IL-6 por scFv en bruto

- Se cultivaron un número representativo de clones individuales de la segunda ronda de selecciones en placas de 96 pocillos. Se expresaron scFv en el periplasma bacteriano y se cribaron para su actividad inhibidora en un ensayo de unión a IL-6 humana/receptor de IL-6 humana HTRF® (fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo, CIS Bio International). En este ensayo, las muestras compitieron por la unión a IL-6 humana marcada con criptato (R&D Systems), con IL-6R biotinilado (Peprotech). Se incluyó un mAb anti-IL-6 de referencia (Biosource AHC0562) en todos los ensayos de potencia como control positivo. El método de ensayo detallado se proporciona en la sección Materiales y métodos.
- 40

45 1.3 Reformado de scFv a IgG1

- Se convirtieron clones de scFv en formato de IgG subclonando los dominios VH y VL en vectores que expresan cadenas pesadas y ligeras de anticuerpo completo, respectivamente. El dominio VH se clonó en un vector (pEU15.1) que contenía los dominios constantes de la cadena pesada humana y elementos reguladores para expresar la cadena pesada de IgG completa en células de mamífero. Similarmente, el dominio VL se clonó en tanto el vector pEU3.4 para la expresión de la cadena ligera kappa humana como pEU4.4 para la expresión de los dominios constantes de la cadena ligera lambda humana, con elementos reguladores para expresar cadena ligera de IgG completa en células de mamífero. Los vectores para la expresión de cadenas pesadas y cadena ligeras se describieron originalmente en la ref. [123]. Se han manipulado vectores de Cambridge Antibody Technology simplemente introduciendo un elemento OriP. Para obtener IgG, las IgG de cadena pesada y ligera que expresan vectores se transfectaron en células de mamífero EBNA-HEK293. Las IgG se expresaron y se secretaron en el medio. Se reunieron las cosechas y se filtraron antes de la purificación. La IgG se purificó usando cromatografía de proteína A. Los sobrenadantes de cultivo se cargan sobre una columna de tamaño apropiado de Ceramic Protein A (BioSeptra) y se lavaron con Tris-HCl 50 mM a pH 8,0, NaCl 250 mM. La IgG unida se eluyó de la columna usando citrato de sodio 0,1 M (pH 3,0) y se neutralizó por la adición de Tris-HCl (pH 9,0). El material eluido se intercambió por tampón en PBS usando columnas Nap10 (Amersham, N.º 17-0854-02) y la concentración de IgG se determinó espectrofotométricamente usando un coeficiente de extinción basado en la secuencia de aminoácidos de la IgG [124]. Las IgG purificadas se analizaron para agregación o degradación usando SEC-HPLC y por SDS-PAGE.
- 50
- 55
- 60

65 1.4 Inhibición de la unión de IL-6 a receptor de IL-6 por scFv purificado e IgG

Se sometieron scFv, que mostraron un efecto inhibitor significativo sobre la interacción IL-6:IL-6R como extractos periplásmicos crudos, a secuenciación de ADN [120, 125]. Se expresaron scFv únicos otra vez en bacterias y se purificaron por cromatografía de afinidad (como se describe por Bannister et al [126]. También se prepararon muestras de IgG purificadas a partir de estos clones como se describe en la sección 1.3. Las potencias de estas muestras se determinaron por competencia de una serie de dilución de la preparación purificada contra sIL-6R biotinilado para unión a IL-6 humana marcada con HIS FLAG (en casa, derivada de *E. coli*).

Los resultados para el clon CAN022D10, como un scFv y como una IgG que tiene un dominio constante de la cadena pesada y de la cadena ligera kappa humano, se dan en la Tabla 1. Se proporcionan protocolos detallados en la sección Materiales y métodos.

Tabla 1: Potencia de scFv e IgG de CAN022D10 en el ensayo bioquímico HTRF de receptor-ligando

CLON	scFv de CI ₅₀ (nM)	IgG de CI ₅₀ (nM)
CAN022D10	45	0,31

1.5 Inhibición de la proliferación inducida por IL-6 de células TF-1 por scFv purificado e IgG

Se evaluó la potencia de neutralización de preparaciones de scFv purificado contra la bioactividad de IL-6 humana y de cinomolgo usando el ensayo de proliferación celular de TF-1. TF-1 es una línea celular premeioide humana establecida de un paciente con eritroleucemia [134]. La línea celular de TF-1 es dependiente de factor para la supervivencia y proliferación. Se mostró que las células TF-1 respondían a tanto IL-6 humana como de cinomolgo (en casa, derivada de *E. coli*) y se mantuvieron en medio que contenía GM-CSF humano (4 ng/ml, R&D Systems). Se determinó la inhibición de la proliferación dependiente de IL-6 midiendo la reducción en la incorporación de timidina tritiada en el ADN recién sintetizado de células en división. Una descripción detallada del protocolo se proporciona en la sección de Materiales y métodos.

Las preparaciones de scFv purificado de CAN022D10 fueron capaces de inhibir la proliferación inducida por IL-6 de las células TF-1 a la máxima concentración probada, aunque no se observó inhibición completa. Por tanto, no fue posible calcular datos de potencia de CI₅₀ precisos de los resultados obtenidos. Cuando se probaron como una IgG purificada, se calculó que la CI₅₀ para CAN022D10 era 93 nM.

1.6 Selectividad y reactividad cruzada de especies de anticuerpos en ensayos de competición por epítipo DELFIA®

Se estableció la reactividad cruzada de especies y la selectividad de anticuerpos por miembros de la familia de IL-6 usando los ensayos de competición por epítipo DELFIA®, midiendo la inhibición de unión de HIS FLAG IL-6 biotinilado (en casa, derivada de *E. coli*) a cada anticuerpo anti-IL-6 inmovilizado.

Se probaron valoraciones de factor inhibitor de leucemia (LIF) purificado (Chemicon), factor neurotrófico ciliar (CNTF), IL-11 y oncostatina M (todos de R & D Systems) en cada ensayo para establecer la potencia para cada proteína estructuralmente relacionada, como se mide por valores de CI₅₀ en el ensayo.

Se probaron valoraciones de especies de IL-6 que incluyen IL-6 de cinomolgo (en casa, derivada de *E. coli*), HIS FLAG IL-6 humana (en casa, derivada de HEK-EBNA), IL-6 de rata y murina (ambas de R & D Systems) en cada ensayo para establecer la reactividad cruzada de especies de los anticuerpos. Resultados de ejemplo de este experimento se proporcionan en la Tabla 2. Detalles del protocolo se proporcionan en la sección de Materiales y métodos.

Tabla 2: Potencias de proteínas relacionadas con IL-6 y especies de IL-6 diferentes en el ensayo de competición de CAN22D10

Proteína	CI ₅₀ (nM)
IL-6 humana	32*
IL-6 de cinomolgo	100*
IL-6 murina	Sin inhibición
IL-6 de rata	Sin inhibición
IL-11 humana	Sin inhibición
CNTF humano	Sin inhibición
LIF humano	Sin inhibición
Oncostatina M humana	Sin inhibición

*Los valores son aproximaciones ya que se obtuvieron curvas incompletas para las muestras

1.7 Inhibición de la liberación de VEGF inducida por IL-6 endógena de fibroblasto sinovial humano por IgG purificada

Se evaluaron las potencias de los anticuerpos para la inhibición de la liberación de VEGF inducida por IL-6 de fibroblastos sinoviales humanos explantados de donantes con artritis reumatoide. Se proporciona un protocolo detallado para este procedimiento en Materiales y métodos. En resumen, se añadieron valoraciones de la IgG de

prueba a fibroblastos cultivados, que entonces se estimularon por la adición de IL-1 β humana y IL-6R α humana soluble para inducir la expresión de IL-6 y permitir la señalización de las células para inducir la expresión de VEGF. Siguiendo una incubación de 48 h, se eliminaron los sobrenadantes y se probaron por ELISA para la expresión de VEGF usando un kit comercialmente disponible (R & D Systems). Estos datos se usaron para determinar CI₅₀ para CAN022D10, que se calculó que era 45 nM.

Ejemplo 2. Optimización de anticuerpos

2.1 Identificación de aminoácidos que pueden mejorar la unión del anticuerpo de guía a IL-6

Se llevó a cabo una estrategia para identificar restos clave en la secuencia de anticuerpo de origen que puede mejorar la unión a IL-6 introduciendo mutaciones al azar a través de toda la secuencia de scFv de CAN022D10. Esto se logró por dos rondas de mutagénesis usando un kit de mutagénesis al azar por PCR Diversify™ (BD biosciences), siguiendo las instrucciones del fabricante para incorporar en promedio 8,1 mutaciones por kilobase en la secuencia de ácidos nucleicos por ronda de mutagénesis. Las selecciones se realizaron esencialmente como se ha descrito previamente (Hanes et al 2000; Methods in Enzymology. 328. 404-430). En resumen, la biblioteca de mutagénesis al azar del clon de origen se transcribió en ARNm y, usando un proceso de traducción encallada, se formaron complejos de ARNm-ribosoma-scFv. Estos complejos se incubaron con bio-huIL-6, y aquellos que se unieron al antígeno se capturaron entonces sobre perlas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina. No se lavaron los complejos de ribosoma específicos, y se aisló ARNm de los complejos ribosómicos unidos, se transcribieron de forma inversa a ADNc y entonces se amplificaron por PCR. Este ADN se usó para la siguiente ronda de selección y/o se clonó por cribado. El proceso de selección se repitió en presencia de concentraciones decrecientes de bio-huIL-6 (100 nM a 0,1 nM durante 4 rondas). Se clonaron scFv aislados por presentación en ribosomas en el vector de fagémido pCANTAB6 por digestión con endonucleasa de restricción Nco1/Not1 (New England Biolabs) de la construcción de presentación en ribosomas, seguido de ligación en pCANTAB6 digerido con Nco1/Not1 usando T4 ADN ligasa (New England Biolabs) [127]. El ADN ligado se transformó entonces en células TG-1 químicamente competentes, y scFv en bruto de clones individuales compitieron contra IgG de CAN022D10 por la unión a IL-6 HIS/FLAG probada en un ensayo bioquímico de ligando-anticuerpo.

2.2 Identificación de clones mejorados usando un ensayo bioquímico de anticuerpo-ligando (usando IgG de CAN022D10)

Se cribaron preparaciones de scFv en bruto de un número representativo de clones individuales para las salidas de la ronda 3 y ronda 4 para su actividad inhibitoria en un ensayo de unión HTRF® IgG-IL-6 de CAN022D10. En este ensayo, se detectó la unión de anticuerpo biotinilado e IL-6 marcada con FLAG usando anticuerpo monoclonal anti-FLAG marcado con criptato y estreptavidina XL^{entl} (TM). El método de ensayo detallado se proporciona en la sección de Materiales y métodos.

Se secuenciaron scFv, que demostró un efecto inhibitor significativo y se produjeron como preparaciones purificadas como se describe en la sección 1.4. Entonces se calculó el valor de CI₅₀ para cada scFv a partir de los datos obtenidos por una serie de dilución de prueba de la muestra purificada en el ensayo bioquímico de anticuerpo-ligando HTRF y el ensayo de proliferación de TF-1. Los clones más potentes en el ensayo de proliferación de TF-1 se convirtieron en IgG con un dominio constante de la cadena pesada y dominio constante de la cadena ligera kappa, como se describe previamente, y se volvieron a probar en el ensayo de proliferación de TF-1. Los datos de potencia de ejemplo para tanto scFv purificado como IgG para cada muestra se proporcionan en la Tabla 3.

Tabla 3: Ejemplos de clones con potencias mejoradas en los ensayos bioquímicos de ligando-anticuerpo y de proliferación de TF-1, aislados de la biblioteca de mutagénesis al azar de CAN022D10 de presentación en ribosoma

Clon	CI ₅₀ (pM)			
	Ensayo bioquímico		Ensayo de proliferación de TF-1	
	scFv	IgG*	scFv	IgG
Anticuerpo 2	35	36	9600	16
Anticuerpo 3	22	43	7300	50
Anticuerpo 4	24	43	13400	61
Anticuerpo 5	65	26	12400	42

*El protocolo se modificó para la determinación de la potencia de IgG, así las potencias de scFv e IgG para cada clon no deben ser directamente comparadas. Para detalles de modificaciones, véase Materiales y métodos.

2.3 Optimización del clon de origen por mutagénesis dirigida

Se optimizaron anticuerpos de guía usando un enfoque de mutagénesis dirigida usando selecciones de presentación en fagos basadas en afinidad. Para el enfoque de mutagénesis dirigida, se crearon bibliotecas de fagos de scFv grandes derivadas de los clones de guía por mutagénesis dirigida a oligonucleótido de las regiones determinantes de la complementariedad 3 (CDR3) de la cadena pesada (VH) y ligera (VL) variables usando técnicas de biología

molecular estándar [128]. Las bibliotecas se sometieron a selecciones de presentación en fagos basadas en afinidad con el fin de seleccionar variantes con afinidad más alta por IL-6. En consecuencia, éstas deben mostrar una actividad inhibitoria mejorada por la unión de IL-6 a su receptor. Las selecciones se realizaron esencialmente como se describe previamente [129]. En resumen, se incubaron partículas de fago de scFv con IL-6 humana biotinilada recombinante en solución (bio-huLL-6, en casa, derivada de *E. coli* y modificada en casa). Entonces se capturaron fago de scFv unido a antígeno sobre perlas paramagnéticas recubiertas de estreptavidina (Dynabeads® M 280) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las partículas de fago de scFv seleccionadas se rescataron entonces como se describió previamente [125], y el proceso de selección se repitió en presencia de concentraciones decrecientes de bio-huLL-6 (50 nM a 0,1 nM durante 3 rondas).

Tras completarse 3 rondas de selección, se recombinaron las bibliotecas aleatorizadas de VH y VL para formar una única biblioteca en la que los clones contuvieron secuencias de VH y VL individualmente aleatorizadas emparejadas al azar. Entonces, las selecciones continuaron como se describe previamente en presencia de concentraciones decrecientes de bio-huLL-6 (0,1 nM a 0,1 pM durante otras 4 rondas).

2.4 Identificación de clones mejorados de la mutagénesis dirigida usando un ensayo bioquímico de anticuerpo-ligando (usando IgG de Anticuerpo 5)

Se probaron scFv en bruto de clones aislados de las salidas de selección de mutagénesis dirigida en un ensayo bioquímico de anticuerpo-ligando, esencialmente como se describe en la sección 2.2. Para estas salidas, el ensayo bioquímico se reconfiguró para usar IgG de Anticuerpo 5. Este anticuerpo es una variante mejorada en CAN02210 con mayor potencia en el ensayo de proliferación de TF-1. La incorporación de esta IgG más potente produjo que el ensayo fuera más capaz de distinguir entre los clones de potencia más alta. El protocolo para este ensayo modificado fue como se describió para el ensayo bioquímico de anticuerpo-ligando original usando CAN022D10, con los siguientes cambios. En primer lugar, la concentración de HIS FLAG IL-6 usada se redujo de 1 nM a 0,5 nM. En segundo lugar, las concentraciones del anticuerpo anti-IL-6 y estreptavidina XLent! (TM) aumentaron de 1 nM y 20 nM a 16 nM y 40 nM, respectivamente. Se secuenciaron scFv que demostraron un efecto inhibitor significativo y se produjeron como scFv purificado e IgG, luego se probaron en el ensayo de proliferación de TF-1.

2.5. Inhibición de la proliferación inducida por IL-6 de células TF-1 por scFv purificado e IgG de clones optimizados

Las potencias de los clones optimizados se determinaron usando el ensayo de proliferación de TF-1 inducida por IL-6 como se describe previamente. Los clones se probaron tanto como preparaciones de scFv purificado como IgG reformateado. Resultados de ejemplo para tanto scFv como IgG se dan en la Tabla 4.

Tabla 4: Potencias de ejemplo de clones identificados de las bibliotecas de mutagénesis dirigida cuando se prueban en el ensayo de proliferación celular de TF-1

Clon (no formadas en línea germinal)	CI ₅₀ (pM)	
	scFv	IgG
Anticuerpo 7	11	3
Anticuerpo 8	419	48
Anticuerpo 10	549	40
Anticuerpo 14	448	31
Anticuerpo 16	154	4,9
Anticuerpo 17	38	16
Anticuerpo 18	51	30
Anticuerpo 19	508	68
Anticuerpo 21	42	N.D.
Anticuerpo 22	41	N.D.
Anticuerpo 23	161	20
CNTO-328	N. D.	74
N.D. No determinado		

Los clones demostraron efecto inhibitor significativo, pero no pudieron determinarse valores de CI₅₀ precisos a partir de la serie de dilución de scFv purificado.

2.6. Formación en la línea germinal

Las secuencias de aminoácidos de los dominios VH y VL de los anticuerpos anti-IL-6 optimizados se alinearon con las secuencias de la línea germinal humana conocidas en la base de datos VBASE [130], y se identificó la línea germinal más próxima por similitud de secuencias. Para los dominios VH del linaje de anticuerpo CANDY022D10 el segmento v de la línea germinal más próxima fue Vh3_DP-86_(3-66) y el segmento j de la línea germinal más próxima fue JH2. Para los dominios VL el segmento v de la línea germinal más próxima fue Vk1_L12 y el segmento j de la línea germinal más próxima fue JK2.

Sin considerar los restos de Vernier [131], que se dejaron sin cambiar, hubo 3 cambios en las regiones estructurales de los dominios VH y 4 cambios en los dominios VL, todos los cuales se invirtieron a la secuencia de la línea germinal más próxima para coincidir de forma idéntica con anticuerpos humanos usando técnicas de mutagénesis dirigida al sitio estándar con los cebadores mutagénicos apropiados.

Se identificaron un total de 5 restos de Vernier en la secuencia de scFv de CAN022D10 que se mutaron de la línea germinal. Éstos estuvieron en la cadena pesada en los restos de Kabat 29 (I presente en lugar de V), 69 (M en lugar de I), 73 (I en lugar de N) y 78 (V en lugar de L). También se identificó una única mutación de Vernier en la secuencia de cadena ligera en el resto de Kabat 46 (V en lugar de L).

Entonces se volvieron a evaluar las IgG formadas en la línea germinal en el ensayo de proliferación de TF-1 inducida por IL-6 para confirmar que no había habido una reducción en potencia. Potencias de ejemplo para los anticuerpos formados en la línea germinal (GL) se proporcionan en la Tabla 5.

Tabla 5: Datos de potencia de ejemplo para los clones optimizados formados en la línea germinal cuando se evalúan en el ensayo de proliferación celular de TF-1 inducida por IL-6

Clon	CI ₅₀ (pM)
Anticuerpo 7 (GL)	5
Anticuerpo 10 (GL)	71
Anticuerpo 17 (GL)	1
Anticuerpo 18 (GL)	3
CNTO-328	101

2.7. Inhibición de la liberación de VEGF inducida por IL-6 endógena de fibroblasto sinovial humano por IgG optimizada

Se probaron IgG optimizadas en el ensayo de liberación de VEGF de fibroblasto sinovial para evaluar la potencia contra IL-6 endógenamente expresada. Este procedimiento se revisa en la sección 1.7 y se describe en detalle en la sección de Materiales y métodos. Potencias de ejemplo para las IgG probadas se dan en la Tabla 6a. Los datos de potencia media para las IgG probadas se dan en la Tabla 6b.

Tabla 6a: Datos de potencia de ejemplo para clones optimizados cuando se evalúan contra IL-6 endógena en el ensayo de liberación de VEGF de fibroblasto sinovial inducida por IL-6

Clon (GL = clones formados en la línea germinal)	CI ₅₀ (nM)
Anticuerpo 2	0,59
Anticuerpo 3	0,38
Anticuerpo 4	0,52
Anticuerpo 5	0,70
Anticuerpo 7 (GL)	0,75
Anticuerpo 10 (GL)	0,55
Anticuerpo 17 (GL)	0,57
Anticuerpo 18 (GL)	0,93
CNTO-328	1,31

Tabla 6b: Datos de potencia media para clones optimizados cuando se evalúan contra IL-6 endógena en el ensayo de liberación de VEGF de fibroblasto sinovial inducida por IL-6

Clon (GL = clones formados en la línea germinal)	CI ₅₀ (nM) (IC del 95 %)	n
Anticuerpo 7 (GL)	0,78 (0,54-1,11)	3
Anticuerpo 17 (GL)	0,57 (0,51-0,64)	3
Anticuerpo 18 (GL)	0,67 (0,20-2,25)	4
CNTO-328	1,02 (0,39-2,63)	4

2.8. Selectividad y reactividad cruzada de especies de anticuerpos optimizados en los ensayos de competición por epítipo DELFIA®

Se volvieron a evaluar la selectividad y la reactividad cruzada de especies para un panel de clones usando el ensayo de competición por epítipo DELFIA® como se describe previamente (véase la sección 1.6 y Materiales y métodos). IL-6 humana y de cinomolgo produjeron curvas de inhibición solapantes y, por tanto, valores de CI₅₀ ambiguos para todas las IgG probadas. No se observó inhibición para IL-6 murina, de rata o de perro, o cualquiera de las proteínas humanas relacionadas probadas contra el panel de anticuerpos. Estos datos demuestran que el panel de clones probados reaccionan de forma cruzada con IL-6 de cinomolgo, pero no se unen a IL-6 murina, de rata o de perro, o a las proteínas humanas más relacionadas con IL-6 humana.

2.9 Cálculo de datos de afinidad para clones optimizados usando BIAcore

Se determinó la afinidad de unión de muestras de IgG purificadas de anticuerpos 7 y 18 representativos para IL-6 humana y de cinomolgo por resonancia de plasmones superficiales usando un biosensor BIAcore 2000 (BIAcore AB) esencialmente como se describen en la ref. [132]. En resumen, se acoplaron anticuerpos purificados a la superficie de un chip sensor CM5 usando un kit de acoplamiento de amina (BIAcore) para proporcionar una densidad de superficie de entre 220-225 Ru. Se pasaron IL-6 humana y de cinomolgo a un intervalo de concentraciones entre 200 nM y 0,2 nM en tampón HBS-EP sobre la superficie del chip sensor. Los sensogramas resultantes se evaluaron usando el software de BIA evaluation 3.1 para proporcionar datos de unión relativos.

El límite inferior del intervalo de medición de afinidad del biosensor BIAcore 2000™ es aproximadamente 10 pM (manual del instrumento BIAcore 2000). De los datos obtenidos, la afinidad de los anticuerpos para tanto IL-6 humana como de cinomolgo estuvo por debajo de este límite de 10 pM, es decir, los anticuerpos fueron más potentes de lo que pudo medirse. Por tanto, no se calcularon mediciones de afinidad precisas. Se consideró que las afinidades de ambos anticuerpos por ambas especies de IL-6 usando este enfoque eran inferiores a 10 pM.

2.10 Cálculo de datos de afinidad por un clon optimizado usando el ensayo de proliferación celular de TF-1 in vitro

Se usó el ensayo de TF-1 para calcular la afinidad del Anticuerpo 18 por el uso de análisis de Schild. Se mezcló una curva patrón de IL-6 ($7,7 \times 10^{-15}$ M a 3×10^{-9} M) con un intervalo de concentraciones de IgG ($2,67 \times 10^{-13}$ M a $8,3 \times 10^{-10}$ M) por duplicado. Representando el log10 de la concentración de anticuerpo frente al log10 de la relación de dosis, se determinó la afinidad de la IgG. Usando este enfoque, se calculó que la afinidad del Anticuerpo 18 (GL) por IL-6 humana era 0,40 pM (IC del 95 % 0,12 pM - 0,69 pM, n=6).

2.11 Potencia antagonista en IL-6 recombinante humana usando proliferación celular de B8 mediada por IL-6 in vitro

Se evaluó la proliferación celular de B9 inducida por IL-6 en presencia del Anticuerpo 18 y un anticuerpo de control de isotipo. Se evaluaron los efectos de un intervalo de concentraciones de cada anticuerpo (1×10^{-13} M a 1×10^{-9} M) en una curva patrón de IL-6 (intervalo de concentración 1×10^{-19} M a 1×10^{-9} M). Se determinaron los puntos de datos por duplicado. Proliferación de B9 después de 4 días de incubación mediante reducción de azul de alamar (método de fluorescencia).

Se mostró que el Anticuerpo 18 inhibía la proliferación de B9 inducida por IL-6. El control de isotipo no tuvo efecto inhibitor. Los datos medios se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8: Valores de Kb medios para la inhibición de IL-6 induce proliferación de B9

	K_b media pM (IC del 95 %)	n
Anticuerpo 18 (GL)	0,3 (0,1 - 0,5)	6

2.12 Potencia antagonista en IL-6 recombinante humana usando liberación de IgM mediada por IL-6 de células SKW6.4 in vitro

IL-6 induce la secreción de IgM de la línea celular de linfoblastos B humanos SKW 6.4. Células SKW6.4 incubadas con un intervalo de concentraciones de IL-6 (1×10^{-13} M a $3 \times 10^{-8,5}$ M) dieron un promedio [A] 50 de 77 pM (n=3) en la secreción de IgM. Se evaluó el efecto de los Anticuerpos 7, 17 y 18 anti-IL-6 humana y un anticuerpo de control de isotipo sobre la secreción de IgM inducida por IL-6 observando la inhibición de diversas concentraciones de anticuerpo ($1 \times 10^{-12,5}$ M a 1×10^{-8} M) en presencia de IL-6 100 pM. Se determinó la secreción de IgM después de 4 días por ELISA de IgM anti-humana. Los puntos de datos fueron por duplicado.

Los Anticuerpos 7, 17 y 18 inhibieron la secreción de IgM inducida por IL-6. El control de isotipo no tuvo efecto inhibitor en estos ensayos. Los datos medios se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Inhibición media de la secreción de IgM de células SKW6.4

	CI₅₀ media pM	n
Anticuerpo 7 (GL)	2,64	3
Anticuerpo 17 (GL)	3,21	3
Anticuerpo 18 (GL)	2,63	3

Ejemplo 3. Mapeo de epítopes

3.1 Comparación del epítope de anticuerpo anti-IL-6 con anticuerpos anti-IL-6 humana conocidos

Se comparó el epítope de Anticuerpo 18 (GL) con los epítopes de dos anticuerpos anti-IL-6 humana B-E8 y cCLB8. Ambos de estos anticuerpos son conocidos por inhibir la unión de IL-6 a IL-6Ra y han sido investigados como posibles agentes terapéuticos [5, 31, 34, 37, 133]. Para permitir las comparaciones de los epítopes de los tres

anticuerpos, se construyó un panel de mutantes de IL-6 que cada uno contuvo una mutación de un único aminoácido en comparación con la secuencia no mutante (wt). La unión de estos mutantes a los diferentes anticuerpos se evaluó entonces en ensayos de competición bioquímica. Estos experimentos se basaron en el ensayo de competición bioquímico descrito en el Ejemplo 1.6, con cambios en las concentraciones de anticuerpos y variantes de IL-6, si se requiere. Brevemente, se recubrieron anticuerpos sobre la superficie de una placa de inmunoensayo de 96 pocillos Nunc Maxisorp a una concentración de tanto 2 nM (Anticuerpo 18) como 4 nM (B-E8 y cCLB8) en PBS y se incubaron durante la noche a 4 °C. Después de bloquearse la superficie de los pocillos usando 3 % (peso/volumen) de BSA en PBS, se añadieron diluciones de los inhibidores a un intervalo de concentración de 200 nM a 10 pM mezclados con IL-6 humana biotinilada a una concentración final de 0,15 nM a los pocillos recubiertos con anticuerpo y se dejó que se unieran. Se midió la unión de la IL-6 biotinilada a los anticuerpos usando estreptavidina marcada con europio.

Comparando los valores de CI_{50} obtenidos para los mutantes con IL-6 humana no mutante sin marcar, pudo establecerse una relación de potencia para cada mutante. Entonces, comparando estas relaciones a través de los diferentes anticuerpos, pudieron evaluarse los efectos de las mutaciones individuales sobre la unión del anticuerpo a la molécula de IL-6. Resultados típicos de estos experimentos se presentan en la Tabla 10, siendo los experimentos repetidos en 2 ocasiones adicionales.

Tabla 10: CI_{50} y relaciones de potencia de un panel de IL-6 mutantes contra los anticuerpos anti-IL-6 humana 18, B-E8 y cCLB8

Mutante	CI_{50} (M)			Relación de potencia		
	Anticuerpo 18	CNTO-328	B-E8	Anticuerpo 18	CNTO-328	B-E8
F102E	8,41E-08	2,80E-09	1,58E-08	310,951	3,021	57,246
F106E	1,43E-09	Sin inhibición	3,31E-09	5,283	-	11,989
Irrelevante	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	-	-	-
IL-6 wt	2,70E-10	9,26E-10	2,76E-10	1,000	1,000	1,000
R207E	Sin inhibición	5,13E-09	Sin inhibición	-	7,401	-
Q211A	3,07E-10	1,10E-07	8,51E-10	1,498	158,221	3,208
Irrelevante	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	-	-	-
IL-6 wt	2,05E-10	6,93E-10	2,65E-10	1,000	1,000	1,000
R58E	4,79E-10	1,73E-09	1,57E-08	2,009	1,682	79,083
S204E	2,57E-08	1,90E-09	4,83E-10	107,754	1,848	2,434
Irrelevante	Sin inhibición	Sin inhibición	Sin inhibición	-	-	-
IL-6 wt	2,39E-10	1,03E-09	1,98E-10	1,000	1,000	1,000
E200W	5,22E-10	2,68E-09	5,68E-10	2,130	3,817	2,287
R207L	1,31E-07	1,51E-09	9,41E-08	534,666	2,148	378,865
IL-6 wt	2,45E-10	7,02E-10	2,48E-10	1,000	1,000	1,000

La numeración de restos en la Tabla 10 es para la secuencia de aminoácidos de IL-6 humana de longitud completa (SEQ ID NO: 161).

Los resultados muestran que los tres anticuerpos tienen diferentes perfiles de unión contra el panel de mutantes de IL-6 y, por tanto, se unen a diferentes epítopes sobre la superficie de la citocina. Kalai et al (1997) observaron previamente que cCLB8 no reconoce el mutante de IL-6 F106E. Esto se ha confirmado en los experimentos de los presentes inventores, ya que no inhibe la unión de la IL-6 biotinilada al anticuerpo. A diferencia, el mutante de IL-6 F106E es solo 5 veces menos potente que IL-6 wt en el ensayo de competición usando el Anticuerpo 18, que indica que se une fuertemente a este anticuerpo. Se observó un resultado similar con Q211A mutante, donde la relación de potencia contra el Anticuerpo 18 era 1,5, en comparación con 158 para cCLB8. En cambio, los mutantes F102E, R207E, R207L y S204E fueron potentes inhibidores en el ensayo de cCLB8, pero se observó que eran considerablemente menos potentes que IL-6 wt en el ensayo del Anticuerpo 18.

Se observaron diferencias en la unión del Anticuerpo 18 y B-E8 con los mutantes R58E y S204E. La relación de potencia para R58E fue 2,009 para el Anticuerpo 18, en comparación con 79,083 para B-E8, que indica que esta mutación reduce la unión de B-E8 a IL-6. El efecto de la mutación S204E parece ser específico para el Anticuerpo 18 de los tres anticuerpos probados. Al igual que con cCLB8, esta mutación tiene poco impacto sobre la potencia de la unión de IL-6 a B-E8, sin embargo el mutante es más de 100 veces menos potente que la IL-6 no mutante en el ensayo bioquímico para el Anticuerpo 18.

Ejemplo 4. Administración de un anticuerpo anti-IL-6 *in vivo*

4.1 Efecto de la administración de un anticuerpo anti-IL-6 sobre el aumento de neutrófilos y haptoglobina inducido por IL-6 recombinante humana en ratones

Se sabe que la administración sistémica de IL-6 produce un aumento sistémico en neutrófilos y concentraciones de proteína de fase aguda. Se generó un modelo *in vivo* donde IL-6 humana se administró por inyección intraperitoneal

en ratones C57/B/6/J macho y se midieron concentraciones de neutrófilos y la proteína haptoglobina de fase aguda. Se midió la capacidad del Anticuerpo 18 (GL) administrado por inyección subcutánea para inhibir las respuestas.

4.2 Ensayo de haptoglobina

5 La inyección intraperitoneal de IL-6 humana (5,2 nmol/kg, equivalente a 12 mg/kg, b.i.d.) durante 7 días produjo un aumento significativo en los niveles de haptoglobina en plasma de $0,02 \pm 0,01$ mg/ml (controles de vehículo) a $1,19 \pm 0,27$ mg/ml en el grupo tratado con IL-6 (prueba de la t, $P < 0,01$). Mientras que el control de isotipo de IgG1 no tuvo efecto, el Anticuerpo 18 inhibió dependientemente de la dosis la respuesta con inhibición significativa (ANOVA, $P < 0,01$ frente a IL-6 sola), que se observó a la dosis de 10,6 nmol/kg (156 mg/kg) y por encima (Figura 1).

4.3 Ensayo de neutrófilos

15 La inyección intraperitoneal de IL-6 humana (5,2 nmol/kg, equivalente a 12 mg/kg, b.i.d.) durante 7 días produjo un aumento significativo en el recuento de neutrófilos de $1,1 \pm 0,44 \times 10^9$ células/l (controles de vehículo) a $2,47 \pm 0,12 \times 10^9$ células/l en el grupo tratado con IL-6 (prueba de la t, $P < 0,01$). Mientras que el control de isotipo de IgG1 no tuvo efecto, el Anticuerpo 18 inhibió dependientemente de la dosis la respuesta con inhibición significativa (ANOVA, $P < 0,01$ frente a IL-6 sola), que observó a la dosis de 1,5 nmol/kg (23 mg/kg) y por encima.

20 Estos resultados confirman la capacidad de un anticuerpo anti-IL-6 para inhibir los efectos sistémicos de IL-6 *in vivo*.

Materiales y métodos

Inhibición de la unión de IL-6 al receptor de IL-6 por scFv en bruto

25 Se cribaron salidas de selección en el formato de ensayo HTRF® de unión a receptor-ligando (fluorescencia homogénea resuelta en el tiempo) para la inhibición de tanto la unión de IL-6 humana marcada con criptato (R&D Systems 206-I) como IL-6 humana marcada con HIS FLAG (en casa, derivada de *E. coli*) a IL-6R biotinilado (Peprotech 200-06 R).

30 Se cribaron salidas durante el aislamiento de la guía como scFv en bruto sin diluir que contenía extractos periplásmicos preparados en: tampón HEPES 200 mM a pH7,4, EDTA 0,5 mM y sacarosa 0,5 M. Se pre-incubó IL-6R humana biotinilado 8 nM durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, con estreptavidina 8 nM XL^{entl} (TM) (CIS Bio International 611SAXLA). Todas las diluciones se hicieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía fluoruro de potasio 0,4 M y 0,1 % de BSA (tampón de ensayo).

Después de la pre-incubación de los reactivos, se añadieron 10 µl de muestra de scFv en bruto a una placa de ensayo de volumen bajo de 384 pocillos (Costar 3676). Esto fue seguido de la adición de 5 µl de mezcla de receptor biotinilado pre-incubado y estreptavidina XL^{entl} (TM), y entonces 5 µl de IL-6 humana marcada con criptato 11,2 nM.

40 Entonces se centrifugaron las placas de ensayo a 1000 rpm a temperatura ambiente durante 1 min, y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, antes de leer la fluorescencia resuelta en el tiempo a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placas EnVision (Perkin Elmer).

45 Inhibición de la unión de IL-6 a receptor de IL-6 por scFv purificado y IgG

Se probaron scFv purificado y IgG de clones positivos identificados de cribado en un ensayo HTRF® para la inhibición de la unión de IL-6 humana marcada con HIS FLAG a IL-6R biotinilado. Se pre-incubó IL-6R humano biotinilado 8 nM durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, con estreptavidina 8 nM XL^{entl} (TM). 50 Todas las diluciones se hicieron en solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía fluoruro de potasio 0,4 M y 0,1 % de BSA (tampón de ensayo).

Se usó una valoración de la muestra purificada con el fin de establecer la potencia del clon como se mide por valores de CI_{50} en el ensayo. Después de la pre-incubación de los reactivos, se añadieron 10 µl de valoración de muestra de scFv purificado a una placa de ensayo de volumen bajo de 384 pocillos (Costar 3676). Esto fue seguido de la adición de 5 µl de la mezcla de receptor biotinilado pre-incubado y estreptavidina XL^{entl} (TM). Se combinó IL-6 humana marcada con HIS FLAG 2 nM con IgG anti-flag 1,732 nM marcada con criptato (CIS Bio International 61FG2KLB) e inmediatamente se añadieron 5 µl de mezcla a la placa de ensayo.

60 Entonces, las placas de ensayo se centrifugaron a 1000 rpm a temperatura ambiente durante 1 min, y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, antes de leer la fluorescencia resuelta en el tiempo a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placas EnVision (Perkin Elmer).

Análisis de datos

65 Se usaron los siguientes métodos para analizar los datos de los ensayos HTRF® descritos anteriormente.

Los datos se analizaron calculando el % de valor de Delta F para cada muestra. Delta F se determinó según la Ecuación 1.

Ecuación 1:

$$\% \text{ de Delta F} = \frac{(\text{relación de valores de muestra a } 665 \text{ nm} / 620 \text{ nm}) - (\text{relación de valores de control no específico a } 665 \text{ nm} / 620 \text{ nm})}{(\text{relación de valores de control no específico a } 665 \text{ nm} / 620 \text{ nm})} \times 100$$

Los valores de % de Delta F se usaron posteriormente para calcular el % de unión específica como se describe en la Ecuación 2.

Ecuación 2:

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

Los valores de CI_{50} se determinaron usando el software GraphPad Prism por ajuste a la curva usando un ecuación logística de cuatro parámetros (Ecuación 3).

Ecuación 3:

$$Y = \text{Pie} + (\text{Cima} - \text{Pie}) / (1 + 10^{((\log CD50 - X) * \text{Pendiente})})$$

X es el logaritmo de la concentración. Y es unión específica
Y empieza en la Pie y llega hasta la Cima con una forma sigmoide.

Se incluyó un mAb anti-IL-6 de referencia (Biosource AHC0562) en todos los ensayos como control positivo.

Inhibición de la proliferación inducida por IL-6 de células TF-1 por scFv purificado y IgG

Las células cTF-1 fueron un regalo de R&D Systems y se mantuvieron según los protocolos suministrados. El medio de ensayo comprendió RPMI-1640 con GLUTAMAX I (Invitrogen) que contenía 5 % de suero bovino fetal (JRH) y 1 % de piruvato de sodio (Sigma). Antes de cada ensayo, se sedimentaron células TF-1 por centrifugación a 300xg durante 5 min, el medio se eliminó por aspiración y las células se resuspendieron en medio de ensayo. Este proceso se repitió dos veces con células resuspendidas a una concentración final de 5×10^5 células/ml en medio de ensayo. Las células se sembraron en placa usando 100 μ l/pocillo en una placa de ensayo de 96 pocillos. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO_2 para dejar morir la célula de GM-CSF. Se diluyeron soluciones de prueba de scFv purificado o IgG (por duplicado) a la concentración deseada en medio de ensayo. Se usó un anticuerpo irrelevante no dirigido a IL-6 como control negativo. Se añadió IL-6 humana bacterianamente derivada recombinante (R&D) y de cinomolgo (en casa) a una concentración final de tanto 20 pM (IL-6 humana) como 100 pM (cinomolgo) cuando se mezcló con anticuerpo de prueba apropiado en un volumen total de 100 μ l/pocillo. La concentración de IL-6 usada en el ensayo se seleccionó como la dosis que a la concentración de ensayo final dio aproximadamente el 80 % de respuesta proliferativa máxima. Todas las muestras se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente. Entonces se añadieron 100 μ l de mezcla de IL-6 y anticuerpo a 100 μ l de las células para dar un volumen de ensayo total de 200 μ l/pocillo. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO_2 . Entonces se añadieron 20 μ l de timidina tritiada (5 μ Ci/ml) a cada punto de ensayo y las placas se devolvieron a la estufa de incubación durante 24 horas adicionales. Las células se recogieron sobre placas filtrantes de fibra de vidrio (Perkin Elmer) usando un recolector de células. Se determinó la incorporación de timidina usando un contador de centelleo líquido de microplacas Packard TopCount Los datos se analizaron entonces usando el software Graphpad Prism.

Método de ensayo de la fluorescencia resuelta en el tiempo de la inhibición de la unión de IL-6 humana biotinilada a anticuerpos anti-IL-6 inmovilizados

El método específico usado para este ensayo y para el que los resultados se proporcionan en el Ejemplo 2.6 empleó reactivos DELFIA® y se explica anteriormente. El método también se describe más generalmente a continuación, y es adecuado como un ensayo para determinar y/o cuantificar la unión de otras formas de IL-6 y proteínas relacionadas con mAb anti-IL-6.

En este ensayo, el anticuerpo monoclonal anti-IL-6 se une a un soporte sólido, por ejemplo que se une al soporte mediante Fc. Pueden usarse placas de unión de alta proteína de poliestireno, por ejemplo placas Nunc Maxisorb, como soporte adecuado.

- Recubrir el mAb anti-IL-6 sobre placas a 50 μ l por pocillo en PBS, durante la noche a 4 °C.
- Todas las etapas posteriores se realizan a temperatura ambiente.

- Lavar las placas tres veces con PBS, que contiene 0,05 % de Tween20 (PBST, actualmente disponible de Sigma P1379), entonces bloquear con 300 μ l / pocillo de PBS que contiene 3 % (peso/volumen) de BSA (actualmente disponible de Roche Diagnostics, 70129138) durante 1 h.
- Lavar las placas tres veces con PBST.
- 5 - Preparar valoraciones de inhibidor en PBS que contiene 3 % (peso/volumen) de BSA y añadir a una placa de 'dilución' (40 μ l / pocillo) seguido de 40 μ l / pocillo de IL-6 biotinilada para dar una concentración final de IL-6 biotinilada equivalente a la KD para la proteína para el anticuerpo. Transferir 50 μ l de las muestras de la placa de dilución a los pocillos correspondientes en la placa de ensayo
- Incubar las placas durante 1 h.
- 10 - Lavar las placas tres veces con PBST, luego añadir a cada pocillo 50 μ l / pocillo de 0,1 μ g/ml de estreptavidina marcada con europio en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, que contiene 0,9 % de NaCl, 0,5 % de BSA purificada, 0,1 % de Tween20 y EDTA 20 μ M e incubar durante 1 h.
- Lavar las placas siete veces con un tampón de lavado que comprende solución salina tamponada con Tris 0,05 M (NaCl 0,138 M, KCl 0,0027 M), 0,05 % (v/v) de Tween20, pH 8,0 (a 25 °C)
- 15 - A cada pocillo, añadir 50 μ l de una solución potenciadora, acidificada con ácido acético y que contiene Triton X-100 junto con los quelantes β NTA y TOPO. El desplazamiento de pH resultante de álcali a ácido produce una rápida disociación de los iones europio del conjugado de estreptavidina. Los iones europio libres forman entonces quelatos fluorogénicos con los quelantes disponibles. Se elimina agua por la presencia de TOPO, permitiendo que los quelatos formen micelas, prolongando la fluorogenicidad del quelato.
- 20 - Incubar durante 5 min, entonces medir la fluorescencia resuelta en el tiempo a una longitud de onda de emisión de 620 nm. Los datos de fluorescencia se convierten en % de unión específica según la Ecuación 1. Determinar la unión total de los pocillos de control que contenían hUL-6 biotinilada, pero sin competidor. Determinar la unión no específica de los pocillos que contenían hUL-6 biotinilada y un exceso de 100 veces de hUL-6. Ajustar los datos resultantes a una curva sigmoide para el cálculo de valores de CI_{50} según la Ecuación 2.
- 25

Determinación del recubrimiento de anticuerpo y concentraciones de hUL-6 biotinilada para el ensayo de competición por epítipo bioquímico

30 La concentración de anticuerpo usada para el recubrimiento y la concentración de hUL-6 biotinilada usada en el ensayo de competición por epítipo dependerán de la afinidad de la interacción de los dos reactivos y la eficiencia de inmovilización de anticuerpo. Por tanto, debe determinarse una concentración estándar para el recubrimiento de anticuerpo y debe determinarse la concentración de hUL-6 biotinilada requerida para cada anticuerpo que va a probarse.

35 Como regla general, la concentración final de hUL-6 biotinilada usada en cada ensayo es equivalente a la KD del ligando para el anticuerpo correspondiente como se ha determinado por análisis de saturación. La concentración de anticuerpo usada para el recubrimiento debe ser tal que cuando la hUL-6 biotinilada se añada a KD se obtenga una relación mínima de señal con respecto a fondo de 10:1 cuando se detecta bajo las condiciones del ensayo de competición.

40

Selectividad y reactividad cruzada de especies de anticuerpos en los ensayos de competición por epítipo DELFIA®

45 Se adsorbieron IgG purificadas sobre placas de microtitulación Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) en PBS a una concentración que dio una señal significativa cuando se añadió IL-6 biotinilada humana a aproximadamente su Kd estimada para esa IgG particular. Se lavó el exceso de IgG con PBS-Tween (0,1 % v/v) y los pocillos se bloquearon con PBS-Marvel (3 % en peso/volumen) durante 1 h. Se preparó una serie de dilución de cada uno de los siguientes competidores en PBS, a partir de una concentración de aproximadamente 200 veces el valor de Kd de la interacción entre la IL-6 biotinilada humana y la IgG respectiva; IL-6 humana, IL-6 de cinomolgo, IL-6 de rata (R & D Systems 506-RL/CF), IL-6 murina (R & D Systems 406-ML/CF), CNTF humano (R & D Systems 257-NT/CF), LIF humano (Chemicon, LIF1010), IL-11 humana (R & D Systems 518-IL/CF), oncostatina M humana (R & D Systems 295-OM/CF). Se usó IL-6 humana sin biotinar como control positivo. A esta serie se añadió un volumen igual de IL-6 humana recombinante biotinilada a una concentración de aproximadamente 2 veces la Kd (produciendo una serie que empezaba a una relación de antígeno competidor:IL-6 biotinilada humana de aproximadamente 100:1). Estas mezclas se transfirieron entonces sobre la IgG bloqueada y se dejó que se equilibraran durante 1,5 h. El antígeno no unido se eliminó lavando con PBS-Tween (0,1 % v/v), mientras que la IL-6 biotinilada humana restante se detectó por conjugado de estreptavidina-europio³⁺ (detección DELFIA®, PerkinElmer). Se midió la fluorescencia resuelta en el tiempo a 620 nm en un lector de placas EnVision (PerkinElmer). Los datos de fluorescencia se convirtieron en % de unión específica (se determinó el 100 % a partir de los pocillos de control que contenían IL-6 biotinilada humana, pero sin competidor, 0 % era de pocillos que contenían IL-6 biotinilada humana y un exceso de 100 veces de IL-6 humana sin biotinar). Los datos resultantes se analizaron usando el software de ajuste de curvas Prism (Graphpad) para determinar los valores de CI_{50} según la Ecuación 3.

50

55

60

65 Método de ensayo de la fluorescencia resuelta en el tiempo de la inhibición de la unión de IL-6 humana biotinilada a anticuerpos anti-IL-6 inmovilizados

El método específico usado para este ensayo y para el que los resultados se proporcionan en el Ejemplo 2.8 empleó reactivos DELFIA® y se explica anteriormente. El método también se describe más generalmente a continuación, y es adecuado como un ensayo para determinar y/o cuantificar la unión de otras formas de IL-6 y proteínas relacionadas con mAb anti-IL-6.

5 En este ensayo, el anticuerpo monoclonal anti-IL-6 se une a un soporte sólido, por ejemplo que se une al soporte mediante Fc. Pueden usarse placas de unión de alta proteína de poliestireno, por ejemplo placas Nunc Maxisorb, como soporte adecuado.

10 - Recubrir el mAb anti-IL-6 sobre placas a 50 µl por pocillo en PBS, durante la noche a 4 °C.
 - Todas las etapas posteriores se realizan a temperatura ambiente.
 - Lavar las placas tres veces con PBS, que contiene 0,05 % de Tween20 (PBST, actualmente disponible de Sigma P1379), entonces bloquear con 300 µl / pocillo de PBS que contiene 3 % (peso/volumen) de BSA (actualmente disponible de Roche Diagnostics, 70129138) durante 1 h.

15 - Lavar las placas tres veces con PBST.
 - Preparar valoraciones de inhibidor en PBS que contiene 3 % (peso/volumen) de BSA y añadir a una placa de 'dilución' (40 µl / pocillo) seguido de 40 µl / pocillo de IL-6 biotinilada para dar una concentración final de IL-6 biotinilada equivalente a la KD para la proteína para el anticuerpo.

20 Transferir 50 µl de las muestras de la placa de dilución a los pocillos correspondientes en la placa de ensayo

- Incubar las placas durante 1 h.
 - Lavar las placas tres veces con PBST, luego añadir a cada pocillo 50 µl / pocillo de 0,1 µg/ml de estreptavidina marcada con europio en Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, que contiene 0,9 % de NaCl, 0,5 % de BSA purificada, 0,1 % de Tween20 y EDTA 20 µM e incubar durante 1 h.

25 - Lavar las placas siete veces con un tampón de lavado que comprende solución salina tamponada con Tris 0,05 M (NaCl 0,138 M, KCl 0,0027 M), 0,05 % (v/v) de Tween20, pH 8,0 (a 25 °C)

30 - A cada pocillo, añadir 50 µl de una solución potenciadora, acidificada con ácido acético y que contiene Triton X-100 junto con los quelantes βNTA y TOPO. El desplazamiento de pH resultante de álcali a ácido produce una rápida disociación de los iones europio del conjugado de estreptavidina. Los iones europio libres forman entonces quelatos fluorogénicos con los quelantes disponibles. Se elimina agua por la presencia de TOPO, permitiendo que los quelatos formen micelas, prolongando la fluorogenicidad del quelato.

- Incubar durante 5 min, entonces medir la fluorescencia resuelta en el tiempo a una longitud de onda de emisión de 620 nm. Los datos de fluorescencia se convierten en % de unión específica según la Ecuación 1.
 35 Determinar la unión total de los pocillos de control que contenían hUL-6 biotinilada, pero sin competidor. Determinar la unión no específica de los pocillos que contenían hUL-6 biotinilada y un exceso de 100 veces de hUL-6. Ajustar los datos resultantes a una curva sigmoide para el cálculo de valores de CI_{50} según la Ecuación 2.

40 Determinación del recubrimiento de anticuerpo y concentraciones de hUL-6 biotinilada para el ensayo de competición por epítoto bioquímico

La concentración de anticuerpo usada para el recubrimiento y la concentración de hUL-6 biotinilada usada en el ensayo de competición por epítoto dependerá de la afinidad de la interacción de los dos reactivos y la eficiencia de inmovilización de anticuerpo. Por tanto, debe determinarse una concentración estándar para el recubrimiento de anticuerpo y la concentración de hUL-6 biotinilada requerida debe determinarse para cada anticuerpo que va a probarse.

50 Como regla general, la concentración final de hUL-6 biotinilada usada en cada ensayo es equivalente a la KD del ligando para el anticuerpo correspondiente como se ha determinado por análisis de saturación. La concentración de anticuerpo usada para el recubrimiento debe ser tal que cuando la hUL-6 biotinilada se añada a KD se obtenga una relación mínima de señal con respecto a fondo de 10:1 cuando se detecta bajo las condiciones del ensayo de competición.

55 Identificación de clones mejorados usando un ensayo bioquímico de anticuerpo-ligando

Se cribaron salidas de selección de la optimización de guías en el formato de ensayo HTRF® de competición por epítoto para la inhibición de la unión de IL-6 humana marcada con HIS FLAG (en casa, derivada de *E. coli*) a anticuerpo anti-IL-6 biotinilada (en casa, IgG derivada de aislamiento de la guía, CAN022D10).

60 Las salidas durante la optimización de guías se cribaron como scFv en bruto sin diluir que contiene extractos periplásmicos preparados en tampón MOPS 50 nM a pH 7,4, EDTA 0,5 mM y sorbitol 0,5 M. Se pre-incubó HIS FLAG IL-6 humana 1 nM durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, con IgG anti-flag 1,732 nM marcada con criptato (CIS Bio International 61FG2KLB). Todas las diluciones se realizaron en tampón de ensayo.
 65 En paralelo, se pre-incubó de IgG anti-IL-6 biotinilada 1 nM (contra la que iba a probarse la competición de un miembro de unión de prueba) durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad con 20 nM de

estreptavidina XL^{entl} (TM) (CIS Bio International 611SAXLB).

Después de la pre-incubación de reactivos, se añadieron 10 µl de muestra de scFv en bruto a una OptiPlate de 384 pocillos negra (Perkin Elmer Cat N.º 6007279). Esto fue seguido de la adición de 10 µl de tampón de ensayo a la placa entera. Entonces se añadieron 10 µl de mezcla de IgG anti-IL-6 biotinilada pre-incubada y estreptavidina XL^{entl} (TM), y 10 µl de mezcla de IL-6 humana marcada con HIS FLAG pre-incubada y anti-flag - criptato.

Entonces se centrifugaron las placas de ensayo a 1000 rpm a temperatura ambiente durante 1 min, y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente, antes de leer la fluorescencia resuelta en el tiempo a longitudes de onda de emisión de 620 nm y 665 nm usando un lector de placas Envision (Perkin Elmer). Los datos se analizaron calculando el % de Delta F y el % de unión específica como se describe previamente.

Tras la identificación de guías mejoradas de la biblioteca de mutagénesis al azar, se cribaron salidas de scFv en bruto sin diluir de selecciones de mutagénesis dirigida a CDR3 en una versión modificada del ensayo HTRF® de competición por epítipo que incluyeron los siguientes cambios: se pre-incubó HIS FLAG-IL-6 humana 0,5 nM durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, con IgG anti-flag 1,732 nM marcada con criptato (CIS Bio International 61FG2KLB). En paralelo, se pre-incubó 16 nM de IgG anti-IL-6 biotinilada (Anticuerpo 5, en casa, IgG identificada de selecciones de mutagénesis al azar de CAN022D10) durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad con 40 nM de estreptavidina XL^{entl}(TM) (CIS Bio International 611SAXLB). Todas las otras condiciones fueron como se describen para el ensayo de competición por epítipo de CAN022D10. Los datos se analizaron calculando el % de Delta F y el % de unión específica como se describe previamente.

Inhibición de la liberación de VEGF inducida por IL-6 endógena de fibroblastos sinoviales humanos por IgG purificada

Se obtuvieron muestras de rodillas con artritis reumatoide de cirugía de artroplastia total en DMEM que contiene antibióticos. El sinovio bañado en medio se diseccionó de la articulación y se cortó finamente. El tejido sinovial se lavó con medio complementado con 10 % de FCS. La suspensión de células se incubó en una solución de colagenasa durante 2 horas en una estufa de incubación de CO₂ a 37 °C. La suspensión de células sinoviales digerida se rompió aspirando repetidamente a través de una pipeta de 10 ml, se filtró en un filtro de células y se centrifugó a 400 g a temperatura ambiente durante 5 minutos. Las células se resuspendieron en DMEM que contenía 10 % de FCS, se pasaron a través de un filtro de células, se ajustaron a 1 x 10⁶ células por ml y se incubaron en una estufa de incubación de CO₂ a 37 °C en matraces de cultivo celular de 225 cm² (3001, CoStar Corning Inc.). Siguiendo la adherencia, se desechó la mayoría del medio, se sustituyó con nuevo y se devolvió a la estufa de incubación para la incubación a plazo largo. Las células se examinaron semanalmente y se sometieron a pases a confluencia por tripsinización a una velocidad de pases de 1 en 3.

Se eliminaron los fibroblastos (P3-5) en la confluencia de matraces incubando con 10 ml de solución al 0,1 % de tripsina-EDTA (25300-054, Gibco Life Sciences) por matraz durante 5 a 10 minutos a 37 °C. Se añadió un volumen igual de medio de cultivo basado en DMEM complementado con 10 % de FCS a las células, que entonces se sedimentaron por centrifugación a 330 g durante 5 minutos a TA. Después de una etapa de lavado con medio de cultivo basado en DMEM complementado con 10 % de FCS, se añadió la suspensión de células (1 x 10⁵ células por ml) (150 µl por pocillo) a pocillos de placas de poliestireno de fondo plano de agrupación de cultivo celular de 96 pocillos estériles (3598, Corning CoStar) a 1,5 x 10⁴ células por pocillo. Se añadió otra adición de medio de cultivo basado en DMEM complementado con 10 % de FCS a cada pocillo (100 µl por pocillo) para dar un volumen total de 250 µl por pocillo. Las células se incubaron a 37 °C durante la noche para permitir la adherencia y quiescencia.

Se inspeccionaron las placas de 96 pocillos para garantizar que las células fueran confluentes y estuvieran en buena condición (por ejemplo, libres de contaminación). Entonces se aspiró el medio de los pocillos y se añadieron inmediatamente 100 µl de medio de cultivo basado en DMEM complementado con 10 % de FCS. A éste se añadieron 50 µl de medio de cultivo basado con DMEM complementado con 10 % de FCS que contenía tanto IgG de muestra como medio solo a los pocillos (diluido 1 en 5 en ensayo).

Esto fue seguido de añadir 50 µl por pocillo de medio de cultivo basado con DMEM complementado con 10 % de FCS que contenía (rhs)IL-6Rα soluble humano recombinante (500 ng por ml; 12 nM) y rhIL-1β (50 pg por ml; 2,95 pM, diluido 1 en 5 en ensayo).

En pocillos separados, se añadieron 50 µl de medio de cultivo basado con DMEM complementado con 10 % de FCS que contenía tanto rh-IL-6 (0, 100 ng por ml; 21,5 nM), sIL-6Rα (500 ng por ml; 12 nM), rhIL-1β (50 pg por ml; 2,95 pM) como medio solo (diluido 1 en 5 en ensayo). El volumen final en cada pocillo fue 250 µl.

Las placas se incubaron durante 48 horas a 37 °C. Las incubaciones se realizaron por pocillos duplicados o triplicados como se describe en el formato de placa. Las placas se centrifugaron a 330 g durante 5 minutos a TA y se eliminó el medio de sobrenadante y se guardó a -40 °C en placas de fondo plano de microtitulo (611F96, Sterilin).

Se midió VEGF usando un ELISA (DY293B, R&D Systems) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente,

se recubrieron placas de ELISA con un anticuerpo anti-VEGF humano de ratón durante la noche a 4 °C y se bloquearon con 1 % de BSA/PBS. Las placas se lavaron con 0,05 % de Tween 20/PBS y se incubaron con sobrenadantes de cultivo de fibroblastos derivados de sinovio humano y un anticuerpo anti-VEGF humano de cabra biotinilado durante la noche a temperatura ambiente. Después de lavar, se detectó VEGF usando estreptavidina-peroxidasa de rábano picante. Las placas se desarrollaron usando 1:1 de H₂O₂:tetrametilbencidina. La reacción se detuvo con H₂SO₄ 2 M, y se determinaron densidades ópticas a 450 nm con la longitud de onda de corrección establecida a 540 nm.

Mediciones de BIAcore

Se realizaron estudios BIAcore usando BIAcore 2000™. Se acoplaron anticuerpos a la superficie de un chip sensor CM-5 usando un kit de acoplamiento de amina para proporcionar una densidad de superficie de 220-225 Ru. Se pasó IL-6 humana a un intervalo de concentraciones entre 200 nM y 0,2 nM en tampón HBS-EP sobre la superficie del chip sensor. Los sensogramas resultantes se evaluaron usando el software BIA Evaluation 3.1 para calcular los valores de K_{as} , K_{dis} y K_D para los anticuerpos probados.

Ensayo de proliferación celular de B9 mediada por IL-6

Las células B9 son un sub-clon de la línea celular de hibridomas de linfocitos B murina, B13.29, seleccionada basándose en su respuesta específica a IL-6. Células B9 requieren IL-6 para la supervivencia y proliferación y responden a concentraciones muy bajas de IL-6.

Se evaluó la proliferación celular de B9 inducida por IL-6 en presencia del Anticuerpo 18 y un control de isotipo (CAT-002). Se evaluaron los efectos de un intervalo de concentraciones de cada anticuerpo (1×10^{-13} M a 1×10^{-9} M) en una curva patrón de IL-6 (intervalo de concentración 1×10^{-14} M a 1×10^{-9} M). Los puntos de datos fueron por duplicado. La proliferación de B9 se determinó después de 4 días de incubación mediante reducción de azul de alamar (método de fluorescencia).

Se cultivaron células B9 en RPMI-1640 que contenía 5 % de FCS, L-glutamina 2 mM y 2-mercaptoetanol 50 μ M. Las células se dividieron cada 2 a 4 días a una densidad de entre $0,05 \times 10^6$ ml⁻¹ y $0,1 \times 10^6$ ml⁻¹ y se complementaron con IL-6 humana 5×10^{-13} M. Las células usadas para los experimentos no se complementaron con IL-6 durante al menos 48 horas antes del experimento, pero se habían complementado en el plazo de 96 horas del experimento. Las células usadas en el ensayo se tomaron de un matraz de solución madre con una densidad de no superior a $0,8 \times 10^6$ ml⁻¹.

Cada anticuerpo se diluyó de soluciones madre a 10x la máxima concentración de ensayo requerida por diluciones apropiadas en medio de ensayo (RPMI + 5 % de FCS, L-glutamina 2 mM, 2-mercaptoetanol 50 μ M, penicilina 100 Uml⁻¹ y estreptomina 100 mgml⁻¹). Se llevaron a cabo diluciones de 10 veces adicionales en medios de cultivo para obtener la concentración requerida de cada anticuerpo.

Se reconstituyó IL-6 de un polvo liofilizado a una solución 1×10^{-5} M por adición de un volumen apropiado de PBS estéril + 0,1 % de BSA. Se llevó a cabo otra dilución a 1×10^{-8} M en medio de cultivo. Se almacenaron alícuotas de 1×10^{-8} M congeladas hasta que se requirieron. El día de ensayo se diluyeron alícuotas 1×10^{-8} M según fuera necesario para lograr el intervalo de soluciones a 10x la concentración de ensayo final requerida.

Se extrajo el volumen requerido de células de matraces de cultivo y se centrifugó a 300 g durante 8 minutos. Se eliminaron los sobrenadantes y las células se resuspendieron en un volumen apropiado de medio de cultivo para lograr una densidad celular de $0,5 \times 10^6$ ml⁻¹.

Se realizaron ensayos en placas de 96 pocillos de poliestireno de fondo plano tratadas de cultivo de tejido. El volumen de ensayo final fue 200 μ l. Se añadieron 20 μ l de 10x de solución de anticuerpo (Anticuerpo 18 o CAT-002) o medio de cultivo a los pocillos apropiados de cada placa seguido de otros 140 μ l de medio de cultivo y 20 μ l de la concentración apropiada de IL-6 o medio de cultivo.

Se dispusieron placas en una estufa de incubación a 37 °C de 5 % de CO₂ humidificada durante 2 horas. Entonces se añadieron 20 μ l de células a cada pocillo. El número de células final por pocillo fue 10000. Entonces, las placas se devolvieron a la estufa de incubación durante 4 días. Se evaluó la proliferación celular por incorporación de azul de alamar. Se añadió 10 % en v/v de azul de alamar a cada pocillo y las placas se devolvieron a la estufa de incubación durante 6 horas. Entonces, las placas se leyeron en un espectrofluorímetro que medía la fluorescencia a 590 nm tras la excitación a 544 nm. Los datos sin procesar se normalizaron a la curva de IL-6 de control sobre cada placa de forma que la fluorescencia máxima se definió como el 100 % y la fluorescencia basal el 0 %. Se ajustaron los datos normalizados usando el programa de ajuste dosis-respuesta sigmoide de regresión no lineal (pendiente variable) en Graph Pad Prism 4.01. Se usaron valores de pCE₅₀ de control y valores de pCE₅₀ en presencia de cada concentración de anticuerpo para determinar las relaciones de dosis (DR). Los valores de K_b se determinaron para la concentración más baja de anticuerpo que provocó un desplazamiento de 3 veces o mayor en la curva de concentración-efecto de IL-6 usando la siguiente ecuación de antagonismo químico:

$$K_b = ([Ab] / (DR-1))$$

(Kenakin TP. en: Pharmacologic Analysis of Drug-Receptor Interactions. 1st ed. New York: Raven Press; 1987. p. 205-24)

- 5 Ensayo de liberación de IgM de células SKW6.4 mediada por IL-6
- IL-6 participa en la maduración final de linfocitos B en células productoras de anticuerpo (diferenciación de linfocitos B). Previamente se han usado células SKW para el estudio de respuestas de linfocitos B (Nawata et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 557:230-238. 1989). La producción de auto-anticuerpos en artritis reumatoide es principalmente de la clase IgM. SKW6.4 es una línea de linfocitos B linfoblastoide humana que secreta IgM clónica. Las células se obtuvieron de ATCC, referencia N.º TIB 215. Tras la estimulación con IL-6, estas células secretan IgM, así se percibió que este ensayo era relevante para artritis reumatoide.
- 10 Se evaluó la secreción de IgM de células SKW6.4 inducida por IL-6 en presencia de CAT6001 y CAT-002 (control de isotipo). Se evaluaron los efectos de un intervalo de concentraciones de cada anticuerpo ($1 \times 10^{-12.5}$ M a 1×10^{-8} M) en presencia de IL-6 100 pM. Los puntos de datos fueron por duplicado. Se determinó la secreción de IgM en los sobrenadantes de células después de 4 días de incubación usando ensayo de ELISA anti-IgM humana.
- 15 Se cultivaron células SKW 6.4 en RPMI1640 que contenía L-glutamina 2 mM y 10 % (v/v) de suero de ternero fetal a 37 °C a 95/5 % (v/v) de aire/CO₂ en 95 % de humedad relativa. Las células se mantuvieron entre 0,4 y 2×10^6 células/ml. Para el realizar el pase de células rutinario, las células se recogieron por centrifugación a 300xg durante 5 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el medio gastado y las células se resuspendieron en el volumen requerido de medio fresco.
- 20 Cada anticuerpo se diluyó de soluciones madre a 50x la máxima concentración de ensayo requerida por diluciones apropiadas en medio de ensayo (RPMI + 10 % de FCS, L-glutamina 2 mM). Se llevaron a cabo diluciones de 10 veces adicionales en medio de cultivo para obtener la concentración requerida de cada anticuerpo.
- 25 Los ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos de poliestireno tratadas de cultivo de tejido de fondo plano. Se diluyeron soluciones madre de células SKW6.4 a una densidad celular de $0,3 \times 10^6$ ml⁻¹ en medio fresco, y se sembraron a 100 µl/pocillo (30.000 células por pocillo). Entonces se añadieron 2 µl de anticuerpo, a la concentración final indicada, seguido de 2 µl de IL-6 a una concentración final de 100 pM a cada pocillo.
- 30 Entonces, las placas se devolvieron a la estufa de incubación a 37 °C, 5 % de CO₂. Se recogieron sobrenadantes libres de células después de 4 días de incubación por centrifugación y entonces tanto se ensayaron por ELISA de IgM en el día de la recogida como se congelaron a -20 °C antes del análisis adicional.
- 35 Se generó un ELISA usando un par de anticuerpos de Serotec. El anticuerpo de recubrimiento fue anti-IgM humana de ratón (MCA1662) y el anticuerpo de detección fue anti-IgM humana de cabra: HRP unida (STAR98P). El ensayo se optimizó por métodos convencionales para dar una buena relación de señal con respecto a ruido usando anticuerpo de recubrimiento a 1:2000 de dilución (5 µg/ml) y anticuerpo de detección a 1:3500 de dilución (200 ng/ml).
- 40 Se compró solución patrón de IgM (Cat. N.º PHP003, proteína purificada Human M Kappa) de Serotec para generar una curva patrón.
- 45 Los datos se analizaron usando un ajuste polinómico para los datos de curva patrón de IgM usando un programa de ajuste estándar. Se calculó el porcentaje de inhibición de cada muestra de anticuerpo contra la producción de IgM de control en ausencia de anticuerpo y se generaron valores de CI₅₀.

Generación de proteínas mutantes de IL-6 y IL-6 para el mapeo de epítopes

Clonación de ADNc de IL-6 humana y de cino

- 55 Se obtuvieron las secuencias de IL-6 humana y de macaco de Embl (N.º de acceso: BC015511 y AB000554 para human y cino, respectivamente). Usando estas secuencias se diseñaron cebadores de oligonucleótidos para amplificar el ADNc que codifica IL-6 humana y de macaco. Los cebadores del extremo N fueron hIL6_5'Ndel y maclL6_5'Ndel para humano y cino, respectivamente, y se usó maclL6_3'NheI como el cebador del extremo C para ambos (véase la Tabla 11 para secuencias de oligonucleótidos).
- 60

Tabla 11: Secuencias de cebadores

Cebador	Secuencia
maclL6_5'Ndel	5' TTATCAT-ATGGTACTCCCAGGAGAAGATTCCAA 3' (SEQ ID NO: 183)
maclL6_3'NheI	5' TTATGCTAGC-CTACATTTGCCGAAGAGCCC 3' (SEQ ID NO: 184)

Cebador	Secuencia
hIL6_5'NdeI	5' TTATACATATG-GTACCCCCAGGAGAAGATTCC 3' (SEQ ID NO: 185)

Se llevaron a cabo reacciones de PCVR para amplificar los dos ADNc. El molde para cada reacción de PCR fue 10 ng de ADNc obtenido de hígado humano e hígado de cinomolgo, respectivamente. El ADNc amplificado de cada reacción se purificó y clonó en pCR4blunt topo (Invitrogen) usando la reacción de ligación de topoisomerasa según el fabricante.

Se identificaron y secuenciaron clones positivos. Los ADNc resultantes se sub-clonaron usando técnicas convencionales en diversos vectores de expresión del promotor T7 de *E. coli* de tal forma que el ADNc que codificara IL-6 humana o de cinomolgo madura se fusionara en el extremo N con cualquier marca HIS6-FLAG del extremo N inmediatamente en la dirección 5' de la valina del extremo N de IL-6 madura.

Generación de mutantes

Se realizó mutagénesis dirigida al sitio usando un kit Quikchange XL de Stratagene según el protocolo del fabricante. Se realizó el diseño de cebadores de mutagénesis según el protocolo del fabricante. Se llevaron a cabo reacciones de mutagénesis según el protocolo usando el plásmido pT7flagHISIL-6 como molde. Esto fue seguido de posterior digestión con DpnI y transformación en células Top10 químicamente competentes con selección en placas de agar que contienen antibióticos apropiados a 37 °C durante la noche. Para cada reacción de mutagénesis individual se secuenciaron varios clones y se retuvo el ADN de plásmido de un clon correcto de cada reacción para uso adicional.

Expresión de proteínas IL-6 y mutantes de IL-6

Se transformaron los plásmidos de expresión de IL-6 en células en estrella BL21 químicamente competentes (DE3) (Invitrogen) usando el método del fabricante. Las células transformadas se usaron para inocular cultivos de 1 l de caldo Terrific y éstas se incubaron en una estufa de incubación orbital a 37 °C, hasta que la A600 alcanzó 0,5. Entonces se añadió IPTG a 0,25 mM y la incubación continuó durante la noche a 22 °C. Las células se recogieron por centrifugación y los sedimentos de células se almacenaron a -80 °C.

Purificación de proteínas IL-6 y mutantes de IL-6

Los sedimentos de células se descongelaron y se resuspendieron en 50 ml por sedimento de fosfato de potasio 50 mM, pH 7,4, imidazol 10 mM, NaCl 0,3 M, beta-mercaptoetanol 5 mM, 10 % de glicerol (tampón A) + inhibidores de la proteasa libres de EDTA completos (Roche). Las células se lisaron por sonicación durante 3 x 30 segundos sobre hielo. El lisado se centrifugó a 100.000 g y 4 °C durante 30 minutos y el sobrenadante se sometió a cromatografía de afinidad por Ni-NTA. Se equilibró una columna de 5 ml de Ni-NTA Superflow (Qiagen) a 3 ml/min con (tampón A). Se cargó la muestra de IL-6 y la columna se lavó con 10 volúmenes de columna de imidazol 15 mM en tampón A. Esto fue seguido de un lavado de 10 volúmenes de columna con imidazol 30 mM en tampón A. Se eluyó IL-6 de la columna usando un lavado de 5 volúmenes de columna en la dirección de flujo ascendente con imidazol 0,3 M en tampón A. Se recogieron fracciones de 10 ml durante las etapas de lavado y se recogieron fracciones de 5 ml durante la etapa de elución. La columna se ejecutó a 4 °C usando AKTA Explorer100 Air. Se reunieron las fracciones que contenían la proteína IL-6 purificada y se dializaron durante la noche a 4 °C contra 5 l de PBS.

Se purificaron además las proteínas IL-6 dializadas usando cromatografía de filtración en gel. Para cada purificación la proteína IL-6 dializada se centrifugó a 100.000 g y 4 °C durante 20 minutos. Se aplicaron hasta 13 ml a una columna de 318 ml Superdex 200 26/60 (GE Healthcare) que se había equilibrado en PBS a 2,5 ml/min. La columna se ejecutó a 4 °C usando un purificador AKTA. Las fracciones que contenían el pico de proteína de IL-6 monomérica se reunieron para análisis adicional.

Cada proteína se comprobó para pureza usando SDS-cromatografía estándar, se midió la concentración de proteína y se usó espectroscopía de masas Q-ToF para medir la masa de la proteína. Se congeló IL-6 purificada en nitrógeno líquido y se guardó a -80 °C.

Materiales y métodos para estudios in vivo

Se asignaron aleatoriamente animales a grupos de prueba. Entonces, los ratones en cada grupo de prueba se trataron diariamente con dosis subcutáneas establecidas (10 ml/kg) de tanto control de vehículo (0,05 % de BSA en PBS) como 467 µg/kg de control de isotipo IgG1 o anticuerpo 18 (intervalo de 467 µg/kg a 8 µg/kg). Al mismo tiempo, los ratones se administraron con una inyección intraperitoneal (10 ml/kg) b.i.d. de tanto control de vehículo (0,05 % de BSA en PBS) como 12 µg/kg de IL-6 recombinante humana.

En el día 7, dos horas tras la dosis de IL-6 final a 09:00 h, los ratones se sacrificaron y se tomaron muestras de sangre terminal. La sangre se transfirió a tubos de sangre con EDTA de 1 ml Lab Tek, que se colocaron en un agitador de rodillos durante 5 minutos. Entonces, las muestras se mantuvieron sobre hielo hasta que se usaron. Se realizaron cifras de células diferenciales usando un contador de células Sysmex. El resto de la muestra se transfirió

a un tubo de Eppendorf y se centrifugó (300 g, 5 min) para obtener plasma que se subdividió en alícuotas y se guardó a -20 °C hasta que se analizó para niveles de haptoglobina.

El ensayo de haptoglobina se llevó a cabo según las instrucciones proporcionadas en el kit PHASE™ RANGE TriDelta Format por Biognosis (Hailsham, RU; cat. N.º TP-801).

Todos los resultados se expresaron como media \pm EEM. El análisis de datos era por prueba de la t para datos independientes o ANOVA unilateral seguido de la prueba de Dunnett (GraphPad Instat).

10 Secuencias

Se muestran las secuencias del dominio VH, dominio VL y de CDR de miembros de unión en el listado de secuencias adjunto, en el que SEQ ID NOS se corresponden del siguiente modo:

1	nucleótido de VH de CAN022D10	31	nucleótido de VH de Anticuerpo 4
2	aminoácido de VH de CAN022D10	32	aminoácido de VH de Ab 4
3	CDR 1 aa de VH de CAN022D10	33	aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 4
4	CDR 2 aa de VH de CAN022D10	34	aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 4
5	CDR 3 aa de VH de CAN022D10	35	aminoácido de CDR 3 de VH de Ab 4
6	nucleótido de VL de CAN022D10	36	nucleótido de VL de Ab 4
7	aminoácido de VL de CAN022D10	37	aminoácido de VL de Ab 4
8	CDR 1 aa de VL de CAN022D10	38	aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 4
9	CDR 2 aa de VL de CAN022D10	39	aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 4
10	CDR 3 aa de VL de CAN022D10	40	aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 4
11	nucleótido de VH de Anticuerpo 2	41	nucleótido de VH de Anticuerpo 5
12	aminoácido de VH de Ab 2	42	aminoácido de VH de Ab 5
13	aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 2	43	aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 5
14	aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 2	44	aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 5
15	aminoácido de CDR 3 de VH de Ab 2	45	aminoácido de CDR 3 de VH de Ab 5
16	nucleótido de VL de Ab 2	46	nucleótido de VL de Ab 5
17	aminoácido de VL de Ab 2	47	aminoácido de VL de Ab 5
18	aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 2	48	aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 5
19	aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 2	49	aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 5
20	aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 2	50	aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 5
21	nucleótido de VH de Anticuerpo 3	51	nucleótido de VH de Anticuerpo 7
22	aminoácido de VH de Ab 3	52	aminoácido de VH de Ab 7
23	aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 3	53	aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 7
24	aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 3	54	aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 7
25	aminoácido de CDR 3 de VH de Ab 3	55	aminoácido de CDR 3 de VH de Ab 7
26	nucleótido de VL de Ab 3	56	nucleótido de VL de Ab 7
27	aminoácido de VL de Ab 3	57	aminoácido de VL de Ab 7
28	aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 3	58	aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 7
29	aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 3	59	aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 7
30	aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 3	60	aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 7
61	nucleótido de VH de Anticuerpo 8	97	aminoácido de VL de Ab 16
62	aminoácido de VH de Ab 8	98	aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 16
63	aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 8	99	aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 16
64	aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 8	100	aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 16
65	aminoácido de CDR 3 de VH de Ab 8	101	nucleótido de VH de Anticuerpo 17
66	nucleótido de VL de Ab 8	102	aminoácido de VH de Ab 17
67	aminoácido de VL de Ab 8	103	aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 17
68	aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 8	104	aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 17
69	aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 8	105	aminoácido de CDR 3 de VH de Ab 17
70	aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 8	106	nucleótido de VL de Ab 17
71	nucleótido de VH de Anticuerpo 10	107	aminoácido de VL de Ab 17
72	aminoácido de VH de Ab 10	108	aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 17
73	aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 10	109	aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 17
74	aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 10	110	aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 17
75	aminoácido de CDR 3 de VH de Ab 10	111	nucleótido de VH de Anticuerpo 18
76	nucleótido de VL de Ab 10	112	aminoácido de VH de Ab 18
77	aminoácido de VL de Ab 10	113	aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 18
78	aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 10	114	aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 18
79	aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 10	115	aminoácido de CDR 3 de VH de Ab 18
80	aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 10	116	nucleótido de VL de Ab 18
81	nucleótido de VH de Anticuerpo 14	117	aminoácido de VL de Ab 18
82	aminoácido de VH de Ab 14	118	aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 18

83	aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 14	119	aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 18
84	aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 14	120	aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 18
85	aminoácido de CDR 3 de VH de Ab 14	121	nucleótido de VH de Anticuerpo 19
86	nucleótido de VL de Ab 14	122	aminoácido de VH de Ab 19
87	aminoácido de VL de Ab 14	123	aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 19
88	aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 14	124	aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 19
89	aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 14	125	aminoácido de CDR 3 de VH de Ab 19
90	aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 14	126	nucleótido de VL de Ab 19
91	nucleótido de VH de Anticuerpo 16	127	aminoácido de VL de Ab 19
92	aminoácido de VH de Ab 16	128	aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 19
93	aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 16	129	aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 19
94	aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 16	130	aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 19
95	aminoácido de CDR 3 de VH de Ab 16	131	nucleótido de VH de Anticuerpo 21
96	nucleótido de VL de Ab 16	132	aminoácido de VH de Ab 21
133	aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 21	162	IL-6 humana marcada con HIS FLAG
134	aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 21		
135	aminoácido de CDR 3 de VH de Ab 21	163	IL-6Ra soluble (humana)
136	nucleótido de VL de Ab 21	164	IL-6Ra transmembranaria (humana)
137	aminoácido de VL de Ab 21		
138	aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 21	165	aminoácido de IL-6 humana madura
139	aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 21		
140	aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 21	166	gp130 humano
141	nucleótido de VH de Ab 22	167	VH FR1 formada en la línea germinal
142	aminoácido de VH de Ab 22	168	VH FR2 formada en la línea germinal
143	aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 22	169	VH FR3 formada en la línea germinal
144	aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 22	170	VH FR4 formada en la línea germinal
145	aminoácido de CDR 3 de VH de Ab 22	171	VL FR1 formada en la línea germinal
146	nucleótido de VL de Ab 22	172	VL FR1 formada en la línea germinal
147	aminoácido de VL de Ab 22	173	VL FR1 formada en la línea germinal
148	aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 22	174	VL FR1 formada en la línea germinal
149	aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 22	175	IL-6 mutante F102E
150	aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 22	176	IL-6 mutante S204E
151	nucleótido de VH de Anticuerpo 23	177	IL-6 mutante R207E
152	aminoácido de VH de Ab 23	178	IL-6 mutante F106E
153	aminoácido de CDR 1 de VH de Ab 23	179	IL-6 mutante Q211A
154	aminoácido de CDR 2 de VH de Ab 23	180	IL-6 mutante R58E
155	aminoácido de CDR 3 de VH de Ab 23	181	IL-6 mutante E200W
156	nucleótido de VL de Ab 23	182	IL-6 mutante R207L
157	aminoácido de VL de Ab 23	183	cebador macIL6_5'NdeI
158	aminoácido de CDR 1 de VL de Ab 23	184	cebador macIL6_3'NheI
159	aminoácido de CDR 2 de VL de Ab 23	185	cebador hIL6_5'NdeI
160	aminoácido de CDR 3 de VL de Ab 23		
161	Aminoácido de IL-6 humana de longitud completa		

Las secuencias de anticuerpos 7, 10, 17 y 18 están formadas en la línea germinal.

1 Kishimoto, T., (1989) *Blood* 74:1-10

5 2 Smith P. C. et al. (2001) *Cytokine and Growth factor Reviews* 12:33-40

3 Wallenius et al., (2002) *Nat. Med.* 8:75

4 Kawano et al. (1988) *Nature* 332:83

5 Van Zaanen et al. (1996) *J. Clin Invest.* 98:1441-1448

6 Somers, W., et al (1997) *EMBO J.* 16:989-997

10 7 Jones, S. A et al. (2001) *FASEB J.* 15:43-58

8 Varghese et al. (2002) *PNAS USA* 99:15959-15964

9 Boulanger et al (2003) *Science* 300:2101-2104

10 Menziani et al (1997) *Proteins: Structure Function and Genetics* 29, 528

11 Brakenhoff et al. (1990) *J. Immunol.* 145:561-568

15 12 Wijdenes et al. (1991) *Mol Immunol.* 28:1183-1191

13 Brakenhoff et al. (1994) *JBC* 269:86

14 Kalai et al. (1996) *Eur J Biochem* 238 714-723

15 Kalai et al. (1997) *Blood* 89:1319-1333

16 Hirata et al. (1989) *J. Immunol* 143:2900-2906

20 17 Kalai et al. (1997) *Eur J. Biochem* 249:690-700

18 Ernst, M. and B. J. Jenkins. (2004) *Trends Genet.* 20:23-32

19 Yoshida, K. et al (1996) *PNAS USA* 93:407-411

20 Heinrich, P. C. et al. (2003) *Biochem. J.* 374:1-20

- 21 Choy, E. (2004) *Rheum. Dis .Clin. North Am.* 30:405-415
- 22 Jones SA et al. (2001) *FASEB J* 15:43-58
- 23 Kishimoto (2006) *Arthritis Research & Therapy* 8 : Supp 2/S2
- 24 Hirano T et al. (1986) *Nature* 324:73-76
- 5 25 Moshage (1997) *J. Pathol.* 181:257-266
- 26 Guillen, C. et al. (2004) *Calcif .Tissue Int.* 75:153-159
- 27 Tamura, T., et al. (1993) *PNAS USA* 90:11924-11928
- 28 Udagawa, N et al. (1995) *J. Exp. Med.* 182:1461-1468
- 29 Nishimoto N, and Kishimoto T. (2004) *Curr Op in Pharmacology* 4:386-391
- 10 30 Keller E.T. et al. (1996) *Front Biosci.* 1:340-57
- 31 Bataille et al. (1995) *Blood* 86:685-691
- 32 Lu et al. (1995) *Blood* 68:3123-3131
- 33 Blay et al. (1997) *Int J. Cancer* 424-430
- 34 Wendling et al. (1993) *J. Rheumatol.* 20:259-262
- 15 35 Emilie et al. (1994) *Blood* 84:2472-2479
- 36 Brochier J et al. (1995) *Int. J. of Immunopharm.* 17:41-48
- 37 van Zaanen et al. (1998) *Brit. Journal. Haematology* 102:783
- 38 Bell and Kamm, (2000) *Aliment. Phamacol. Ther.* 14, 501-514
- 39 Brakenhoff et al (1990) *J. Immunol* 145:651
- 20 40 Mihara et al. (2005) *Expert Opinion on Biological Therapy.* 5:683-90
- 41 Lu et al., (2005) *Biochemistry* 44:11106-14
- 42 Haan & Maggos (2004) *BioCentury*, 12(5): A1-A6
- 43 Koide et al. (1998) *Journal of Molecular Biology*, 284: 1141-1151.
- 44 Nygren et al. (1997) *Curr. Op. Structural Biology*, 7: 463-469
- 25 45 Wess, L. (2004) In: *BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness*, 12(42), A1-A7,
- 46 Kabat, E.A. et al, *Sequences of Proteins of Immunological Interest.* 4th Edition. US Department of Health and Human Services. (1987)
- 47 Martin, A.C.R. *Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer* *PROTEINS: Structure, Function and Genetics*, 25 (1996), 130-133
- 30 48 Kabat, E.A. et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Edition. US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington
- 49 Segal et al., (1974) *PNAS*, 71:4298-4302
- 50 Amit et al., (1986) *Science*, 233:747-753
- 51 Chothia et al., (1987) *J. Mol. Biol.*, 196:901-917
- 35 52 Chothia et al., (1989) *Nature*, 342:877- 883
- 53 Caton et al., (1990) *J. Immunol.*, 144:1965-1968
- 54 Sharon et al., (1990) *PNAS*, 87:4814-4817
- 55 Sharon et al., (1990) *J. Immunol.*, 144:4863-4869
- 56 Kabat et al., (1991) *J. Immunol.*, 147:1709-1719
- 40 57 Holliger & Hudson, *Nature Biotechnology* 23(9):1126-1136 2005
- 58 Kontermann, R & Dubel, S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag New York, LLC; 2001, ISBN: 3540413545
- 59 Mendez, M. et al. (1997) *Nature Genet*, 15(2): 146-156
- 60 Knappik et al. (2000) *J. Mol. Biol.* 296, 57-86
- 61 Krebs et al. (2001) *J. Immunological Methods* 254 67-84
- 45 62 Ward, E.S. et al., (1989) *Nature* 341, 544-546
- 63 McCafferty et al (1990) *Nature*, 348, 552-554
- 64 Holt et al (2003) *Trends in Biotechnology* 21, 484-490
- 65 Bird et al, (1988) *Science*, 242, 423-426
- 66 Huston et al, (1988) *PNAS USA*, 85, 5879-5883
- 50 67 Holliger, P. et al, (1993) *PNAS USA* 90 6444-6448
- 68 Reiter, Y. et al, (1996) *Nature Biotech*, 14, 1239-1245
- 69 Hu, S. et al, (1996) *Cancer Res.*, 56, 3055-3061
- 70 Qui et al., (2007) *Nat. Biotechnol.* 25:921-929
- 71 Holliger and Bohlen (1999) *Cancer & Metastasis Rev.* 18: 411-419
- 55 72 Holliger, P. and Winter G. (1993) *Curr. Op. Biotech.* 4, 446-449
- 73 Glennie M J et al. (1987) *J. Immunol.* 139, 2367-2375
- 74 Repp R. et al. (1995) *J. Hematother.* 4: 415-21
- 75 Staerz U. D. and Bevan M. J. (1986) *PNAS USA* 83: 1453-7
- 76 Suresh M. R. et al. (1986) *Method Enzymol.* 121: 210-228
- 60 77 Merchand et al. (1998) *Nature Biotech.* 16:677-681
- 78 Ridgeway, J. B. B. et al (1996) *Protein Eng.*, 9, 616-621
- 79 Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., pp. 726, 1988
- 80 Köhler and Milstein (1975) *Nature*, 256:495-497
- 65 81 Wold, et al. *Multivariate data analysis in chemistry. Chemometrics -Mathematics and Statistics in Chemistry* (Ed.: B. Kowalski), D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland, 1984 (ISBN 90-277-1846-6)

- 82 Norman et al. Applied Regression Analysis. Wiley-Interscience; 3rd edition (April 1998) ISBN: 0471170828
- 83 Kandel, Abraham & Backer, Eric. Computer-Assisted Reasoning in Cluster Analysis. Prentice Hall PTR, (May 11, 1995), ISBN: 0133418847
- 5 84 Krzanowski, Wojtek. Principles of Multivariate Analysis: A User's Perspective (Oxford Statistical Science Series, No 22 (Paper)). Oxford University Press; (December 2000), ISBN: 0198507089
- 85 Witten, Ian H. & Frank, Eibe. Data Mining: Practical Machine Learning Tools and Techniques with Java Implementations. Morgan Kaufmann; (October 11, 1999), ISBN: 1558605525
- 86 Denison David G. T. (Editor), Christopher C. Holmes, Bani K. Mallick, Adrian F. M. Smith. Bayesian Methods for Nonlinear Classification and Regression (Wiley Series in Probability and Statistics). John Wiley & Sons; (July 10 2002), ISBN: 0471490369
- 87 Ghose, Arup K. & Viswanadhan, Vellarkad N.. Combinatorial Library Design and Evaluation Principles, Software, Tools, and Applications in Drug Discovery. ISBN: 0-8247-0487-8
- 88 Chothia C. et al. (1992) J. Molecular Biology 227, 799-817
- 89 Al-Lazikani, et al. (1997) J. Molecular Biology 273(4), 927-948
- 15 90 Chothia, et al. (1986) Science, 223,755-758
- 91 Whitelegg, N.R.u. & Rees, A.R (2000). Prot. Eng., 12, 815-824
- 92 Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997) Electrophoresis 18, 2714-2723
- 93 Altschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 405-410
- 94 Pearson and Lipman (1988) PNAS USA 85: 2444-2448
- 20 95 Smith and Waterman (1981) J. Mol Biol. 147: 195-197
- 96 Voet & Voet, Biochemistry, 2nd Edition, (Wiley) 1995.
- 97 Gram et al., (1992) PNAS USA, 89:3576-3580
- 98 Barbas et al., (1994) PNAS USA, 91:3809-3813
- 99 Schier et al., (1996) J. Mol. Biol. 263:551-567
- 25 100 Marks et al (1992) Bio/Technology 10:779-783
- 101 Kay, B.K., Winter, J., and McCafferty, J. (1996) Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, San Diego: Academic Press
- 102 Hunter W. M. and Greenwood F. C. (1962) Nature 194:495
- 103 Plückthun, A. (1991) Bio/Technology 9: 545-551
- 30 104 Chadd HE and Chamow SM (2001) Current Opinion in Biotechnology 12: 188-194
- 105 Andersen DC and Krummen L (2002) Current Opinion in Biotechnology 13: 117
- 106 Larrick JW and Thomas DW (2001) Current Opinion in Biotechnology 12:411-418
- 107 Sambrook and Russell, Molecular Cloning: a Laboratory Manual: 3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press
- 35 108 Ausubel et al. eds., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, 4th edition 1999
- 109 Robinson, J. R. ed., (1978) Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., New York
- 110 Ledermann J.A. et al. (1991) Int. J. Cancer 47: 659-664
- 40 111 Bagshawe K.D. et al. (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4: 915-922
- 112 Desgeorges et al. (1997) J. Rheumatol 24:1510
- 113 Yokota et al. (2005) Arth & Rheum 52(3): 818-25
- 114 Klouche et al., (1999) J. Immunol. 163(8) 4583-9
- 115 Oh et al., (2001) J. Immunol. 166: 2695-704
- 45 116 Fasshauer et al., (2003) Horm. Metab. Res. 35(3) 147-52
- 117 Marz et al., (1998) Proc. Natl. Acad. Sci USA 95(6) 3251-6
- 118 Modur et al., (1997) J. Clin. Invest. 100(1) 2752-6
- 119 Murakami-Morl et al., (1996) Cell Growth Differ. 7(12) 1697-703
- 120 Vaughan, T. J., et al. (1996) Nature Biotech. 14, 309-314.
- 50 121 Hutchings, C. (2001) Generation of Naive Human Antibody Libraries, in Antibody Engineering, R. Kontermann and S. Dubel, Editors. Springer Laboratory Manuals, Berlin. p. 93
- 122 Hawkins et al (1992) Journal of Molecular Biology 226, 889-896
- 123 Persic L et al. (1997) Gene 187, 9-18.
- 124 Mach et al (1992) Anal. Biochem. 200(1): 20-26
- 55 125 Osbourn (1996) Immunotechnology. 2, 181-196
- 126 Bannister et al (2006) Biotechnology and Bioengineering, 94: 931-937
- 127 McCafferty et al (1994) Appl. Biochem. Biotech. 47: 157-71
- 128 Clackson and Lowman (2004) A Practical Approach, Oxford University Press
- 129 Thompson (1996) J. Molecular Biology. 256. 77-88
- 60 130 <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>
- 131 Foote J & Winter G (1992) J. Molecular biology 224(2) 487-99
- 132 Karlsson et al (1991) J. Immunol Methods 145 (1-2) 229-240
- 133 Lu et al. (1995) Blood. 86: 3123-3131
- 65 134 Kitamura T et al (1989) J. Cellular Physiology 140. 323-334

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AstraZeneca AB MedImmune Limited

5 <120> Compuestos

<130> Ligando de IL-6 102483-1 CAT082

10 <150> US60/861.704
<151> 11-30-2006

<160> 185

15 <170> CAT versión 1.0

<210> 1
<211> 360
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

20 <220>
<223> CAN022D10

25 <400> 1

gaagtgcagc	tgggtgcagtc	tggggggaggc	ttgatccagc	cggggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggggt	caccatcagc	agcaactaca	tgatttgggt	ccgtcaggct	120
ccaggggaagg	ggctggagtg	ggtctccgat	ctttattatt	atgctggtga	cacatattac	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatg	tcagagaca	ttccaagaa	caccgtgtat	240
cttcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acgggtgtct	attattgtgc	gagatgggcc	300
gatgaccact	actattacat	tgacgtctgg	ggcaggggca	ccctggtcac	cgtctogagt	360

30 <210> 2
<211> 120
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <220>
<223> CAN022D10

<400> 2

ES 2 618 550 T3

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

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> CAN022D10
 <400> 3

10

Ser Asn Tyr Met Ile
 5

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<220>
 <223> CAN022D10
 <400> 4

20

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

25

Gly

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

30

<220>
 <223> CAN022D10

35

<400> 5

ES 2 618 550 T3

Trp Ala Asp Asp His Tyr Tyr Tyr Ile Asp Val
 5 10

5 <210> 6
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> CAN022D10
 <400> 6

gacatcgtga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtca gggattagt agctgggttg cctggtatca gcagaaacca 120
 gggagagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggtgc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagc tggagatcaa acgt 324

15 <210> 7
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <223> CAN022D10
 <400> 7

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 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 Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Thr 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 Tyr Ser Thr Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

25 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <223> CAN022D10

ES 2 618 550 T3

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
5 10

5 <210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<223> CAN022D10

<400> 9

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
5

15 <210> 10
<211> 9
<212> PRT
20 <213> *Homo sapiens*

<220>
<223> CAN022D10

25 <400> 10

Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
5

30 <210> 11
<211> 360
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

35 <220>
<223> Anticuerpo 02

<400> 11

gagggtgcagc tgggtgcagtc aggggggaggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctgggtt caccatcagc agcaactaca tgacttgggt ccgtcaggct	120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctgggtga cacatattac	180
gcagactccg tgaggggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccgtgtat	240
cttcaaatgg acagcctgag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatgggcc	300
gatggccact actattacat tgacgtctgg ggcgggggca ccttgggtcac cgtctcgagt	360

40 <210> 12
<211> 120
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <220>
<223> Anticuerpo 02

<400> 12

50

ES 2 618 550 T3

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

5 <210> 13
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> Anticuerpo 02
 <400> 13

Ser Asn Tyr Met Thr
 5

15 <210> 14
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <223> Anticuerpo 02
 <400> 14

25 Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Arg
 5 10 15

Gly

30 <210> 15
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>
 <223> Anticuerpo 02
 <400> 15

ES 2 618 550 T3

Trp Ala Asp Gly His Tyr Tyr Tyr Ile Asp Val
 5 10

5 <210> 16
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> Anticuerpo 02
 <400> 16

gacatcgtga tgaccagtc cccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcact 60
 atcacttgcc gggccagtca gggatttagt agctgggtga cctggatatca gcagaaacca 120
 gggagagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaccctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatcttg caacttacta ctgtcaacag agttacagtg ccccgtaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagc tggagctcaa acgt 324

15 <210> 17
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <223> Anticuerpo 02
 <400> 17

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
 20 25 30
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Thr 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 Tyr Ser Ala Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

25 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <223> Anticuerpo 02

ES 2 618 550 T3

<400> 18

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Thr

5

10

5 <210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<223> Anticuerpo 02

<400> 19

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
5

15 <210> 20
<211> 9
<212> PRT
20 <213> *Homo sapiens*

<220>
<223> Anticuerpo 02

25 <400> 20

Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Trp Thr
5

30 <210> 21
<211> 360
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

35 <220>
<223> Anticuerpo 03

<400> 21

caggtacagc	tggtgcagtc	tgggggagge	ttgatccagc	cgggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctgggtt	caccatcagc	agcaactaca	tggtttgggt	cgctcagget	120
ccggggaagg	ggctggagtg	ggtctccgat	ctttattatt	atgctgggtga	cacatattac	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcacctg	tccagagaca	ttccaagaa	caccgtgtat	240
cttcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acgggtgtct	attattgtgc	gagatgggcc	300
gatgaccact	actatcacat	tgacgtctgg	ggcaggggca	ccctggtcac	cgtctcgagt	360

40 <210> 22
<211> 120
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45 <220>
<223> Anticuerpo 03

<400> 22

ES 2 618 550 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly
 5 10 15

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

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

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

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

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

Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Tyr Tyr His Ile Asp Val Trp Gly Arg
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

5 <210> 23
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> Anticuerpo 03
 <400> 23

Ser Asn Tyr Met Val
 5

15 <210> 24
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <223> Anticuerpo 03
 <400> 24

25 Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 5 10 15

Gly

30 <210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>
 <223> Anticuerpo 03

ES 2 618 550 T3

<400> 25

Trp Ala Asp Asp His Tyr Tyr His Ile Asp Val
5 10

5 <210> 26
<211> 324
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<223> Anticuerpo 03

<400> 26

gacatcgtga tgaccacgac tccttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtc gggatttagt agctgggtgg cctgggatca gcagaaacca 120
gggagagccc ctaaggcctt gatctataag gcacttactt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggtgc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttacagta ccccgaggac gttcggccaa 300
gggaccaagc tggagatcaa acgt 324

15 <210> 27
<211> 108
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<223> Anticuerpo 03

25 <400> 27

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
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 Arg Ala Pro Lys Ala Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Ala Ser Thr 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 Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

30 <210> 28
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 618 550 T3

Trp Ala Asp Gly His Tyr Tyr Tyr Ala Asp Val
 5 10

5 <210> 36
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> Anticuerpo 04
 <400> 36

gacatcgtga tgaccagtc tcctccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtc ggaattagt agctgggttg cctggtatca gcagaaacca 120
 gggagagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctacgt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggtc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatttcg catcttacta ctgtcaacag agttacagtg ccccgaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagc tggagctcaa acgt 324

15 <210> 37
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <223> Anticuerpo 04
 <400> 37

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 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 Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Thr 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 Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg

25 100 105

30 <210> 38
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 618 550 T3

<400> 42

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Trp Ala Asp Gly His Tyr Tyr Tyr Ala Asp Val Trp Gly Arg
100 105 110

Gly Thr Leu Val Ser Val Ser Ser
115 120

5 <210> 43
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<223> Anticuerpo 05
<400> 43

Ser Asn Tyr Met Ile
5

15 <210> 44
<211> 17
<212> PRT
20 <213> *Homo sapiens*

<220>
<223> Anticuerpo 05

25 <400> 44

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

Gly

30 <210> 45
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <220>
<223> Anticuerpo 05

ES 2 618 550 T3

<400> 45

Trp Ala Asp Gly His Tyr Tyr Tyr Ala Asp Val
 5 10

5

<210> 46
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>
 <223> Anticuerpo 05

15

<400> 46

gacatcgtga tgaccagtc tccccccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtc ggggaattagt agctggttgg cctgggatca gcagaaacca 120
 gggagagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctacat tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggtac tgggacagat ttcactctca ccatcagcag totgcaacct 240
 gaagatttcg catcttacta ctgtcaacag agttacagtg ccccgaggac gtttgcccaa 300
 gggaccaagc tggagatcaa acgt 324

20

<210> 47
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<220>
 <223> Anticuerpo 05

<400> 47

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Pro Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 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 Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Thr 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 Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

30

<210> 48
 <211> 11
 <212> PRT

ES 2 618 550 T3

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Anticuerpo 05

5

<400> 48

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
5 10

10

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<220>

<223> Anticuerpo 05

<400> 49

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
5

20

<210> 50

<211> 9

<212> PRT

25

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Anticuerpo 05

30

<400> 50

Gln Gln Ser Tyr Ser Ala Pro Trp Thr
5

35

<210> 51

<211> 360

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

40

<220>

<223> Anticuerpo 07

<400> 51

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagc cggggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggggt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt ccgtcaggct 120

ccaggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctgggtga cacatattac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccgtgtat 240

cttcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtct attattgtgc gagatgggcc 300

gatgaccacc cggcctgggt ggacctctgg ggcaggggca ccctgggtcac cgtctctctca 360

45

<210> 52

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

50

ES 2 618 550 T3

<220>

<223> Anticuerpo 07

<400> 52

5

```

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

```

<210> 53

<211> 5

10

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Anticuerpo 07

15

<400> 53

```

Ser Asn Tyr Met Ile
                    5

```

20

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<220>

<223> Anticuerpo 07

<400> 54

```

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

```

30

Gly

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

35

<213> *Homo sapiens*

ES 2 618 550 T3

<220>
<223> Anticuerpo 07

<400> 55

5

Trp Ala Asp Asp His Pro Ala Trp Val Asp Leu
5 10

<210> 56
<211> 321
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10

<220>
<223> Anticuerpo 07

15

<400> 56

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gggattagt agctgggttg cctgggatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gatgattttg caactacta ctgtcaacag agttggctcg gcgggtcgtt cggccaaggg 300
accaagctgg agatcaaacg t 321

20

<210> 57
<211> 107
<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<220>
<223> Anticuerpo 07

<400> 57

30

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

ES 2 618 550 T3

5 <210> 58
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Anticuerpo 07

10 <400> 58

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 5 10

15 <210> 59
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Anticuerpo 07

20 <400> 59

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 5

25 <210> 60
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <223> Anticuerpo 07

<400> 60

Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser
 5

35 <210> 61
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Anticuerpo 08

45 <400> 61

gaagtgcagc	tggtgcagtc	tgggggaggc	ttgatccagc	cggggggggc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggggt	caccatcagc	agcaactaca	tgatttgggt	ccgtcaggct	120
ccaggaagg	ggctggagtg	ggtctccgat	ctttattatt	atgctggtga	cacatattac	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatg	tccagagaca	ttccaagaa	caccgtgtat	240
cttcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acgggtgtct	attattgtgc	gagatgggcc	300
gatgaccacc	cccgtacat	cgaccactgg	ggcaggggca	ccctggtcac	cgtctcgagt	360

50 <210> 62
 <211> 120
 <212> PRT

ES 2 618 550 T3

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Anticuerpo 08

5

<400> 65

Trp Ala Asp Asp His Pro Arg Tyr Ile Asp His
5 10

10

<210> 66

<211> 321

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

15

<220>

<223> Anticuerpo 08

<400> 66

gacatcgtga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtc gggattagt agctgggtgg cctgggatca gcagaaacca 120
gggagagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatdddg caacttacta ctgtcaacag agttggctcg gcgggtcgtt cggccaaggg 300
accaagctgg agatcaaagc t 321

20

<210> 67

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

25

<220>

<223> Anticuerpo 08

30

<400> 67

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
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 Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Ala Ser Thr 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 Trp Leu Gly Gly Ser
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

ES 2 618 550 T3

5 <210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Anticuerpo 08

10 <400> 68

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 5 10

15 <210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Anticuerpo 08

20 <400> 69

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 5

25 <210> 70
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <223> Anticuerpo 08

<400> 70

Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser
 5

35 <210> 71
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Anticuerpo 10

45 <400> 71

gagggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttggtccagc	cggggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggggt	caccatcagc	agcaactaca	tgatttgggt	cgcagcaggct	120
ccaggaagg	ggctggagtg	ggtctccgat	ctttattatt	atgctggtga	cacatattac	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatg	tccagagaca	ttccaagaa	caccgtgtat	240
cttcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtct	attattgtgc	gagatgggag	300
gaggagggga	gggggtacat	tgacgtctgg	ggcaggggca	ccctggtcac	cgtctctca	360

50 <210> 72
 <211> 120
 <212> PRT

ES 2 618 550 T3

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Anticuerpo 10

5

<400> 75

Trp Glu Glu Glu Gly Arg Gly Tyr Ile Asp Val
5 10

10

<210> 76

<211> 321

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

15

<220>

<223> Anticuerpo 10

<400> 76

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gggattagt agctggttgg cctgggatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gatgattttg caacttacta ctgtcaacag agttggctcg gcgggtcggtt cggccaaggg 300
accaagctgg agatcaaacg t 321

20

<210> 77

<211> 107

<212> PRT

25

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Anticuerpo 10

30

<400> 77

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

ES 2 618 550 T3

<210> 78
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 5
 <220>
 <223> Anticuerpo 10
 <400> 78
 10
 Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 5 10
 <210> 79
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 15
 <220>
 <223> Anticuerpo 10
 20
 <400> 79
 Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
 5
 25
 <210> 80
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 30
 <220>
 <223> Anticuerpo 10
 <400> 80
 Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser
 5
 35
 <210> 81
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*
 40
 <220>
 <223> Anticuerpo 14
 45
 <400> 81
 gaagtgcagc tgggtgcagtc tgggggagggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggggt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt cgcgcaggct 120
 ccagggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctggtga cacatattac 180
 gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca ttccaagaa caccgtgtat 240
 cttcaaatga acagcctgag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatggggc 300
 gatgaccaca actaccccca cattgacgtc tggggcaggg gcaccctggt caccgtctcg 360
 agt 363
 <210> 82
 <211> 121
 50

ES 2 618 550 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <223> Anticuerpo 14

<400> 82

```

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

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

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

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

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

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

  Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Asn Tyr Pro His Ile Asp Val Trp Gly
                    100                               105                110

  Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                    115                               120
  
```

10

<210> 83
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<220>
 <223> Anticuerpo 14

20

<400> 83

Ser Asn Tyr Met Ile
 5

25

<210> 84
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

<220>
 <223> Anticuerpo 14

<400> 84

```

  Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
                    5                                10                15
  
```

35

Gly

<210> 85
 <211> 12

ES 2 618 550 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <220>
<223> Anticuerpo 14

<400> 85

Trp Ala Asp Asp His Asn Tyr Pro His Ile Asp Val
5 10

10 <210> 86
<211> 324
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

15 <220>
<223> Anticuerpo 14

20 <400> 86

gacatcgtga	tgaccagtc	tcctccacc	ctgtctgcat	ctgtaggaga	cagagtcacc	60
atcacttgcc	gggccagtc	gggtattagt	agctggttgg	cctggtatca	gcagaaacca	120
gggagagccc	ctaaggtctt	gatctataag	gcatctactt	tagaaagtgg	ggtcccatca	180
aggttcagcg	gcagtggatc	tgggacagat	ttcactctca	ccatcagcag	tctgcaacct	240
gaagattttg	caacttacta	ctgtgccgcc	cactacgccg	ccccgtggac	gttcggccaa	300
gggaccaagc	tggagatcaa	acgt				324

25 <210> 87
<211> 108
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <220>
<223> Anticuerpo 14

<400> 87

ES 2 618 550 T3

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 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 Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Thr 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 Ala Ala His Tyr Ala Ala Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

5 <210> 88
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> Anticuerpo 14
 <400> 88

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
 5 10

15 <210> 89
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <223> Anticuerpo 14
 <400> 89

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser

25 5

30 <210> 90
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Anticuerpo 14
 35 <400> 90

Ala Ala His Tyr Ala Ala Pro Trp Thr
 5

ES 2 618 550 T3

<210> 91
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> Anticuerpo 16

<400> 91

10

```

gaagtgcagc tgggtgcagtc tggggggaggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggggt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt ccgtcaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctggtga cacatattac      180
gcagactctg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccgtgtat      240
cttcaaataga acagcctgag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatggggc      300
gatgaccacc cccctacat cgacctgtgg ggcaggggca cctgggtcac cgtctcgagt      360
  
```

<210> 92
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<220>
 <223> Anticuerpo 16

20

<400> 92

```

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

25

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

30

<220>

ES 2 618 550 T3

<223> Anticuerpo 16

<400> 93

Ser Asn Tyr Met Ile
5

5

<210> 94
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<220>
<223> Anticuerpo 16

15

<400> 94

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

Gly

<210> 95
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<220>
<223> Anticuerpo 16

25

<400> 95

Trp Ala Asp Asp His Pro Pro Tyr Ile Asp Leu
5 10

30

<210> 96
<211> 321
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

35

<220>
<223> Anticuerpo 16

40

<400> 96

gacatcgtga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gggattagt agctgggttg cctggtatca gcagaaacca 120
gggagagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttggctcg ggggctcgtt cggccaaggg 300
accaagctgg agatcaaacg t 321

<210> 97
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

45

<220>
<223> Anticuerpo 16

ES 2 618 550 T3

<400> 97

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
                    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 Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile
                35                      40                      45

Tyr Lys Ala Ser Thr 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 Trp Leu Gly Gly Ser
                85                      90                      95

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

```

5

<210> 98
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<220>
 <223> Anticuerpo 16

15

<400> 98

```

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
                    5                      10

```

20

<210> 99
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25

<220>
 <223> Anticuerpo 16

<400> 99

```

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
                    5

```

30

<210> 100
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35

<220>
 <223> Anticuerpo 16

<400> 100

40

```

Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser
                    5

```

ES 2 618 550 T3

<210> 101
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> Anticuerpo 17

<400> 101

10

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttgggtccagc cggggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggggtt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt ccgtcaggct      120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctggtga cacatattac      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccgtgtat      240
cttcaaataga acagcctgag agccgaggac acggctgtct attattgtgc gagatgggcc      300
gatgaccacc cccctacat cgacatgtgg ggcaggggca ccctggtcac cgtctctca      360
  
```

<210> 102
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<220>
 <223> Anticuerpo 17

<400> 102

20

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
                    5                      10                      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser Ser Asn
                    20                      25                      30
Tyr Met Ile Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                    35                      40                      45
Ser Asp Leu Tyr Tyr Tyr Ala Gly Asp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
                    50                      55                      60
Lys Gly Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile 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
Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Pro Pro Tyr Ile Asp Met Trp Gly Arg
                    100                     105                     110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                    115                      120
  
```

25

<210> 103
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

<220>

ES 2 618 550 T3

<223> Anticuerpo 17

<400> 103

Ser Asn Tyr Met Ile
5

5

<210> 104

<211> 17

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Anticuerpo 17

15

<400> 104

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

Gly

<210> 105

20

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

25

<223> Anticuerpo 17

<400> 105

Trp Ala Asp Asp His Pro Pro Tyr Ile Asp Met
5 10

30

<210> 106

<211> 321

<212> ADN

35

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Anticuerpo 17

<400> 106

40

gacatccaga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gggattagt agctgggtgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gatgattttg caacttacta ctgtcaacag agttggctcg gcgggtcgtt cggccaaggg 300
accaagctgg agatcaaacg t 321

<210> 107

45

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Anticuerpo 17

ES 2 618 550 T3

<400> 107

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
                    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 Val Leu Ile
                35                      40                      45

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

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

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser
                85                      90                      95

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

```

5 <210> 108
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> Anticuerpo 17
 <400> 108

```

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
                    5                      10

```

15 <210> 109
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <223> Anticuerpo 17

25 <400> 109

```

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
                    5

```

30 <210> 110
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>
 <223> Anticuerpo 17

<400> 110

```

Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser
                    5

```

40 <210> 111

ES 2 618 550 T3

<211> 360
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

5 <220>
 <223> Anticuerpo 18

<400> 111

gaggtgcagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttggtccagc	cggggggggtc	cctgagactc	60
tctctgtcag	cctctggggt	caccatcagc	agcaactaca	tgatttgggt	ccgtcaggct	120
ccaggggaagg	ggctggagtg	ggtctccgat	ctttattatt	atgctgggtga	cacatattac	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatg	tccagagaca	tttccaagaa	caccgtgtat	240
cttcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acggctgtct	attattgtgc	gagatgggccc	300
gatgaccacc	ccccctggat	cgacctctgg	ggcaggggca	ccctgggtcac	cgtctcctca	360

10 <210> 112
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Anticuerpo 18

20 <400> 112

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

25 <210> 113
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>

ES 2 618 550 T3

<223> Anticuerpo 18

<400> 113

Ser Asn Tyr Met Ile
5

5

<210> 114

<211> 17

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Anticuerpo 18

15

<400> 114

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

Gly

<210> 115

20

<211> 11

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

25

<223> Anticuerpo 18

<400> 115

Trp Ala Asp Asp His Pro Pro Trp Ile Asp Leu
5 10

30

<210> 116

<211> 321

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

35

<220>

<223> Anticuerpo 18

<400> 116

40

gacatccaga tgaccagtc tcttccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gggattagt agctgggtgg cctgggatca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaaggctt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gatgattttg caacttacta ctgtcaacag agttggctcg gcggtcgtt cggccaaggg 300
accaagctgg agatcaaacg t 321

<210> 117

45

<211> 107

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

ES 2 618 550 T3

<223> Anticuerpo 18

<400> 117

```

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

```

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Anticuerpo 18

15 <400> 118

```

    Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
                    5                      10

```

<210> 119

<211> 7

<212> PRT

20 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Anticuerpo 18

25 <400> 119

```

    Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
                    5

```

30 <210> 120

<211> 8

<212> PRT

35 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Anticuerpo 18

40 <400> 120

```

    Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser
                    5

```

ES 2 618 550 T3

5 <210> 121
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> Anticuerpo 19

10 <400> 121

```

gaagtgcagc tgggtgcagtc tggggggaggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggggt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt cgcgcaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctgggtga cacatattac      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccggtgat      240
cttcaaatga acagcctgag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatggggc      300
gatgaccacc cctcccacct cgacatctgg ggcaggggca ccttggtcac cgtctcgagt      360
  
```

15 <210> 122
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <223> Anticuerpo 19

<400> 122

```

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Trp Ala Asp Asp His Pro Ser His Leu Asp Ile Trp Gly Arg
                100                      105                      110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                115                      120
  
```

25 <210> 123
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

ES 2 618 550 T3

<220>
 <223> Anticuerpo 19

5 <400> 123

Ser Asn Tyr Met Ile
 5

10 <210> 124
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <220>
 <223> Anticuerpo 19

<400> 124

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

Gly

20 <210> 125
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <223> Anticuerpo 19

<400> 125

Trp Ala Asp Asp His Pro Ser His Leu Asp Ile
 5 10

30 <210> 126
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

35 <220>
 <223> Anticuerpo 19

40 <400> 126

gacatcgtga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcaacttgcc gggccagtc gggattagt agctggttgg cctggatca gcagaaacca 120
 gggagagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagatdddg caacttacta ctgtcaacag agttggctcg gcgggctggt cggccaaggg 300
 accaagctgg agatcaaacg t 321

45 <210> 127
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

ES 2 618 550 T3

<220>
<223> Anticuerpo 19

<400> 127

5

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
                    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 Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile
                    35                               40                   45
Tyr Lys Ala Ser Thr 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
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser
                    85                               90                   95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
                    100                              105

```

<210> 128
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<220>
<223> Anticuerpo 19

15

<400> 128

```

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
                    5                               10

```

20

<210> 129
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

25

<220>
<223> Anticuerpo 19

<400> 129

```

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
                    5

```

30

<210> 130
<211> 8
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35

<220>
<223> Anticuerpo 19

40

<400> 130

ES 2 618 550 T3

Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser
5

5 <210> 131
<211> 360
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<223> Anticuerpo 21
<400> 131

```

gaagtgcagc tgggtgcagtc tggggggaggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggggtt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt ccgtcaggct      120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctccgat ctttattatt atgctgggtga cacatattac      180
gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccggtgat      240
cttcaaatga acagcctgag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatggggcc      300
gatgaccacc cctcccacat tgacgtctgg ggcaggggca cctgggtcac cgtctcgagt      360
    
```

15 <210> 132
<211> 120
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <220>
<223> Anticuerpo 21
<400> 132

```

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

25 <210> 133
<211> 5
<212> PRT

ES 2 618 550 T3

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Anticuerpo 21

5

<400> 133

Ser Asn Tyr Met Ile
5

10

<210> 134

<211> 17

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

15

<220>

<223> Anticuerpo 21

<400> 134

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

20

Gly

<210> 135

<211> 11

<212> PRT

25

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Anticuerpo 21

30

<400> 135

Trp Ala Asp Asp His Pro Ser His Ile Asp Val
5 10

35

<210> 136

<211> 321

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

40

<220>

<223> Anticuerpo 21

<400> 136

gacatcgtga tgaccagtc tcctccacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgcc gggccagtc gggattagc agctgggtgg cctgggatca gcagaaacca 120

gggagagccc ctaaggtctt gatctataag gcactactt tagaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtgatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240

gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttggctcg gcgggtcgtt cggccaaggg 300

accaagctgg agatcaaacg t 321

45

<210> 137

<211> 107

ES 2 618 550 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5 <220>
<223> Anticuerpo 21

<400> 137

```

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
                    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 Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile
                35                      40                      45
Tyr Lys Ala Ser Thr 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 Trp Leu Gly Gly Ser
                85                      90                      95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
                100                      105

```

10 <210> 138
<211> 11
<212> PRT
15 <213> *Homo sapiens*

<220>
<223> Anticuerpo 21

20 <400> 138

```

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
                    5                      10

```

25 <210> 139
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30 <220>
<223> Anticuerpo 21

<400> 139

```

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
                    5

```

35 <210> 140
<211> 8
<212> PRT
40 <213> *Homo sapiens*

<220>
<223> Anticuerpo 21

ES 2 618 550 T3

<400> 140

Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser
5

5 <210> 141
<211> 363
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<223> Anticuerpo 22

<400> 141

gaagtgcagc	tggtgcagtc	tgggggagggc	ttgatccagc	cggggggggtc	cctgagactc	60
tcctgtgcag	cctctggggt	caccatcagc	agcaactaca	tgatttgggt	ccgtcaggct	120
ccaggggaagg	ggctggagtg	ggtctccgat	ctttattatt	atgctggtga	cacatattac	180
gcagactccg	tgaagggccg	attcaccatg	tccagagaca	tttccaagaa	caccgtgtat	240
cttcaaatga	acagcctgag	agccgaggac	acgggtgtct	attattgtgc	gagatggggc	300
gatgaccaca	acaacaccta	cattgacgtc	tggggcaggg	gcaccctggt	caccgtctcg	360

15 agt 363

<210> 142
<211> 121
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<223> Anticuerpo 22

25 <400> 142

ES 2 618 550 T3

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

5 <210> 143
<211> 5
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<223> Anticuerpo 22
<400> 143

Ser Asn Tyr Met Ile
5

15 <210> 144
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20 <220>
<223> Anticuerpo 22
<400> 144

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

25 Gly

30 <210> 145
<211> 12
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <220>
<223> Anticuerpo 22
<400> 145

ES 2 618 550 T3

Trp Ala Asp Asp His Asn Asn Thr Tyr Ile Asp Val
 5 10

5 <210> 146
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <223> Anticuerpo 22
 <400> 146

gacatcgtga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgcc gggccagtca gggattagt agctgggtgg cctgggatca gcagaaacca 120
 gggagagccc ctaaggcttt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
 gaagattttg caacttacta ctgtgcccgc cactacgccc ccccgaggac gttcggccaa 300
 gggaccaagc tggagatcaa acgt 324

15 <210> 147
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <220>
 <223> Anticuerpo 22
 <400> 147

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 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 Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Lys Ala Ser Thr 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 Ala Ala His Tyr Ala Ala Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

25 <210> 148
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>

ES 2 618 550 T3

<223> Anticuerpo 22

<400> 148

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
5 10

5

<210> 149

<211> 7

<212> PRT

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<223> Anticuerpo 22

15

<400> 149

Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
5

20

<210> 150

<211> 9

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<220>

25 <223> Anticuerpo 22

<400> 150

Ala Ala His Tyr Ala Ala Pro Trp Thr
5

30

<210> 151

<211> 360

<212> ADN

<213> *Homo sapiens*

35

<220>

<223> Anticuerpo 23

<400> 151

40

gaagtgcagc tgggtgcagtc tgggggaggc ttgatccagc cggggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgcag cctctggggt caccatcagc agcaactaca tgatttgggt ccgtcaggct 120

ccaggaagg ggctggagt ggtctccgat ctttattatt atgctgggtga cacatattac 180

gcagactccg tgaagggccg attcaccatg tccagagaca tttccaagaa caccgtgtat 240

cttcaaatga acagcctgag agccgaggac acgggtgtct attattgtgc gagatgggccc 300

gatgaccacg ccccctgggt cgacctctgg ggcaggggca ccttgggtcac cgtctcgagt 360

<210> 152

<211> 120

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

45

<220>

<223> Anticuerpo 23

50

ES 2 618 550 T3

<400> 155

Trp Ala Asp Asp His Ala Pro Trp Val Asp Leu
5 10

5 <210> 156
<211> 321
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*

10 <220>
<223> Anticuerpo 23

<400> 156

gacatcgtga tgaccagtc tccttcacc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
atcacttgcc gggccagtca gggattagt agctggttgg cctggtatca gcagaaacca 120
gggagagccc ctaaggtctt gatctataag gcatctactt tagaaagtgg ggtcccatca 180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg caacttacta ctgtcaacag agttggctcg gggggtcgtt cggccaaggg 300
accaagctgg agatcaaacg t 321

15 <210> 157
<211> 107
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<223> Anticuerpo 23

25 <400> 157

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
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 Arg Ala Pro Lys Val Leu Ile
35 40 45
Tyr Lys Ala Ser Thr 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 Trp Leu Gly Gly Ser
85 90 95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

30 <210> 158
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 618 550 T3

<220>
<223> Anticuerpo 23
5 <400> 158
Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
5 10
<210> 159
10 <211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<220>
15 <223> Anticuerpo 23
<400> 159
Lys Ala Ser Thr Leu Glu Ser
5
20 <210> 160
<211> 8
<212> PRT
25 <213> *Homo sapiens*
<220>
<223> Anticuerpo 23
<400> 160
30 Gln Gln Ser Trp Leu Gly Gly Ser
5
<210> 161
35 <211> 212
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<220>
40 <223> IL-6 de longitud completa
<400> 161

ES 2 618 550 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Arg Gln Met
 210

<210> 162
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

ES 2 618 550 T3

<220>

<223> IL-6 marcada con HIS FLAG

<400> 162

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 163

<211> 358

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

10

ES 2 618 550 T3

<220>

<223> IL-6Ra soluble

<400> 163

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 618 550 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Leu Pro Val Gln Asp
 355

<210> 164
 <211> 468
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <223> IL-6Ra transmembranaria

<400> 164

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

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

5

10

ES 2 618 550 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 618 550 T3

	275		280		285														
Val	Val	Gln	Leu	Arg	Ala	Gln	Glu	Glu	Phe	Gly	Gln	Gly	Glu	Trp	Ser				
	290					295					300								
Glu	Trp	Ser	Pro	Glu	Ala	Met	Gly	Thr	Pro	Trp	Thr	Glu	Ser	Arg	Ser				
305					310					315					320				
Pro	Pro	Ala	Glu	Asn	Glu	Val	Ser	Thr	Pro	Met	Gln	Ala	Leu	Thr	Thr				
				325					330					335					
Asn	Lys	Asp	Asp	Asp	Asn	Ile	Leu	Phe	Arg	Asp	Ser	Ala	Asn	Ala	Thr				
			340					345					350						
Ser	Leu	Pro	Val	Gln	Asp	Ser	Ser	Ser	Val	Pro	Leu	Pro	Thr	Phe	Leu				
		355					360					365							
Val	Ala	Gly	Gly	Ser	Leu	Ala	Phe	Gly	Thr	Leu	Leu	Cys	Ile	Ala	Ile				
	370					375						380							
Val	Leu	Arg	Phe	Lys	Lys	Thr	Trp	Lys	Leu	Arg	Ala	Leu	Lys	Glu	Gly				
385					390					395					400				
Lys	Thr	Ser	Met	His	Pro	Pro	Tyr	Ser	Leu	Gly	Gln	Leu	Val	Pro	Glu				
				405					410					415					
Arg	Pro	Arg	Pro	Thr	Pro	Val	Leu	Val	Pro	Leu	Ile	Ser	Pro	Pro	Val				
			420					425					430						
Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Gly	Ser	Asp	Asn	Thr	Ser	Ser	His	Asn	Arg	Pro				
		435					440					445							
Asp	Ala	Arg	Asp	Pro	Arg	Ser	Pro	Tyr	Asp	Ile	Ser	Asn	Thr	Asp	Tyr				
	450					455					460								
Phe	Phe	Pro	Arg																
465																			

<210> 165
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>
 <223> IL-6 madura

10

<400> 165

ES 2 618 550 T3

			20					25					30			
Pro	Glu	Ser	Pro	Val	Val	Gln	Leu	His	Ser	Asn	Phe	Thr	Ala	Val	Cys	
		35					40					45				
Val	Leu	Lys	Glu	Lys	Cys	Met	Asp	Tyr	Phe	His	Val	Asn	Ala	Asn	Tyr	
	50					55					60					
Ile	Val	Trp	Lys	Thr	Asn	His	Phe	Thr	Ile	Pro	Lys	Glu	Gln	Tyr	Thr	
65					70					75					80	
Ile	Ile	Asn	Arg	Thr	Ala	Ser	Ser	Val	Thr	Phe	Thr	Asp	Ile	Ala	Ser	
				85					90					95		
Leu	Asn	Ile	Gln	Leu	Thr	Cys	Asn	Ile	Leu	Thr	Phe	Gly	Gln	Leu	Glu	
			100					105					110			
Gln	Asn	Val	Tyr	Gly	Ile	Thr	Ile	Ile	Ser	Gly	Leu	Pro	Pro	Glu	Lys	
		115					120					125				
Pro	Lys	Asn	Leu	Ser	Cys	Ile	Val	Asn	Glu	Gly	Lys	Lys	Met	Arg	Cys	
	130					135					140					
Glu	Trp	Asp	Gly	Gly	Arg	Glu	Thr	His	Leu	Glu	Thr	Asn	Phe	Thr	Leu	
145					150					155					160	
Lys	Ser	Glu	Trp	Ala	Thr	His	Lys	Phe	Ala	Asp	Cys	Lys	Ala	Lys	Arg	
				165					170					175		
Asp	Thr	Pro	Thr	Ser	Cys	Thr	Val	Asp	Tyr	Ser	Thr	Val	Tyr	Phe	Val	
			180					185					190			
Asn	Ile	Glu	Val	Trp	Val	Glu	Ala	Glu	Asn	Ala	Leu	Gly	Lys	Val	Thr	
		195					200					205				
Ser	Asp	His	Ile	Asn	Phe	Asp	Pro	Val	Tyr	Lys	Val	Lys	Pro	Asn	Pro	
	210					215					220					
Pro	His	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Asn	Ser	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Ile	Leu	
225					230					235					240	
Lys	Leu	Thr	Trp	Thr	Asn	Pro	Ser	Ile	Lys	Ser	Val	Ile	Ile	Leu	Lys	
				245					250					255		
Tyr	Asn	Ile	Gln	Tyr	Arg	Thr	Lys	Asp	Ala	Ser	Thr	Trp	Ser	Gln	Ile	
			260					265					270			

ES 2 618 550 T3

Pro Pro Glu Asp Thr Ala Ser Thr Arg Ser Ser Phe Thr Val Gln Asp
 275 280 285

Leu Lys Pro Phe Thr Glu Tyr Val Phe Arg Ile Arg Cys Met Lys Glu
 290 295 300

Asp Gly Lys Gly Tyr Trp Ser Asp Trp Ser Glu Glu Ala Ser Gly Ile
 305 310 315 320

Thr Tyr Glu Asp Arg Pro Ser Lys Ala Pro Ser Phe Trp Tyr Lys Ile
 325 330 335

Asp Pro Ser His Thr Gln Gly Tyr Arg Thr Val Gln Leu Val Trp Lys
 340 345 350

Thr Leu Pro Pro Phe Glu Ala Asn Gly Lys Ile Leu Asp Tyr Glu Val
 355 360 365

Thr Leu Thr Arg Trp Lys Ser His Leu Gln Asn Tyr Thr Val Asn Ala
 370 375 380

Thr Lys Leu Thr Val Asn Leu Thr Asn Asp Arg Tyr Leu Ala Thr Leu
 385 390 395 400

Thr Val Arg Asn Leu Val Gly Lys Ser Asp Ala Ala Val Leu Thr Ile
 405 410 415

Pro Ala Cys Asp Phe Gln Ala Thr His Pro Val Met Asp Leu Lys Ala
 420 425 430

Phe Pro Lys Asp Asn Met Leu Trp Val Glu Trp Thr Thr Pro Arg Glu
 435 440 445

Ser Val Lys Lys Tyr Ile Leu Glu Trp Cys Val Leu Ser Asp Lys Ala
 450 455 460

Pro Cys Ile Thr Asp Trp Gln Gln Glu Asp Gly Thr Val His Arg Thr
 465 470 475 480

Tyr Leu Arg Gly Asn Leu Ala Glu Ser Lys Cys Tyr Leu Ile Thr Val
 485 490 495

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

ES 2 618 550 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 618 550 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gly Gly Tyr Met Pro Gln
915

<210> 167
<211> 30
5 <212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
10 <223> Vh3_DP-86_(3-66) FW1

<400> 167

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ile Ser
20 25 30

15 <210> 168
<211> 14

ES 2 618 550 T3

<212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 5 <223> Vh3_DP-86_(3-66) FW2

 <400> 168

 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
 5 10

 10 <210> 169
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 15 <220>
 <223> Vh3_DP-86_(3-66) FW3

 <400> 169

 20 Arg Phe Thr Met Ser Arg Asp Ile Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
 5 10 15

 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

 <210> 170
 <211> 11
 25 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <223> Vh3_DP-86_(3-66) FW4

 30 <400> 170

 Trp Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 5 10

 35 <210> 171
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

 40 <220>
 <223> Vk1_L12 FW1

 <400> 171

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

 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

 45

 <210> 172
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> *Homo sapiens*

 <220>
 <223> Vk1_L12 FW2

ES 2 618 550 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Arg Gln Met
 210

<210> 176
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>

ES 2 618 550 T3

<223> IL-6 de longitud completa mutante en Ser204Glu

<400> 176

5

```

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

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

Gly Glu Asp Ser Lys Asp Val Ala Ala Pro His Arg Gln Pro Leu Thr
          35          40          45
Ser Ser Glu Arg Ile Asp Lys Gln Ile Arg Tyr Ile Leu Asp Gly Ile
          50          55          60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Arg Gln Met
          210

```

<210> 177
 <211> 212
 <212> PRT

10

ES 2 618 550 T3

<213> *Homo sapiens*

<220>

<223> IL-6 de longitud completa mutante en Arg207Glu

5

<400> 177

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Arg Gln Met
210

10

<210> 178

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

5 <220>
<223> IL-6 de longitud completa mutante en Phe106Glu

<400> 178

ES 2 618 550 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Arg Gln Met
 210

<210> 179
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

ES 2 618 550 T3

<220>

<223> IL-6 de longitud completa mutante en Gln211Ala

<400> 179

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Arg Ala Met
 210

ES 2 618 550 T3

<210> 180
<211> 212
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<220>
<223> IL-6 de longitud completa mutante en Arg58Glu

10

<400> 180

ES 2 618 550 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Arg Gln Met
 210

<210> 181
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>

ES 2 618 550 T3

<223> IL-6 de longitud completa mutante en Glu200Trp

<400> 181

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Arg Gln Met
210

5

<210> 182

ES 2 618 550 T3

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

5 <220>
 <223> IL-6 de longitud completa mutante en Arg207Leu

<400> 182

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10

ES 2 618 550 T3

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

Leu Arg Gln Met
 210

5 <210> 183
 <211> 33
 <212> ADN
 <213> *Macaca fascicularis*

10 <220>
 <223> Cebador maclL6_5'Ndel

<400> 183
 ttatcatatg gtactcccag gagaagattc caa 33

15 <210> 184
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> *Macaca fascicularis*

20 <220>
 <223> Cebador maclL6_3'Nhel

<400> 184
 ttatgctagc ctacatttgc cgaagagccc 30

25 <210> 185
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

30 <220>
 <223> Cebador hIL6_5'Ndel

<400> 185
 ttatacatat ggtacccccca ggagaagatt cc 32

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula de anticuerpo aislada para IL-6 humana que comprende un dominio VH que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112 y un dominio VL que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 117.
2. Una composición que comprende una molécula de anticuerpo aislada según reivindicación 1, y un excipiente farmacéuticamente aceptable, para su uso en un método de tratamiento de un trastorno del cuerpo humano o animal por terapia.
- 10 3. Uso de una molécula de anticuerpo aislada según de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para tratar un trastorno asociado a IL-6, en el que el trastorno es una enfermedad inflamatoria y/o autoinmunitaria, o en el que el trastorno es un tumor y/o cáncer.
- 15 4. La composición para su uso de la reivindicación 2 o el uso de la reivindicación 3, en la que el trastorno está seleccionado del grupo que consiste en artritis reumatoide, osteoartritis, caquexia, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, artritis idiopática juvenil, artritis crónica juvenil, asma, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, aterosclerosis, enfermedad de Castleman, melanoma, carcinoma de células renales, sarcoma de Kaposi, carcinoma de ovario, linfoma, leucemia, mieloma múltiple, carcinoma de próstata.
- 20 5. Una molécula de ácido nucleico aislada que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de anticuerpo aislada según la reivindicación 1.
6. Una célula huésped *in vitro* transformada con ácido nucleico según la reivindicación 5.

Figura 1

