(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 624 547**

(51) Int. Cl.:

C07H 21/04	(2006.01)
A01K 67/00	(2006.01)
A01H 5/00	(2006.01)
C07K 16/00	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
C12N 15/00	(2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.10.2002** **E 10179049 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.03.2017** **EP 2308888**

(54) Título: **Anticuerpos anti iL 6, composiciones, métodos y usos**

(30) Prioridad:

14.11.2001 US 332743 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
14.07.2017

(73) Titular/es:

JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US

(72) Inventor/es:

GILES-KOMAR, JILL;
KNIGHT, DAVID;
PERITT, DAVID y
TRIKHA, MOHIT

(74) Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 624 547 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).

Anticuerpos anti iL-6, composiciones, métodos y usos

Descripción

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a anticuerpos, incluidas variantes o porciones especificadas, específicas para al menos una proteína interleucina-6 (IL-6 también conocida como interferón β2) o fragmento de la misma, así como los ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos anti-IL-6, ácidos nucleicos complementarios, vectores, células hospedadoras y métodos para crear y utilizar los mismos, incluidos dispositivos, administración y formulaciones terapéuticas.

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

La interleucina-6 (IL-6) es una citocina pro-inflamatoria que es producida por muchos tipos diferentes de células. *In vivo*, las células endoteliales, los fibroblastos y los monocitos estimulados representan las principales fuentes de IL-6. Otras células tales como macrófagos, linfocitos T y B, granulocitos, queratinocitos, mastocitos, osteoblastos, condrocitos, células gliales y células del músculo liso también producen IL-6 tras ser estimulados (Kishimoto, T., Blood 74:1-10 (1989) y Kurihara, N. *et al*., J. Immunology 144:4226-4230 (1990)). Varias células tumorales también producen IL-6 (Smith, P.C. *et al*. Cytokine and Growth Factor Reviews 12:33-40 (2001)) y, recientemente, se ha indicado que IL-6 es un factor pronóstico de la evolución del cáncer de próstata (Nakashima, J. *et al*. Clinical Cancer Research 6:2702-2706 (2000)). La producción de IL-6 puede ser regulada por la propia IL-6 y dependiendo del tipo de célula, la IL-6 puede estimular o inhibir su propia síntesis.

La IL-6 puede unirse al receptor de IL-6 expresado en monocitos periféricos, linfocitos T y linfocitos B activados por mitógenos, y determinados tumores (Ishimi, Y. *et al*., J. Immunology 145:3297-3303 (1990)). El receptor de IL-6 tiene al menos dos componentes diferentes y está compuesto por una cadena alfa denominada gp80 que es responsable de la unión de IL-6 y una cadena beta denominada gp130 que es necesaria para la transducción de señales (Adebanjo, O. *et al*., J. Cell Biology 142:1347-1356 (1998) y Poli, V. *et al*., EMBO 13:1189-1196 (1994)). La familia de citocinas que incluye IL-6, LIF, oncostatina M, IL-11, CNTF y CT-1, todas señalizan a través de gp130 después de la unión a sus receptores afines. Además, todos los miembros de la familia de citocinas IL-6 pueden inducir la expresión hepática de proteínas de fase aguda (Bellido, T. *et al*., J. Clin. Investigation 97:431-437 (1996)). 87908790.

Existen al menos dos funciones biológicas principales de la IL-6: la mediación de las proteínas de fase aguda y actuar como factor de diferenciación y activación (Avvisti, G. *et al*., Baillieres Clinical Hematology 8:815-829 (1995) y Poli, V. *et al*., EMBO 13:1189-1196 (1994)). Las proteínas de fase aguda son conocidas por regular las respuestas inmunitarias, intervenir en la inflamación y desempeñar un papel en la remodelación tisular. Como factor de diferenciación y activación, IL-6 induce la diferenciación y secreción de anticuerpos de los linfocitos B, induce la diferenciación de linfocitos T a linfocitos T citotóxicos, activa los factores de señalización celular y promueve la hematopoyesis (Ishimi, Y. *et al*., J. Immunology 145:3297-3303 (1990)). IL-6 está implicada de manera destacada en muchos procesos y funciones corporales críticas. Como resultado, pueden potenciarse, suprimirse o impedirse los procesos fisiológicos, incluidos el metabolismo óseo, la transformación neoplásica y las respuestas inflamatoria e inmunitaria, manipulando la actividad biológica de la IL-6 *in vivo* por medio de un anticuerpo (Adebanjo, O. *et al*., J. Cell Biology 142:1347-1356 (1998)).

Aunque la IL-6 está implicada en muchas vías, los ratones knockout para IL-6 tienen un fenotipo normal, son viables y fértiles, y estos animales presentan una ligera disminución del número de linfocitos T y una disminución de la respuesta de proteínas de fase aguda a la lesión tisular (Kopf M *et al*., Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice, Nature; 368 (6469):339-42, 1994). Por el contrario, los ratones transgénicos que sobreexpresan IL-6 desarrollan una enfermedad neurológica tal como neurodegeneración, astrocitosis, vasculogénesis cerebral, y estos ratones no desarrollan una barrera hematoencefálica (Campbell *et al*., Neurologic Disease Induced in Transgenic Mice by Cerebral Overexpression of Interleukin 6 PNAS 90: 10061-10065, 1993).

Estudios recientes han indicado que un Mab contra la IL-6 puede inhibir el crecimiento *in vivo* de tumores de próstata (Smith, P.C. y Keller, E.T., The Prostate en prensa y Okamoto, M. *et al*., Cancer Research 57:141-146 (1997) y el carcinoma renal (Weissglas, M. *et al*., The Journal of Urology 153:554-557 (1995)). Además de un efecto directo sobre el crecimiento tumoral, el bloqueo de la producción de IL-6 puede también quimio-sensibilizar y potenciar la eficacia citotóxica (Smith, P.C. *et al*. Cytokine and Growth Factor Reviews 12:33-40 (2001)). Colectivamente, la literatura nos enseña que el bloqueo de la actividad de IL-6 puede inhibir la degradación ósea, el crecimiento tumoral y la caquexia por cáncer.

La inmunoterapia pasiva que emplea anticuerpos policlonales no humanos (por ejemplo, antisueros) o anticuerpos monoclonales (Mab) y fragmentos de los mismos (por ejemplo, productos de digestión proteolítica de los mismos) son posibles agentes terapéuticos que están siendo desarrollados como tratamientos para diversas enfermedades. Sin embargo, se sabe que los anticuerpos compuestos por porciones no humanas provocan una respuesta inmunitaria cuando se administran a los seres humanos. Esta respuesta inmunitaria hace que la administración repetida de anticuerpos resulte a menudo inadecuada para el tratamiento y puede dar lugar a la eliminación mediada por inmunocomplejos de los anticuerpos de la circulación, reduciendo así el beneficio terapéutico para los pacientes. Los ejemplos de afecciones que pueden atribuirse a la administración repetida de anticuerpos compuestos por porciones no humanas son la enfermedad del suero y la anafilaxia.

En un intento de evitar estos y otros problemas, se han aplicado varios enfoques, incluidos la quimerización y la "humanización" para reducir la inmunogenicidad de los anticuerpos/fragmentos de los mismos. Estos enfoques han producido anticuerpos con inmunogenicidad reducida. Estos anticuerpos son sustancialmente de origen humano, no siendo de origen humano sólo las regiones determinantes de complementariedad (CDR) y determinados restos de la región estructural que influyen en la conformación de las CDR. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales humanizados o humanos novedosos son especialmente útiles en solitario o en combinación con moléculas existentes para usos inmunoterapéuticos.

Por consiguiente, existe la necesidad de proporcionar anticuerpos humanos o híbridos neutralizantes de alta afinidad contra la IL-6, o fragmentos de los mismos, que superen uno más de estos problemas, así como mejoras sobre los anticuerpos conocidos o fragmentos de los mismos para su uso en la prevención, el tratamiento, la mejora o el diagnóstico de las afecciones relacionadas con la IL-6.

Los anticuerpos murinos monocolonales contra la IL-6 producidos a partir de una línea celular de hibridoma se conocen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. 5.618.700 y en la patente de EE.UU. 6.086.874. La patente de EE.UU. 5.856.135 describe anticuerpos humanos reformados contra la IL-6 humana derivados de un anticuerpo monoclonal de ratón SK2 en el que las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la región variable del anticuerpo de ratón SK2 se trasplantan a la región variable de un anticuerpo humano y se unen a la región constante de un anticuerpo humano.

Se han descrito y categorizado otros anticuerpos monoclonales murinos como neutralizantes, es decir, que evitan la unión al receptor, o no neutralizantes (Brakenhoff *et al*., J. Immunol. (1990) (145:561). Entre este conjunto de anticuerpos, los anticuerpos monoclonales neutralizantes contra IL-6 pueden dividirse en dos grupos; y los supuestos epítopos en la molécula de IL-6 pueden denominarse Sitio I y Sitio II. El Sitio I evita la unión a la gp80 (IL6R) y por lo tanto evita la activación de gp130. El epítopo Sitio I se caracterizó adicionalmente por comprender regiones de las porciones amino terminal y carboxilo terminal de la molécula de IL-6. Los ligantes del Sitio II evitan la activación de gp130 y por lo tanto pueden reconocer un epítopo conformacional implicado en la señalización.

En van Zaanen *et al*., British Journal of Haematology (1998) (783-790) se analiza un anticuerpo híbrido para IL-6. Se conoce un anticuerpo monoclonal para IL-6 murino denominado CLB-6/8 o CLB-8, que tiene una alta afinidad por IL-6 y se une al epítopo Sitio I (Brakenhoff *et al supra*), pero no se conocen los dominios de unión al antígeno (regiones CDR) de este anticuerpo. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, el anticuerpo murino es altamente inmunogénico en los seres humanos y por lo tanto su valor terapéutico es limitado. Existe por tanto una continua necesidad de anticuerpos contra IL-6 que presenten alta afinidad y un perfil farmacéutico favorable.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona un anticuerpo híbrido, humanizado o CDR injertado o fragmento de anticuerpo capaz de inhibir la IL-6 humana que comprende regiones determinantes complementarias (CDR) de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 derivado de un anticuerpo anti-IL-6 monoclonal murino CLB 8 y una región constante derivada de una o más anticuerpos humanos, en donde dicho anticuerpo híbrido, humanizado o CDR injertado o fragmento de anticuerpo se une a IL-6 con una afinidad (Kd) de al menos 10^{-9} M.

La invención también proporciona un anticuerpo híbrido, humanizado o CDR injertado anti-IL-6 aislado o porción específica o variante, que comrpende una región variable murina y una constante humana en donde dicho anticuerpo o porción específica o variente se une específicamente a al menos un epítopo que comprende al menos 1-6 de los aminoácidos Gln29-Leu34 de IL-6 humano, en donde dicho anticuerpo o porción específica o variante se une a IL-6 con una afinidad de al menos 10^{-9} M.

La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la invención.

La invención también proporciona un vector y una célula hospedadora que comprende el ácido nucleico de la invención.

La invención también proporciona un método para producir al menos un fragmento o anticuerpo anti-IL-6, que comprende traducir un ácido nucleico de la invención, en condiciones *in vitro*, *in vivo* o *in situ*, de manera que el fragmento o anticuerpo anti-IL-6 se exprese en cantidades detectables o recuperables.

La invención también proporciona una composición de anticuerpo anti-IL-6 o composición de porción específica o variante, que comprende un anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante de acuerdo con la invención.

La invención también proporciona un dispositivo médico, que comprende al menos un anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante de acuerdo con la invención, en donde dicho dispositivo es adecuado para poner en contacto o administrar al menos un anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante por la menos un modo seleccionado de intravenoso, intracular, bolo, subcutáneo, respiratorio, inhalación, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmico.

La invención también proporciona una formulación que comprende al menos un anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante de acuerdo con la invención, y al menos uno seleccionado de agua estéril, agua tamponada estéril o al menos un conservante seleccionado del grupo que consiste de fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, nitrito fenilmercúrico, fenoxietanol, formaldehído, clorobutanol, cloruro de magnesio, alquilparabeno, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato sódico y timerosal, o mezclas de los mismos, en un diluyente acuoso.

La invención también proporciona un artículo de fabricación para el uso farmacéutico humano, que comprende material de envasado y un contenedor que comprende una solución o una forma liofilizada de al menos un anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante de acuerdo con la invención.

La invención también proporciona al menos un anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante de acuerdo con la invención, que comprende proporionar una célula hospedadora o animal transgénico o planta transgénica o célula vegetal capaz de expresar en cantidades recuperables dicho anticuerpo o porción específica o variante.

La invención también proporciona un animal transgénico no humano o planta que expresa al menos un anticuerpo de acuerdo con la invención.

Los anticuerpos incluyen aquellos anticuerpos híbridos, humanizados y/o con injerto de CDR que inhiben competitivamente la unión *in vivo* a la IL-6 humana del CLB-8 murino anti-IL-6, el CLB-8 anti-IL-6 híbrido, o un anticuerpo que tenga substancialmente las mismas características de unión, así como fragmentos y regiones del mismo.

Los anticuerpos descritos en el presente documento se unen a epítopos reconocidos por CLB-8 y cCLB-8, que se incluyen en el epítopo Sitio I tal como describen Brackenhoff *et al*. (*supra*). Los métodos preferentes para determinar la afinidad y especificidad del anticuerpo monoclonal por inhibición competitiva pueden encontrarse en Harlow, *et al*., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1988). Al menos un anticuerpo descrito en el presente documento se une a al menos un epítopo especificado específico para la proteína IL-6 humana, subunidad, fragmento, porción, o cualquier combinación de las mismas, al que se une el anticuerpo monoclonal CLB-8. El epítopo puede comprender al menos una región de unión al anticuerpo al que se une el anticuerpo CLB-8, epítopo que está compuesto preferentemente por al menos 1-5 aminoácidos de al menos una porción del mismo, tales como, pero no limitados a, al menos un dominio funcional, extracelular, soluble, hidrófilo, externo o citoplásmico de la proteína IL-6 humana, o cualquier porción de la misma.

En el presente documento se describe un anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6 de mamífero aislado, que comprende al menos una región variable que comprende la SEC ID Nº: 7 u 8 y las secuencias de ácidos nucleicos que las codifican (SEC ID Nº: 15 ó 16).

En el presente documento también se describe un anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6 de mamífero aislado, que comprende (i) la totalidad de las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la cadena pesada según las SEQ ID Nº: 1, 2 y 3 y las secuencias de ácidos nucleicos que las codifican (SEQ ID Nº: 9-11), o (ii) todas las secuencias de aminoácidos de las CDR de la cadena ligera de las SEQ ID Nº: 4, 5 y 6 y las secuencias de ácidos nucleicos que las codifican (SEQ ID Nº: 12-14).

En el presente documento también se describe un anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6 de mamífero aislado, que comprende al menos una CDR de la cadena pesada o de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de al menos una de las SEC ID Nº: 1, 2, 3, 4, 5 ó 6 y las secuencias de ácidos nucleicos que las codifican (SEQ ID Nº: 9-14).

En el presente documento también se describe un anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6 híbrido, humanizado o con

injerto de CDR de mamífero aislado, que comprende al menos una CDR humana, en el que el anticuerpo se une específicamente a al menos un epítopo que comprende al menos 1-3 aminoácidos del epítopo de la IL-6 humana al que se une el anticuerpo CLB-8.

El al menos un anticuerpo puede unirse adicionalmente de manera opcional a IL-6 con una afinidad (K_d) de al menos 10^{-9} M, preferentemente al menos 10^{-10} M, y/o neutralizar sustancialmente al menos una actividad de al menos una proteína IL-6. En una forma de realización preferente, el anticuerpo se une a IL-6 con una afinidad (K_d) de al menos 1×10^{-11} M, preferentemente 5×10^{-11} neutraliza la IL-6 humana.

En el presente documento también se describen moléculas aisladas de ácidos nucleicos que comprenden, complementarias a, o que hibridan con, un polinucleótido que codifica los anticuerpos anti-IL-6 específicos anteriormente mencionados, que comprenden al menos un dominio, porción, secuencia especificada o variante de los mismos. La presente invención proporciona adicionalmente vectores recombinantes que comprenden moléculas de ácido nucleico de anticuerpo anti-IL-6 de las células hospedadoras de la invención que contienen tales ácidos nucleicos y/o vectores recombinantes, así como métodos de fabricación y/o uso de tales ácidos nucleicos de anticuerpo, vectores y/o células hospedadoras. Por lo tanto, la invención comprende un ácido nucleico aislado que codifica un anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6 de la invención; un vector del ácido nucleico aislado que comprende el ácido nucleico aislado, y/o una célula hospedadora procariota o eucariota que comprende el ácido nucleico aislado. La célula hospedadora puede ser opcionalmente al menos una seleccionada de entre COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, células de mieloma o de linfoma, o cualquier célula derivada, inmortalizada o transformada de las mismas. También se proporciona un método para producir al menos un anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6 de la invención, que comprende traducir el ácido nucleico que codifica el anticuerpo en condiciones *in vitro*, *in vivo* o *in situ*, de manera que el anticuerpo para IL-6 se exprese en cantidades detectables o recuperables.

En el presente documento se describe un anticuerpo anti-idiotipo para IL-6 contra al menos un anticuerpo anti-IL-6 cCLB-8 de la presente invención. El anticuerpo anti-idiotipo incluye cualquier molécula que contiene péptido o proteína que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, tal como, pero no limitada a, al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión a ligando de la misma, una región variable de la cadena pesada o de la cadena ligera, una región constante de la cadena pesada o de la cadena ligera, una región estructural, o cualquier porción de las mismas, que pueda incorporarse en un anticuerpo anti-idiotipo contra el anticuerpo de la presente invención. Un anticuerpo anti-idiotipo puede incluir o derivarse de cualquier mamífero, tal como, pero no limitado a un ser humano, un ratón, un conejo, un roedor, un primate, y similares.

En el presente documento también se describen moléculas aisladas de ácidos nucleicos que comprenden, complementarias a, o que hibridan con, un polinucleótido que codifica al menos un anticuerpo anti-idiotipo para IL-6, que comprende al menos una porción, dominio o secuencia especificada, o variante de las mismas, y vectores recombinantes que comprenden dichas moléculas de ácido nucleico que codifican el anticuerpo anti-idiotipo para IL-6, células hospedadoras que contienen tales ácidos nucleicos y/o vectores recombinantes, así como métodos de fabricación y/o uso de tales ácidos nucleicos de anticuerpo anti-idiotipo, vectores y/o células hospedadoras.

La presente invención también proporciona al menos un método para expresar al menos un anticuerpo anti-IL-6 anteriormente mencionado, en una célula hospedadora, que comprende cultivar una célula hospedadora como se describe en el presente documento en condiciones en las que al menos un anticuerpo anti-IL-6 se expresa en cantidades detectables y/o recuperables.

También se proporciona un método para producir al menos un anticuerpo anti-IL-6 aislado de la presente invención, que comprende proporcionar un animal transgénico o una planta transgénica o célula vegetal capaz de expresar el anticuerpo en cantidades recuperables. En la presente invención se proporciona adicionalmente al menos un anticuerpo anti-IL-6 producido mediante el método anterior.

La presente invención también proporciona al menos una composición que comprende (a) un anticuerpo y/o ácido nucleico que codifica el anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6 aislado de la invención; y (b) un vehículo o diluyente adecuado. El vehículo o diluyente puede ser opcionalmente farmacéuticamente aceptable, de acuerdo con los vehículos o diluyentes conocidos. La composición puede comprender adicionalmente de manera opcional al menos una composición, proteína o compuesto adicional.

La presente invención proporciona adicionalmente al menos una composición o anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6, para administrar una cantidad terapéuticamente eficaz para modular o tratar al menos una afección relacionada con IL-6 en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, y/o, antes de, después de, o durante una afección relacionada, como se conoce en la técnica y/o como se describe en el presente documento. En el presente documento se describe un método para diagnosticar o tratar una afección relacionada con IL-6 en una célula, tejido, órgano o animal, que comprende poner en contacto o administrar una composición que comprende una cantidad eficaz del menos un anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6 aislado de la invención, con o a, la célula, tejido, órgano o animal. El

método puede comprender adicionalmente de manera opcional el uso de una cantidad eficaz de 0,001 mg/kg-50 mg/kg de las células, tejido, órgano o animal. El método puede comprender adicionalmente de manera opcional utilizar la puesta en contacto o la administración por al menos una vía seleccionada de entre parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelial, intracerebelar, intracerebroventricular, intracolónica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraosteal, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniana, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, transdérmica o por bolo. El método puede comprender adicionalmente de manera opcional la administración, antes, al mismo tiempo, o después de la administración o la puesta en contacto del anticuerpo, de al menos una composición que comprenda una cantidad eficaz de al menos un compuesto o proteína seleccionada de entre al menos uno de un indicador o marcador detectable, un antagonista de TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromsucular, un antimicrobiano, un antipsoriásico, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una epoetina, una vacunación, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de sustitución hormonal, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo de la misma, un agente citotóxico u otro agente anticanceroso, un antimetabolito tal como metotrexato, un agente antiproliferativo, una citocina o un antagonista de citocinas.

La presente invención proporciona adicionalmente al menos un anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6 para el diagnóstico de al menos una afección relacionada con IL-6 en una célula, tejido, órgano, animal o paciente y/o, antes de, después de, o durante una afección relacionada, como se conoce en la técnica y/o como se describe en el presente documento.

La presente invención también proporciona al menos una composición o dispositivo que comprende al menos un anticuerpo anti-IL-6, según la presente invención.

También se proporciona una composición que comprende un anticuerpo de la invención y al menos un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable. La composición puede comprender adicionalmente de manera opcional una cantidad eficaz de al menos un compuesto o proteína seleccionada de entre al menos uno de un indicador o marcador detectable, un agente citotóxico u otro agente anticanceroso, un antimetabolito tal como metotrexato, un agente antiproliferativo, una citocina, o un antagonista de citocinas, un antagonista de TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, una bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriásico, un corticosteroide, un esteroide anabólico, una epoetina, una vacunación, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de sustitución hormonal, un radiofármaco, un antidepresivo, un antipsicótico, un estimulante, un medicamento para el asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, una epinefrina o análogo.

También se proporciona un dispositivo médico, que comprende al menos un anticuerpo anti-IL-6 de la invención, en el que el dispositivo es adecuado para poner en contacto o administrar el al menos un anticuerpo anti-IL-6 por al menos una vía seleccionada de entre parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelial, intracerebelar, intracerebroventricular, intracolónica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraosteal, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniana, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, transdérmica o por bolo.

También se proporciona un artículo de fabricación para uso diagnóstico o farmacéutico en seres humanos, que comprende material de envasado y un recipiente que comprende una solución o una forma liofilizada de al menos un anticuerpo anti-IL-6 de la presente invención. El artículo de fabricación puede comprender opcionalmente disponer del recipiente como un componente de un sistema o dispositivo de administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelial, intracerebelar, intracerebroventricular, intracolónica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraosteal, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniana, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, transdérmica o por bolo.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Gráfico que muestra la unión de cCLB8 a la IL-6 recombinante humana.

Figura 2: Gráfico que muestra la inhibición de la secreción de IgM mu mediada por IL-6 de las células SKW6.4 por cCLB8.

Figura 3: Gráfico que muestra la inhibición de la producción de MCP-1 mediada por IL-6 por cCLB8.

Figura 4: Imagen de una transferencia de Western que muestra la inhibición por cCLB8 de la señalización de IL-6 en células THP-1 de leucemia monocítica humana.

Figura 5: Gráfico que muestra la inhibición por cCLB8 de la producción de amiloide A sérico inducida por IL-6 de las células HepG2.

Figura 6: Gráfico que muestra la capacidad de cCLB8 para neutralizar la proliferación celular inducida por rhIL-6.

Figura 7: Gráfico que muestra la reducción relativa de la pérdida de peso corporal del hospedador en ratones portadores de tumores humanos tratados con anticuerpos anti-IL-6 humana y anti-IL-6 de ratón.

La Figura 8A-G: Gráfico que muestra los perfiles del estudio de inhibición sérica de 7 anticuerpos anti-idiotipo.

Figura 9: Gráfico que muestra la inhibición de la unión de cCLB8 a la IL-6 humana por los Mab anti-id (anticuerpos monoclonales anti-idiotipo).

Figura 10: Gráfico que muestra la unión del anti-id a cCLB-8 previamente unido a IL-6 humana.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Citas

Las siguientes referencias son pertinentes: Ausubel, *et al*., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, *et al*., Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow y Lane, Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, *et al*., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan *et al*., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

Códigos de aminoácidos

Los aminoácidos que componen los anticuerpos anti-IL-6 de la presente invención suelen estar abreviados. Las denominaciones de aminoácidos pueden indicarse denominando al aminoácido por su código de una sola letra, su código de tres letras, nombre, o codón(es) de tres nucleótidos como se entiende bien en la técnica (véase Alberts, B., *et al*., Molecular Biology of The Cell, Tercera Ed., Garland Publishing, Inc., Nueva York, 1994).

Definiciones

Tal como se utiliza en el presente documento, un "anticuerpo cCLB-8 anti-interleucina-6", "anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6", "porción de anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6" o "fragmento de anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6" y/o "variante de anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6" y similares incluye cualquier péptido o proteína que contiene una molécula que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, que contiene al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera o una porción de unión a ligando de la misma derivada del anticuerpo monoclonal CLB-8 murino en combinación con una región variable de la cadena pesada o de la cadena ligera, una región constante de la cadena pesada o de la cadena ligera, una región estructural, o cualquier porción de las mismas, de origen no murino, preferentemente de origen humano, que puede incorporarse en un anticuerpo de la presente invención. Tal anticuerpo es capaz de modular, disminuir, antagonizar, mitigar, aliviar, bloquear, inhibir, anular y/o interferir con al menos la unión o una actividad de IL-6, o con la unión o actividad del receptor de IL-6, *in vitro*, *in situ* y/o *in vivo*. Como ejemplo no limitativo, una variante, porción especificada o anticuerpo anti-IL-6 adecuado de la presente invención puede unirse con alta afinidad a un epítopo inhibidor y/o neutralizante de la IL-6 humana reconocido por el anticuerpo monoclonal CLB-8. Una variante, porción especificada o anticuerpo anti-IL-6 adecuado también puede influir opcionalmente en al menos una de entre la función o actividad de IL-6, tal como, pero no limitada a, la síntesis de ARN, ADN o proteínas, la liberación de IL-6, la señalización del receptor de IL-6, la escisión de IL-6 de membrana, la actividad de IL-6, la producción y/o síntesis de IL-6.

El término "anticuerpo" pretende abarcar adicionalmente anticuerpos, fragmentos de digestión, porciones especificadas y variantes de los mismos, que incluye miméticos de anticuerpo o comprende porciones de anticuerpos que imitan la estructura y/o función de un anticuerpo o fragmento especificado o porción del mismo, incluidos anticuerpos monocatenarios y fragmentos de los mismos; conteniendo cada uno al menos una CDR derivada del anticuerpo monoclonal CLB-8. Los fragmentos funcionales incluyen fragmentos de unión al antígeno que se unen a la IL-6 de mamífero. Por ejemplo, la invención abarca fragmentos de anticuerpos capaces de unirse a

IL-6 o a porciones de la misma, incluidos, pero no limitados a fragmentos Fab (por ejemplo, mediante digestión con papaína), Fab' (por ejemplo, mediante digestión con pepsina y reducción parcial) y $F(ab')_2$ (por ejemplo, mediante digestión con pepsina), facb (por ejemplo, mediante digestión con plasmina), pFc' (por ejemplo, mediante digestión con pepsina o plasmina), Fd (por ejemplo, mediante digestión con pepsina, reducción parcial y reagregación), Fv o scFv (por ejemplo, mediante técnicas de biología molecular) (véase, por ejemplo, Colligan, Immunology, *supra*).

Tales fragmentos pueden producirse mediante técnicas recombinantes, de síntesis o escisión enzimática, como se conoce en la técnica y/o como se describe en el presente documento. Los anticuerpos también pueden producirse en diversas formas truncadas utilizando genes de anticuerpos en los que se han introducido uno o más codones de terminación cadena arriba del sitio de terminación natural. Por ejemplo, puede diseñarse un gen de combinación que codifica una porción de la cadena pesada de $F(ab')_2$ para que incluya secuencias de ADN que codifican el dominio CH_1 y/o la región bisagra de la cadena pesada. Las diversas porciones de anticuerpos pueden unirse entre sí químicamente mediante técnicas convencionales, o pueden prepararse como una proteína contigua mediante técnicas de ingeniería genética.

Tal como se utilizan en el presente documento, anticuerpos "híbridos" o anticuerpos "humanizados" o "con injerto de CDR" incluyen cualquier combinación de las CDR murinas descritas en el presente documento con una o más proteínas o péptidos derivados de un anticuerpo no murino, preferentemente humano. Se proporcionan anticuerpos híbridos o humanizados en los que las CDR se derivan del anticuerpo CLB-8 murino capaz de unirse a la IL-6 humana y al menos una porción, o el resto del anticuerpo se deriva de uno o más anticuerpos humanos. Por lo tanto, la parte humana del anticuerpo puede incluir la región estructural, los dominios C_L, C_H (por ejemplo, C_H1, C_H2, C_H3), las regiones bisagra, (V_L, V_H)) que son sustancialmente no inmunogénicas en los seres humanos. Las regiones del anticuerpo que se derivan de anticuerpos humanos no necesitan tener el 100% de identidad con los anticuerpos humanos. En una forma de realización preferente, se conservan tantos restos de aminoácidos humanos como sea posible a fin de que la inmunogenicidad sea insignificante, pero pueden modificarse los restos humanos según sea necesario para soportar el sitio de unión al antígeno formado por las CDR maximizando a la vez la humanización del anticuerpo. Tales cambios o variaciones reducen o conservan opcional y preferentemente la inmunogenicidad en los seres humanos u otras especies con respecto a los anticuerpos no modificados. Hay que señalar que un anticuerpo humanizado puede ser producido por un animal no humano o una célula procariota o eucariota que sea capaz de expresar genes de la inmunoglobulina humana funcionalmente reordenados (por ejemplo, la cadena pesada y/o la cadena ligera). Además, cuando el anticuerpo es un anticuerpo monocatenario, puede comprender un péptido conector que no se encuentra en los anticuerpos humanos naturales. Por ejemplo, un Fv puede comprender un péptido conector, tal como de entre dos y aproximadamente ocho restos de glicina u otros restos de aminoácidos, que conecte la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Se considera que tales péptidos conectores son de origen humano.

Anticuerpos de la presente invención

Según la presente invención, el anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6 comprende un anticuerpo en el que las regiones variables se derivan del anticuerpo CLB-8 murino capaces de unirse a e inhibir la función de la IL-6 humana y las regiones constantes del anticuerpo se derivan de uno o más anticuerpos humanos. En algunos anticuerpos descritos en el presente documento, la región variable o las CDR derivadas del anticuerpo CLB-8 murino tienen preferentemente de aproximadamente un 90% a aproximadamente el 100% de identidad con la región variable o las CDR del anticuerpo CLB-8 murino, aunque se contempla cualquier modificación y todas ellas, incluidas sustituciones, inserciones y deleciones, siempre que el anticuerpo híbrido mantenga la capacidad de unirse a e inhibir la IL-6. Las regiones de los anticuerpos híbridos, humanizados o con injerto de CDR que se derivan de anticuerpos humanos no necesitan tener el 100% de identidad con los anticuerpos humanos. En una forma de realización preferente, se conservan tantos restos de aminoácidos humanos como sea posible con el fin de que la inmunogenicidad sea insignificante, pero los restos humanos, en particular los restos de la región estructural, se sustituyen según sea necesario y como se ilustra más adelante en el presente documento según la presente invención. Tales modificaciones como se describen en el presente documento son necesarias para soportar el sitio de unión al antígeno formado por las CDR, maximizando a la vez la humanización del anticuerpo.

El anticuerpo monoclonal CLB-8 murino contra la IL-6 humana es conocido en la técnica (Brakenhoff *et al*., *supra*), pero hasta ahora no se han descrito las regiones CDR de este anticuerpo. Por primera vez, en el presente documento se describen anticuerpos híbridos, humanizados o con injerto de CDR derivados de las regiones CDR del anticuerpo monoclonal CLB-8 murino y métodos para preparar tales anticuerpos. Según la presente invención, en el Ejemplo 2 se proporcionan el ADNc (SEC ID Nº: 15) y las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada (SEC ID Nº: 7) de la cadena pesada del CLB-8 murino. El ADNc y la secuencia de aminoácidos deducida de la cadena ligera del CLB-8 murino (SEC ID Nº 8) también se proporcionan en el Ejemplo 2 (SEC ID Nº: 16). Cada una de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contiene tres CDR que se combinan para formar el sitio de unión al antígeno. Las tres CDR están rodeadas por cuatro regiones FR que funcionan principalmente para soportar las CDR. Las secuencias de las CDR dentro de las secuencias de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera pueden identificarse mediante la alineación asistida por ordenador según Kabat *et al*. (1987), en Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4ª ed., United States Department of Health and Human Services, U.S.

Government Printing Office, Washington, D.C., o mediante modelización molecular de las regiones variables, por ejemplo utilizando el programa ENCAD como describe Levitt (1983) J. Mol. Biol. 168:595.

En una forma de realización preferente, las CDR se derivan del anticuerpo monoclonal murino CLB-8. Las CDR de la cadena pesada preferentes tienen las siguientes secuencias:

CDR1 SFAMS (SEQ ID Nº: 1)
CDR2 EISSGGSYTYYPDTVTG (SEQ ID Nº: 2)
CDR3 GLWGYYALDY (SEQ ID Nº: 3)

Las CDR de la cadena ligera preferentes tienen las siguientes secuencias:

CDR1 SASSSVSYMY (SEQ. ID Nº: 4)
CDR2 DTSNLAS (SEQ. ID Nº: 5)
CDR3 QQWSGYPYT (SEQ. ID Nº: 6)

Las secuencias de las CDR del anticuerpo CLB-8 murino, pueden modificarse mediante inserciones, sustituciones y deleciones en la medida en que el anticuerpo con injerto de CDR mantenga la capacidad de unirse a e inhibir la IL-6 humana. El experto en la materia puede determinar el mantenimiento de esta actividad realizando los ensayos funcionales que se describen más adelante en el presente documento. Las CDR pueden tener, por ejemplo, de aproximadamente un 50% a aproximadamente el 100% de homología con las CDR de las SEC ID Nº: 1-6. En una forma de realización preferente, las CDR tienen de aproximadamente un 80% a aproximadamente el 100% de homología con las CDR de las SEC ID Nº: 1-6. En una forma de realización más preferente, las CDR tienen de aproximadamente un 90% a aproximadamente el 100% de homología con las CDR de las SEC ID Nº: 1-6. En la forma de realización más preferente, las CDR tienen aproximadamente el 100% de homología con las CDR de las SEC ID Nº: 1-6.

Como alternativa, toda la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera del anticuerpo CLB-8 murino como se expone en el Ejemplo 2 (SEQ ID Nº 7 y 8) puede combinarse con las regiones constantes y estructural humanas para formar el anticuerpo híbrido cCLB-8 de la presente invención.

Los genes humanos que codifican las regiones constantes (C) de los anticuerpos híbridos, fragmentos y regiones de la presente invención pueden derivarse de una genoteca de hígado fetal humano, mediante métodos conocidos. Los genes de la región C humana pueden derivarse de cualquier célula humana, incluidas las que expresan y producen inmunoglobulinas humanas. La región C_H humana puede derivarse de cualquiera de las clases o isotipos conocidos de la cadenas H humanas, incluidos gamma, μ, α, δ, ε, y subtipos de las mismas, tales como G1, G2, G3 y G4. Puesto que el isotipo de la cadena H es responsable de las diversas funciones efectoras de un anticuerpo, la elección de la región C_H será guiada por las funciones efectoras deseadas, tales como fijación del complemento o la actividad en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). Preferentemente, la región C_H se deriva de gamma 1 (IgG1).

La región C_L humana puede derivarse de cualquiera de los dos isotipos de la cadena L humana, kappa o lambda, preferentemente kappa.

Los genes que codifican las regiones C de inmunoglobulina humana se obtienen de células humanas mediante técnicas de clonación convencionales (Sambrook, *et al* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) y Ausubel *et al*., eds. Current Protocols in Molecular Biology (1987-1993)). Los genes de la región C humana están fácilmente disponibles a partir de clones conocidos que contienen genes que representan las dos clases de cadena L, las cinco clases de cadena H y las subclases de las mismas. Pueden prepararse fragmentos de anticuerpos híbridos, tales como $F(ab')_2$ y Fab, diseñando un gen recombinado de la cadena H apropiadamente truncado. Por ejemplo, un gen recombinado que codifica una porción de la cadena H de un fragmento $F(ab')_2$ incluirá secuencias de ADN que codifican el dominio CH1 y la región bisagra de la cadena H, seguido de un codón de terminación de la traducción para producir la molécula truncada.

Generalmente, en un ejemplo, las regiones, fragmentos y anticuerpos híbridos de la presente invención se producen clonando segmentos de ADN que codifican las regiones de unión al antígeno de la cadena H y L del anticuerpo específico anti-IL-6 CLB-8, y uniendo estos segmentos de ADN a segmentos de ADN que codifican las regiones C_H y C_L, respectivamente, para producir genes recombinados que codifican inmunoglobulinas.

Por lo tanto, en una forma de realización preferente, se crea un gen recombinado fusionado que comprende un primer segmento de ADN que codifica al menos la región de unión al antígeno de origen no humano, tal como una región V funcionalmente reordenada con segmento de unión (J), unido a un segundo segmento de ADN que codifica al menos una parte de una región C humana.

Las secuencias de las regiones variables del anticuerpo CLB-8 murino, pueden modificarse mediante inserciones, sustituciones y deleciones en la medida en que el anticuerpo híbrido mantenga la capacidad de unirse a e inhibir la IL-6 humana. El experto en la materia puede determinar el mantenimiento de esta actividad realizando los ensayos funcionales que se describen más adelante en el presente documento. Las regiones variables pueden tener, por ejemplo, de aproximadamente un 50% a aproximadamente el 100% de homología con las regiones variables de las SEC ID Nº: 7-8. En una forma de realización preferente, las regiones variables tienen de aproximadamente un 80% a aproximadamente el 100% de homología con las regiones variables de las SEC ID Nº: 7-8. En una forma de realización más preferente, las regiones variables tienen de aproximadamente un 90% a aproximadamente el 100% de homología con las regiones variables de las SEC ID Nº: 7-8. En la forma de realización más preferente, las regiones variables tienen aproximadamente el 100% de homología con las CDR de las SEC ID Nº: 1-6.

Por razones prácticas, en el presente documento se ha adoptado el esquema de numeración de Kabat *et al*., Los restos se indican mediante guiones o números minúsculos según sea necesario para adaptar las presentes secuencias a la secuencia numerada de Kabat convencional.

En el caso de un anticuerpo humanizado o con injerto de CDR en el que la región CDR del anticuerpo CLB-8 se combina con una región humana, pueden conservarse los restos en la región FR que sean idiosincrásicos del anticuerpo original, por ejemplo, CLB-8. También pueden conservarse los restos que hayan demostrado ser críticos en la humanización de otros anticuerpos. Las anteriores directrices se siguen en la medida necesaria para soportar el sitio de unión al antígeno formado por las CDR maximizando a la vez la humanización del anticuerpo.

En el Ejemplo 2 que se presenta más adelante se muestran la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena pesada representativa derivada del anticuerpo monoclonal murino CLB-8 y un anticuerpo humano.

En el Ejemplo 2 también se muestran la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena ligera híbrida representativa derivada del anticuerpo monoclonal murino CLB-8 y un anticuerpo humano.

Se ha demostrado, según la presente invención, que un anticuerpo híbrido que contiene las regiones variables del anticuerpo CLB-8 murino es tan eficaz como el anticuerpo monoclonal murino CLB-8 en la unión a IL-6.

Pueden utilizarse métodos para obtener por ingeniería genética o humanizar anticuerpos humanos o no humanos y son bien conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado u obtenido por ingeniería genética tiene uno o más restos de aminoácidos procedentes de una fuente que es no humana, por ejemplo, pero no limitada a ratón, rata, conejo, primate no humano u otro mamífero. Estos restos de aminoácidos humanos suelen denominarse restos "de importación", que por lo general se toman de un dominio variable, constate u otro domino "de importación" de una secuencia humana conocida. Las secuencias de Ig humana conocidas se describen, por ejemplo, en www.ncbi.nim.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.sciquest.com/; www.abcam.com/;www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.cdu/~pedro/research_tools.html; www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm; www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/mikeimages.html; www.antibodyresource.com/; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html.www.immunologylink.com/; pathbox.wustl.edu/~hcenter/index.html; www.biotech.ufl.edu/~hcl/; www.pebio.com/pa/340913/340913.html; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/; www.m.ehime-u.ac.jp/~yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com/table.asp; www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html; www.biotech.ufl.edu/~fccl/protocol.html; www.isac-netorg/sites_geo.html;aximt1.imtuni-marburg.de/~rek/AEPStart.html; baserv.uci.kun.nl/~jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu/; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/ public/INTRO.html; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; imgt.cnusc.fr:8104/; www.biochem.ucl.ac.uk/~martin/abs/index.html; antibody.bath.ac.uk/; abgen.cvm.tamu.edu/lab/wwwabgen.html; www.unizh.ch/~honegger/AHOseminar/Slide01.html; www.cryst.bbk.ac.uk/~ubcg07s/; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.htm; www.path.cam.ac.uk/~mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.cryst.bioc.cam.ac.uk/~fmolina/Web-pages/Pept/spottech.html; www.jerini.de/fr_products.htm; www.patents.ibm.com/ibm.html; Kabat *et al*., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983).

Pueden utilizarse tales secuencias importadas para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, afinidad, velocidad de asociación, velocidad de disociación, avidez, especificidad, semivida, o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la técnica. Generalmente se mantienen parte o la totalidad de las secuencias de CDR humanas o no humanas mientras que las secuencias no humanas de las regiones variable y constante se reemplazan con aminoácidos humanos o de otro tipo. Los anticuerpos también pueden humanizarse opcionalmente conservando una alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, los anticuerpos humanizados pueden prepararse opcionalmente mediante un proceso de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales utilizando

modelos tridimensionales de las secuencias original y humanizada. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están comúnmente disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Existen programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de las secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. Un examen de estas presentaciones permite analizar la probable función de los restos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de restos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, pueden seleccionarse y combinarse restos de FR a partir de secuencias de importación y consenso de manera que se consiga la característica deseada del anticuerpo, tal como el aumento de afinidad por el antígeno o los antígenos diana. En general, los restos de la CDR influyen directamente y muy sustancialmente en la unión al antígeno. La humanización u obtención por ingeniería genética de anticuerpos puede realizarse mediante cualquier método conocido, tales como, pero no limitados a, los descritos en Winter (Jones *et al*., Nature 321:522 (1986); Riechmann *et al*., Nature 332:323 (1988); Verhoeyen *et al*., Science 239:1534 (1988)), Sims *et al*., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter *et al*., Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:4285 (1992); Presta *et al*., J. Immunol. 151:2623 (1993), patentes de EE.UU. Nº: 5723323, 5976862, 5824514, 5817483, 5814476, 5763192, 5723323, 5,766886, 5714352, 6204023, 6180370, 5693762, 5530101, 5585089, 5225539; 4816567, documentos PCT/: US98/16280, US96/18978, US91/09630, US91/05939, US94/01234, GB89/01334, GB91/01134, GB92/01755; WO90/14443, WO90/14424, WO90/14430, EP 229246.

La región constante humana del anticuerpo híbrido de la invención puede ser de cualquier clase (IgG, IgA, IgM, IgE, IgD, etc.) o isotipo y puede comprender una cadena ligera kappa o lambda. En una forma de realización, la región constante humana comprende un fragmento definido o cadena pesada de IgG, por ejemplo, al menos uno de los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En otra forma de realización, el anticuerpo humano anti-IL-6 humana comprende una cadena pesada de IgG1 y una cadena ligera de IgG1 K. Los anticuerpos anti-IL-6 aislados de la presente invención comprenden las secuencias de aminoácidos de anticuerpo descritas en el presente documento codificadas por cualquier polinucleótido adecuado, así como. Preferentemente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une a la IL-6 humana y, con ello neutraliza parcial o sustancialmente al menos una actividad biológica de la proteína. El anticuerpo cCLB-8, o variante o porción especificada del mismo, neutraliza preferentemente parcial o sustancialmente al menos una actividad biológica de al menos un fragmento o proteína IL-6 y de ese modo inhibe las actividades mediadas a través de la unión de la IL-6 al receptor de IL-6 o a través de otros mecanismos mediados por o dependientes de IL-6. Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "anticuerpo neutralizante" se refiere a un anticuerpo que puede inhibir una actividad dependiente de IL-6 aproximadamente un 20%-120%, preferentemente al menos aproximadamente un 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% o más dependiendo del ensayo. La capacidad de un anticuerpo anti-IL-6 para inhibir una actividad dependiente de IL-6 se evalúa preferentemente mediante al menos un ensayo de receptor o proteína IL-6 adecuado, tal como se describe en el presente documento y/o como se conoce en la técnica.

Al menos un anticuerpo de la invención se une a al menos un epítopo especificado específico para al menos una subunidad, fragmento, porción, proteína IL-6 o cualquier combinación de las mismas a las que se une el anticuerpo CLB-8. El al menos un epítopo puede comprender al menos una región de unión al anticuerpo que comprenda al menos una porción de la proteína, epítopo que está compuesto preferentemente por al menos una porción extracelular, soluble, hidrófila, externa o citoplásmica de la proteína. Generalmente, el fragmento de unión al antígeno o anticuerpo humano descrito en el presente documento comprenderá una región de unión al antígeno que comprenda al menos una región determinante de complementariedad humana (CDR1, CDR2 y CDR3) de las SEQ ID Nº 1, 2 y 3 o variante de al menos una región variable de la cadena pesada y al menos una región determinante de complementariedad humana (CDR4, CDR5 y CDR6) (SEQ ID Nº 4, 5 y 6) o variante de al menos una región variable de la cadena ligera. Como ejemplo no limitativo, el anticuerpo o variante o porción de unión al antígeno puede comprender al menos una de las CDR3 de la cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 3, y/o una CDR3 de la cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEC ID Nº: 6. En una forma de realización concreta, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede tener una región de unión al antígeno que comprenda al menos una porción de al menos una CDR de la cadena pesada (es decir, CDR1, CDR2 y/o CDR3) con la secuencia de aminoácidos de las CDR correspondientes 1, 2 y/o 3 (por ejemplo, SEQ ID Nº: 1, 2 y/o 3). En otra forma de realización concreta, el anticuerpo o variante o porción de unión al antígeno puede tener una región de unión al antígeno que comprenda al menos una porción de al menos una CDR de la cadena ligera (es decir, CDR4, CDR5 y/o CDR6) con la secuencia de aminoácidos de las correspondientes CDR 4, 5 y/o 6 (por ejemplo, SEQ ID Nº: 4, 5 y/o 6). En una forma de realización preferente, las tres CDR de la cadena pesada y las tres CDR de la cadena ligera del anticuerpo o fragmento de unión al antígeno tienen la secuencia de aminoácidos de la correspondiente CDR de al menos uno de entre mAb cCLB8, Mab híbrido anti-IL-6, como se describe en el presente documento. Tales anticuerpos pueden prepararse uniendo químicamente entre sí las diversas porciones (por ejemplo, CDR, región estructural) del anticuerpo mediante técnicas convencionales, preparando y expresando una (es decir, una o más) molécula de ácido nucleico que codifica el anticuerpo mediante técnicas convencionales de la tecnología de ADN recombinante o haciendo uso de cualquier otro método adecuado y utilizando cualquiera de los posibles codones redundantes que dará como resultado la expresión de un polipéptido, por ejemplo, la SEC ID Nº: 15 ó 16.

Pueden prepararse anticuerpos que se unen a la IL-6 humana y que comprenden las regiones CDR o la región variable de la cadena pesada o ligera definidas utilizando métodos adecuados, tales como presentación en fagos (Katsube, Y., *et al*., Int. J. Mol. Med., 1 (5):863-868 (1998)) o métodos que emplean animales transgénicos, como se conoce en la técnica y/o como se describe en el presente documento. Por ejemplo, el anticuerpo, porción especificada o variante puede expresarse utilizando el ácido nucleico codificante o porción del mismo en una célula hospedadora adecuada.

Como se ha indicado, en el presente documento también se describen anticuerpos, fragmentos de unión al antígeno, cadenas de inmunoglobulinas y CDR que comprenden aminoácidos en una secuencia que es sustancialmente igual a una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento. Tales anticuerpos anti-IL-6 pueden incluir una o más sustituciones, delaciones o adiciones de aminoácidos, ya sea a partir de mutaciones naturales o manipulación humana, tal como se especifica en el presente documento. Preferentemente, tales anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno y anticuerpos que comprenden tales cadenas o CDR pueden unirse a la IL-6 humana con alta afinidad (por ejemplo, K_D inferior o igual a aproximadamente 10^{-9} M). Las secuencias de aminoácidos que son sustancialmente iguales a las secuencias descritas en el presente documento incluyen secuencias que comprenden sustituciones conservadoras de aminoácidos, así como deleciones y/o inserciones de aminoácidos. Sustitución conservadora de aminoácidos se refiere a la sustitución de un primer aminoácido por un segundo aminoácido que tiene propiedades químicas y/o físicas (por ejemplo, carga, estructura, polaridad, hidrofobia/hidrofilia) similares a las del primer aminoácido. Las sustituciones conservadoras incluyen la sustitución de un aminoácido por otro dentro de los siguientes grupos: lisina (K), arginina (R) e histidina (H); aspartato (D) y glutamato (E); asparagina (N), glutamina (Q), serina (S), treonina (T), tirosina (Y), K, R, H, D y E; alanina (A), valina (V), leucina (L), isoleucina (I), prolina (P), fenilalanina (F), triptófano (W), metionina (M), cisteína (C) y glicina (G), F, W e Y; C, S y T.

Por supuesto, el número de sustituciones de aminoácidos que haga un experto en la materia depende de muchos factores, incluidos los descritos anteriormente. En términos generales, el número de sustituciones, inserciones o deleciones de aminoácidos para cualquier variante, fragmento o anticuerpo anti-IL-6 determinado no será superior a 40, 30, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1, tal como 1-30 o cualquier intervalo o valor en el mismo, tal como se especifica en el presente documento.

Los aminoácidos en un anticuerpo anti-IL-6 de la presente invención que son esenciales para la función pueden identificarse mediante métodos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida o mutagénesis mediante alanina (por ejemplo, Ausubel, *supra*, capítulos 8, 15; Cunningham y Wells, Science 244:1081-1085 (1989)). Este último procedimiento introduce mutaciones únicas de alanina en cada resto de la molécula. A continuación se ensayan las moléculas mutantes resultantes para determinar su actividad biológica, tal como, pero no limitada a, al menos, una actividad de neutralización de IL-6. Los sitios que son críticos para la unión de los anticuerpos también pueden identificarse mediante análisis estructural tal como cristalización, resonancia magnética nuclear o marcaje por fotoafinidad (Smith, *et al*., J. Mol. Biol. 224:899-904 (1992) y de Vos, *et al*., Science 255:306-312 (1992)).

Los anticuerpos anti-IL-6 descritos en el presente documento pueden incluir, pero no se limitan a, al menos una porción, secuencia o combinación seleccionada de entre 5 y todos los aminoácidos contiguos de al menos una de las SEQ ID Nº: 1, 2, 3, 4, 5, 6.

Un anticuerpo anti-IL-6 puede comprender adicionalmente de manera opcional un polipéptido de al menos uno de 70%-100% de los aminoácidos contiguos de al menos una de las SEQ ID Nº: 7, 8.

En una forma de realización descrita en el presente documento, la secuencia de aminoácidos de una cadena de inmunoglobulina, o porción de la misma (por ejemplo, la región variable, CDR) tiene aproximadamente un 70%-99% de identidad (por ejemplo, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o cualquier intervalo o valor en los mismos) con la secuencia de aminoácidos de la cadena correspondiente de al menos una de las SEC ID Nº: 7, 8. Por ejemplo, puede compararse la secuencia de aminoácidos de una región variable de la cadena ligera con la secuencia de la SEC ID Nº: 8, o puede compararse la secuencia de aminoácidos de una CDR3 de la cadena pesada con la SEC ID Nº: 7. Preferentemente, se determina un 70%-99% de identidad de aminoácidos (es decir, un 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o cualquier intervalo o valor en los mismos) mediante un algoritmo informático adecuado, como se conoce en la técnica.

En las SEC ID Nº: 7, 8 se proporcionan secuencias de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera ejemplares. Los anticuerpos de la presente invención, o variantes específicas de los mismos, pueden comprender multitud de restos de aminoácidos contiguos de un anticuerpo de la presente invención, en los que ese número se selecciona del grupo de números enteros que consiste en 10%-100% del número de restos contiguos en un anticuerpo anti-IL-6. Opcionalmente, esta subsecuencia de aminoácidos contiguos es de al menos aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250 o más aminoácidos de longitud, o cualquier intervalo o valor en el mismo. Además, el número de tales

subsecuencias puede ser cualquier número entero seleccionado del grupo que consiste en 1 a 20, tal como al menos 2, 3, 4 ó 5.

Como entenderán los expertos, la presente invención incluye al menos un anticuerpo biológicamente activo de la presente invención. Los anticuerpos biológicamente activos tienen una actividad específica de al menos un 20%, 30% ó 40%, y preferentemente de al menos un 50%, 60% ó 70%, y lo más preferentemente de al menos un 80%, 90% ó 95%-100% de la del anticuerpo natural (no sintético), endógeno o relacionado y conocido. Los métodos para ensayar y cuantificar las medidas de actividad enzimática y especificidad por el sustrato, son bien conocidos por los expertos en la materia.

En el presente documento también se describen fragmentos de unión al antígeno y anticuerpos humanos, como se describe en el presente documento, que se modifican mediante la unión covalente de un resto orgánico. Tal modificación puede producir un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno con propiedades farmacocinéticas mejoradas (por ejemplo, aumento de la semivida en suero *in vivo*). El resto orgánico puede ser un grupo ácido graso, un grupo éster de ácido graso o un grupo polimérico hidrófilo lineal o ramificado. En formas de realización concretas, el grupo polimérico hidrófilo puede tener un peso molecular de aproximadamente 800 a aproximadamente 120.000 Daltons y puede ser un polialcanoglicol (por ejemplo, polietilenglicol (PEG), polipropilenglicol (PPG)), polímero de hidratos de carbono, polímero de aminoácidos o polivinil pirrolidona, y el grupo ácido graso o éster de ácido graso puede comprender de aproximadamente ocho a aproximadamente cuarenta átomos de carbono.

Los fragmentos de unión al antígeno y anticuerpos modificados pueden comprender uno o más restos orgánicos que están unidos covalentemente, directa o indirectamente, al anticuerpo. Cada resto orgánico que está unido a un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno puede ser independientemente un grupo polimérico hidrófilo, un grupo ácido graso o un grupo éster de ácido graso. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "ácido graso" abarca ácidos monocarboxílicos y ácidos dicarboxílicos. Un "grupo polimérico hidrófilo", tal como se utiliza la expresión en el presente documento, se refiere a un polímero orgánico que es más soluble en agua que en octano. Por ejemplo, la polilisina es más soluble en agua que en octano. Por lo tanto, en el presente documento se describe un anticuerpo modificado mediante la unión covalente de polilisina. Los polímeros hidrófilos adecuados para modificar anticuerpos pueden ser lineales o ramificados e incluyen, por ejemplo, polialcalenglicoles (por ejemplo, PEG, monometoxi-polietilenglicol (mPEG), PPG y similares), hidratos de carbono (por ejemplo, dextrano, celulosa, oligosacáridos, polisacáridos y similares), polímeros de aminoácidos hidrófilos (por ejemplo, polilisina, poliarginina, poliaspartato y similares), óxidos de polialcano (por ejemplo, óxido de polietileno, óxido de polipropileno y similares) y polivinilpirrolidona. Preferentemente, el polímero hidrófilo que modifica el anticuerpo tiene un peso molecular de aproximadamente 800 a aproximadamente 150.000 Daltons como una entidad molecular separada. Por ejemplo pueden utilizarse $PEG_{5.000}$ y $PEG_{20.000}$, en los que el subíndice es el peso molecular medio del polímero en Daltons. El grupo polimérico hidrófilo puede sustituirse con uno a aproximadamente seis grupos alquilo, ácido graso o éster de ácido graso. Pueden prepararse polímeros hidrófilos que se sustituyen con un grupo ácido graso o éster de ácido graso empleando métodos adecuados. Por ejemplo, puede acoplarse un polímero que comprende un grupo amino a un carboxilato del ácido graso o éster de ácido graso, y puede acoplarse un carboxilato activado (por ejemplo, activado con N,N-carbonil-diimidazol) en un ácido graso o éster de ácido graso a un grupo hidroxilo en un polímero.

Los ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos adecuados para modificar los anticuerpos pueden ser saturados o pueden contener una o más unidades de insaturación. Los ácidos grasos que son adecuados para modificar los anticuerpos de la invención incluyen, por ejemplo, n-dodecanoato (C_{12}, laurato), N-tetradecanoato (C_{14}, miristato), N-octadecanoato (C_{18}, estearato), N-eicosanoato (C_{20}, araquidato), n-docosanoato (C_{22}, behenato), n-triaoctanoato (C_{30}), n-tetraoctanoato (C_{40}), *cis*-Δ9-octadecanoato (C_{18}, oleato), todos los *cis*-Δ5,8,11,14-eicosatetraenoato (C_{20}, araquidonato), ácido octanodioico, ácido tetradecanodioico, ácido octadecanodioico, ácido docosanedioico, y similares. Los ésteres de ácidos grasos adecuados incluyen monoésteres de ácidos dicarboxílicos que comprenden un grupo alquilo inferior lineal o ramificado. El grupo alquilo inferior puede comprender de uno a aproximadamente doce, preferentemente de uno a aproximadamente seis átomos de carbono.

Los fragmentos de unión al antígeno y anticuerpos humanos modificados pueden prepararse utilizando métodos adecuados, tales como por reacción con uno o más agentes de modificación. Un "agente de modificación", tal como se utiliza la expresión en el presente documento, se refiere a un grupo orgánico adecuado (por ejemplo, polímero hidrófilo, un ácido graso, un éster de ácido graso) que comprende un grupo de activación. Un "grupo de activación" es un resto químico o grupo funcional que puede, en condiciones apropiadas, reaccionar con un segundo grupo químico formando de este modo un enlace covalente entre el agente de modificación y el segundo grupo químico. Por ejemplo, los grupos de activación que reaccionan con amina incluyen grupos electrófilos tales como tosilato, mesilato, halo (cloro, bromo, fluoro, yodo), ésteres de N-hidroxisuccinimidilo (NHS), y similares. Los grupos de activación que pueden reaccionar con tioles incluyen, por ejemplo, maleimida, yodoacetilo, acriloiolo, disulfuros de piridilo, tiol del ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico (TNB-tiol), y similares. Puede acoplarse un grupo funcional aldehído a moléculas que contienen amina o hidrazida, y un grupo azida puede reaccionar con un grupo fósforo trivalente para formar enlaces fosforamidato o fosforimida. Los métodos adecuados para introducir grupos de activación en moléculas son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Academic

Press: San Diego, CA (1996)). Puede unirse un grupo de activación directamente al grupo orgánico (por ejemplo, polímero hidrófilo, ácido graso, éster de ácido graso), o a través de un resto conector, por ejemplo, un grupo divalente C_1-C_{12} en el que uno o más átomos de carbono pueden ser sustituidos por un heteroátomo tal como oxígeno, nitrógeno o azufre. Los restos conectores adecuados incluyen, por ejemplo, tetraetilenglicol, $-(CH_2)_3-$, $-NH-(CH_2)_6-NH-$, $-(CH_2)_2-NH-$ y $-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-$ $CH_2-O-CH-NH-$. Pueden producirse agentes de modificación que comprendan un resto de conector, por ejemplo, haciendo reaccionar una mono-Boc-alquildiamina (por ejemplo, mono-Boc-etilendiamina, mono-Boc-diaminohexano) con un ácido graso en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) para formar un enlace amida entre la amina libre y el carboxilato de ácido graso. El grupo protector Boc puede eliminarse del producto mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) para exponer una amina primaria que pueda acoplarse a otro carboxilato tal como se describe, o puede hacerse reaccionar con anhídrido maleico y ciclarse el producto resultante para producir un derivado maleimido activado del ácido graso. (Véase, por ejemplo, Thompson, *et al*., documento WO 92/16221).

Los anticuerpos modificados pueden producirse haciendo reaccionar un fragmento de unión al antígeno o anticuerpo humano con un agente de modificación. Por ejemplo, los restos orgánicos pueden unirse al anticuerpo de manera no específica de sitio empleando un agente de modificación que reaccione con amina, por ejemplo, un éster NHS de PEG. También pueden prepararse fragmentos de unión al antígeno o anticuerpos humanos modificados reduciendo los enlaces disulfuro (por ejemplo, enlaces disulfuro intracatenarios) de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. A continuación, el fragmento de unión al antígeno o anticuerpo reducido puede hacerse reaccionar con un agente de modificación que reaccione con tiol para producir el anticuerpo modificado. Pueden prepararse fragmentos de unión al antígeno y anticuerpos humanos modificados que comprendan un resto orgánico que se una a sitios específicos de un anticuerpo de la presente invención utilizando métodos adecuados, tales como proteólisis inversa (Fisch *et al*., Bioconjugate Chem., 3:147-153 (1992); Werlen *et al*., Bioconjugate Chem., 5:411-417 (1994); Kumaran *et al*., Protein Sci. 6(10):2233-2241 (1997); Itoh *et al*., Bioorg. Chem., 24(1): 59-68 (1996); Capellas *et al*., Biotechnol. Bioeng., 56(4):456-463 (1997)), y los métodos descritos en Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA (1996).

Los anticuerpos de la invención pueden unirse a la IL-6 humana con un amplio intervalo de afinidades (K_D). En una forma de realización preferente, al menos un mAb humano de la presente invención puede unirse opcionalmente a la IL-6 humana con alta afinidad. Por ejemplo, un mAb puede unirse a la IL-6 humana con una K_D igual o inferior a aproximadamente 10^{-7} M, tal como, pero no limitado a, 0,1-9,9 (o cualquier intervalo o valor en el mismo) X 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9},10^{-10}, 10^{-11}, 10^{-12}, 10^{-13} o cualquier intervalo o valor en los mismos.

La afinidad o avidez de un anticuerpo por un antígeno puede determinarse experimentalmente utilizando cualquier método adecuado. (Véase, por ejemplo, Berzofsky, *et al*., "Antibody-Antigen Interactions", en Fundamental Immunology, Paul, W.E., Ed., Raven Press: Nueva York, NY (1984); Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company: Nueva York, NY (1992), y los métodos descritos en el presente documento). La afinidad medida de una interacción concreta anticuerpo-antígeno puede variar si se mide en diferentes condiciones (por ejemplo, concentración salina, pH). Por lo tanto, las mediciones de afinidad y otros parámetros de unión al antígeno (por ejemplo, K_D, K_a, K_d) se realizan preferentemente con soluciones normalizadas de anticuerpo y antígeno, y un tampón normalizado, tal como el tampón descrito en el presente documento.

Los anticuerpos cCLB-8 anti-IL-6 útiles en los métodos y composiciones de la presente invención se caracterizan por una alta afinidad de unión a IL-6 y, opcional y preferentemente por tener baja toxicidad. En concreto, un anticuerpo, fragmento especificado o variante de la invención, en el que los componentes individuales, tales como la región variable, la región constante y la región estructural, de manera individual y/o colectiva, opcional y preferentemente posean baja inmunogenicidad, es útil en la presente invención. Los anticuerpos que pueden utilizarse en la invención se caracterizan opcionalmente por su capacidad para tratar a pacientes durante períodos prolongados con un alivio medible de los síntomas y toxicidad baja y/o aceptable. La baja o aceptable inmunogenicidad y/o la alta afinidad, así como otras propiedades adecuadas, pueden contribuir a los resultados terapéuticos obtenidos. "Baja inmunogenicidad" se define en el presente documento como el aumento significativo de las respuestas HAHA, HACA o HAMA en menos de aproximadamente un 75%, o preferentemente en menos de aproximadamente un 50% de los pacientes tratados y/o el aumento de títulos bajos en el paciente tratado (menos de aproximadamente 300, preferentemente menos de aproximadamente 100, medido con un inmunoensayo enzimático de doble antígeno) (Elliott *et al*., Lancet 344:1125-1127 (1994)).

Cuando el cCLB8 se compara con otros anticuerpos específicos para IL-6 CLB.IL-6/14 y CLB.IL-6/16, pueden observarse las distintas características de afinidad del anticuerpo y especificidad del epítopo. El cCLB8, un anticuerpo que se une a IL-6 y normalmente bloquea la interacción entre la IL-6 y su receptor, puede inhibir casi el 100% de la función de IL-6 como se ilustra en el bioensayo de proliferación de células 7TD1 dependiente de IL-6 y el ensayo basado en Luminex de unión de IL-6 al receptor de IL-6. Por el contrario, el CLB.IL-6/16, un anticuerpo que se une a IL-6 pero neutraliza mediante impedimento estérico la interacción entre el complejo IL-6/IL-6R y el componente de señalización gp130, puede inhibir sólo un 62% de la biotina-IL-6 unida. Por último, un anticuerpo que se une a IL-6 pero no interfiere con su actividad biológica, como en CLB.IL-6/14, no presenta ninguna inhibición de la biotina-IL-6 que se une a sIL-6R/gp80 en fase sólida.

También pueden utilizarse anticuerpos biespecíficos, heteroespecíficos, heteroconjugados o similares que sean anticuerpos monoclonales humanizados con especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En el presente caso, una de las especificidades de unión es para al menos una proteína IL-6, la otra es para cualquier otro antígeno. Los métodos para crear anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. Tradicionalmente, la producción recombinante de anticuerpos biespecíficos se basa en la co-expresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas pesadas tienen diferentes especificidades (Milstein y Cuello, Nature 305:537 (1983)). Debido a la mezcla aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una posible mezcla de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que suele hacerse mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa, y los rendimientos de producto son bajos. Se describen procedimientos similares, por ejemplo, en el documento WO 93/08829, las patentes de Estados Unidos Nº 6.210.668, 6.193.967, 6.132.992, 6.106.833, 6.060.285, 6.037.453, 6.010.902, 5.989.530, 5.959.084, 5.959.083, 5.932.448, 5.833.985, 5.821.333, 5.807.706, 5.643.759, 5.601.819, 5.582.996, 5.496.549, 4.676.980, los documentos WO 91/00360, WO 92/00373, EP 03089, Traunecker *et al*., EMBO J. 10:3655 (1991), Suresh *et al*., Methods in Enzymology 121:210 (1986).

Moléculas de ácido nucleico

Utilizando la información proporcionada en el presente documento, tal como las secuencias de nucleótidos que codifican al menos el 70%-100% de los aminoácidos contiguos de al menos una de las SEQ ID Nº: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, fragmentos especificados, variantes o secuencias de consenso de los mismos, o un vector depositado que comprende al menos una de estas secuencias, puede obtenerse una molécula de ácido nucleico que codifica al menos un anticuerpo anti-IL-6 cCLB-8 utilizando los métodos descritos en el presente documento o como se conoce en la técnica.

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención pueden estar en forma de ARN, tal como ARNm, ARNnh, ARNt o cualquier otra forma, o en forma de ADN, incluido, pero no limitado a, ADNc y ADN genómico obtenido por clonación o producido sintéticamente, o cualquier combinación de los mismos. El ADN puede ser tricatenario, bicatenario o monocatenario, o cualquier combinación de los mismos. Cualquier porción de al menos una cadena del ADN o ARN puede ser la cadena codificante, también conocida como cadena sentido, o puede ser la cadena no codificante, también conocida como cadena antisentido.

Las moléculas aisladas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden incluir moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco de lectura abierto (ORF), opcionalmente con uno o más intrones, por ejemplo, pero no limitados a, al menos una porción específica de al menos una CDR, como CDR1, CDR2 y/o CDR3 de al menos una cadena pesada (por ejemplo, SEQ ID Nº: 1-3) o cadena ligera (por ejemplo, SEQ ID Nº: 4-6); moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia codificante para un anticuerpo anti-IL-6 o región variable (por ejemplo, SEQ ID Nº: 15 ó 16); y moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos sustancialmente diferente de las descritas anteriormente pero que, debido a la degeneración del código genético, todavía codifican al menos un anticuerpo anti-IL-6 como se describe en el presente documento y/o como se conoce en la técnica. Por supuesto, el código genético es bien conocido en la técnica. Por lo tanto, sería rutinario para un experto en la materia generar tales variantes degeneradas de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos anti-IL-6 específicos de la presente invención. Véase, por ejemplo, Ausubel, *et al*., *supra*, y tales variantes de ácidos nucleicos quedan incluidas en la presente invención. Los ejemplos no limitativos de moléculas aisladas de ácido nucleico incluyen las SEQ ID Nº: 9-16; correspondientes a ejemplos no limitativos de un ácido nucleico que codifica, respectivamente, la CDR1 de HC, CDR2 de HC, CDR3 de HC, CDR1 de LC, CDR2 de LC, CDR3 de LC, la región variable de HC y la región variable de LC.

Como se indica en el presente documento, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que comprenden un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IL-6 de la invención pueden incluir, pero no se limitan a, las que codifican la secuencia de aminoácidos de un fragmento de anticuerpo, solo; la secuencia codificante para el anticuerpo entero o una porción del mismo; la secuencia codificante para un anticuerpo, fragmento o porción, así como secuencias adicionales, tales como la secuencia codificante de al menos un péptido de fusión o líder señal, con o sin las secuencias codificantes adicionales mencionadas anteriormente, tales como al menos un intrón, junto con secuencias no codificantes adicionales, incluidas pero no limitadas a, secuencias 5' y 3' no codificantes, tales como las secuencias transcritas no traducidas que juegan un papel en la transcripción, el procesamiento de ARNm, incluidas las señales de ayuste y poliadenilación (por ejemplo, unión al ribosoma y estabilidad del ARNm); una secuencia codificante adicional que codifica aminoácidos adicionales, tales como los que proporcionan funcionalidades adicionales. Por lo tanto, puede fusionarse la secuencia que codifica un anticuerpo a una secuencia marcadora, tal como una secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación del anticuerpo fusionado que comprende una porción o fragmento de anticuerpo.

Polinucleótidos que hibridan selectivamente con un polinucleótido como se describe en el presente documento

En el presente documento también se describen ácidos nucleicos aislados que hibridan en condiciones de hibridación selectiva con un polinucleótido descrito en el presente documento. Por lo tanto, estos polinucleótidos pueden utilizarse para aislar, detectar y/o cuantificar ácidos nucleicos que comprenden tales polinucleótidos. Por ejemplo, estos polinucleótidos pueden utilizarse para identificar, aislar, o amplificar clones de longitud parcial o completa en una genoteca depositada. En algunas formas de realización, los polinucleótidos son secuencias de ADNc o genómico aisladas, o bien complementarias de, un ADNc de una genoteca de ácidos nucleicos humanos o de mamífero.

Preferentemente, la genoteca de ADNc comprende al menos un 80% de secuencias de longitud completa, preferentemente al menos un 85% o un 90% de secuencias de longitud completa, y más preferentemente al menos un 95% de secuencias de longitud completa. Las genotecas de ADNc pueden normalizarse para aumentar la representación de secuencias raras. Por lo general, pero no exclusivamente, se emplean condiciones de hibridación de rigurosidad baja o moderada con secuencias que tienen una identidad de secuencia reducida con relación a las secuencias complementarias. Opcionalmente pueden emplearse condiciones de rigurosidad moderada y alta para las secuencias de mayor identidad. Las condiciones de baja rigurosidad permiten la hibridación selectiva de secuencias que tienen aproximadamente un 70% de identidad de secuencia y pueden emplearse para identificar las secuencias parálogas u ortólogas.

Opcionalmente, los polinucleótidos codificarán al menos una porción de un anticuerpo codificado por los polinucleótidos descritos en el presente documento. Los polinucleótidos abarcan secuencias de ácidos nucleicos que pueden emplearse para la hibridación selectiva con un polinucleótido que codifica un anticuerpo de la presente invención. Véase, por ejemplo, Ausubel, *supra*; Colligan, *supra*.

Construcción de ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención pueden crearse utilizando (a) métodos recombinantes, (b) técnicas de síntesis, (c) técnicas de purificación, o combinaciones de las mismas, como se conoce bien en la técnica.

Los ácidos nucleicos pueden comprender convenientemente secuencias además de un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, puede insertarse en el ácido nucleico un sitio de clonación múltiple que comprenda uno o más sitios de restricción de endonucleasas para ayudar a aislar el polinucleótido. Además, pueden insertarse secuencias traducibles para ayudar a aislar el polinucleótido traducido de la presente invención. Por ejemplo, una secuencia marcadora de hexa-histidina proporciona un medio conveniente para purificar las proteínas de la presente invención. El ácido nucleico de la presente invención - sin incluir la secuencia codificante - es opcionalmente un vector, adaptador o conector para clonar y/o expresar un polinucleótido de la presente invención.

Pueden añadirse a tales secuencias de clonación y/o expresión secuencias adicionales para optimizar su función en la clonación y/o expresión, para ayudar a aislar el polinucleótido, o para mejorar la introducción del polinucleótido en una célula. El uso de vectores de clonación, vectores de expresión, adaptadores y conectores es bien conocido en la técnica. (Véase, por ejemplo, Ausubel, *supra*, o Sambrook, *supra*)

Métodos recombinantes para la construcción de ácidos nucleicos

Las composiciones de ácidos nucleicos aislados de la presente invención, tales como ARN, ADNc, ADN genómico, o cualquier combinación de los mismos, pueden obtenerse a partir de fuentes biológicas utilizando multitud de metodologías de clonación conocidos por los expertos en la materia. En algunas formas de realización, se utilizan sondas de oligonucleótidos que hibridan selectivamente, en condiciones rigurosas, con los polinucleótidos de la presente invención para identificar la secuencia deseada en una genoteca de ADN genómico o de ADNc. El aislamiento de ARN, y la construcción de genotecas de ADNg o de ADNc, es bien conocido por los expertos habituales en la técnica. (Véase, por ejemplo, Ausubel, *supra*, o Sambrook, *supra*)

Cribado de ácidos nucleicos y métodos de aislamiento

Puede cribarse una genoteca de ADNg o de ADNc utilizando una sonda en base a la secuencia de un polinucleótido de la presente invención, tales como los descritos en el presente documento. Pueden utilizarse sondas que hibriden con secuencias de ADNc o ADN genómico para aislar genes homólogos en el mismo organismo o en organismos diferentes. Los expertos en la materia entenderán que pueden emplearse en el ensayo diversos grados de rigurosidad de hibridación, y que pueden ser rigurosos tanto la hibridación como el medio de lavado. A medida que las condiciones de hibridación se vuelven más rigurosas, debe haber un mayor grado de complementariedad entre la sonda y la diana para que se produzca la formación del dúplex. El grado de rigurosidad puede controlarse mediante uno o más de entre la temperatura, la fuerza iónica, el pH y la presencia de un disolvente parcialmente desnaturalizante tal como formamida. Por ejemplo, la rigurosidad de la hibridación se modifica convenientemente cambiando la polaridad de la solución de reaccionante a través de, por ejemplo, la

manipulación de la concentración de formamida dentro del intervalo de 0% a 50%. El grado de complementariedad (identidad de secuencia) necesario para la unión detectable variará según la rigurosidad del medio de hibridación y/o del medio de lavado. El grado de complementariedad será de manera óptima del 100%, o del 70%-100%, o cualquier intervalo o valor en el mismo. Sin embargo, debe entenderse que las variaciones minoritarias en la secuencia de las sondas y cebadores pueden ser compensadas reduciendo la rigurosidad de la hibridación y/o del medio de lavado.

Los métodos de amplificación de ARN o ADN son bien conocidos en la técnica y pueden utilizarse según la presente invención sin experimentación indebida, en base a la enseñanza y la orientación presentadas en el presente documento.

Los métodos conocidos de amplificación de ADN o ARN incluyen, pero no se limitan a, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y procesos de amplificación relacionados (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. Nº 4.683.195, 4.683.202, 4.800.159, 4.965.188, de Mullis, *et al*.; 4.795.699 y 4.921.794 de Tabor, *et al*.; 5.142.033 de Innis; 5.122.464 de Wilson, *et al*.; 5.091.310 de Innis; 5.066.584 de Gyllensten, *et al*.; 4.889.818 de Gelfand, *et al*.; 4.994.370 de Silver, *et al*.; 4.766.067 de Biswas; 4.656.134 de Ringold) y amplificación mediada por ARN que utiliza ARN antisentido con respecto a la secuencia diana como molde para la síntesis de ADN bicatenario (patente de EE.UU. Nº 5.130.238 de Malek, *et al*., con el nombre comercial NASBA). (Véase, por ejemplo, Ausubel, *supra*; O Sambrook, *supra*).

Por ejemplo, puede utilizarse la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias de polinucleótidos de la presente invención y los genes relacionados directamente de genotecas de ADNc o ADN genómico. La PCR y otros métodos de amplificación *in vitro* también pueden ser útiles, por ejemplo, para clonar secuencias de ácidos nucleicos que codifican proteínas que serán expresadas, para generar ácidos nucleicos que se utilizarán como sondas para detectar la presencia del ARNm deseado en las muestras, para la secuenciación de ácidos nucleicos, o para otros fines. Se encuentran ejemplos de técnicas suficientes para dirigir a los expertos a través de los métodos de amplificación *in vitro* en Berger, *supra*, Sambrook, *supra*, y Ausubel, *supra*, así como Mullis, *et al*., patente de EE.UU. Nº 4.683.202 (1987); e Innis, *et al*., PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990). Los kits disponibles en el mercado para la amplificación genómica por PCR son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, el kit Advantage-GC Genomic PCR (Clontech). Además, por ejemplo, puede utilizarse la proteína del gen 32 de T4 (Boehringer Mannheim) para mejorar el rendimiento de los productos de PCR largos.

Métodos de síntesis para construir ácidos nucleicos

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención también pueden prepararse por síntesis química directa mediante métodos conocidos (véase, por ejemplo, Ausubel, *et al*., *supra*). La síntesis química produce generalmente un oligonucleótido monocatenario, que puede convertirse en ADN bicatenario mediante hibridación con una secuencia complementaria, o mediante polimerización con una ADN polimerasa utilizando la cadena sencilla como molde. Un experto en la materia reconocerá que mientras que la síntesis química de ADN puede limitarse a secuencias de aproximadamente 100 o más bases, pueden obtenerse secuencias más largas mediante la ligación de secuencias más cortas.

Casetes de expresión recombinantes

La presente invención proporciona adicionalmente casetes de expresión recombinantes que comprenden un ácido nucleico de la presente invención. Puede utilizarse una secuencia de ácidos nucleicos de la presente invención, por ejemplo, una secuencia de ADNc o genómico que codifique un anticuerpo de la presente invención, para construir un casete de expresión recombinante que puede introducirse en al menos una célula hospedadora deseada. Un casete de expresión recombinante comprenderá por lo general un polinucleótido de la presente invención unido operativamente a secuencias reguladoras de inicio de la transcripción que dirigirán la transcripción del polinucleótido en la célula hospedadora prevista. Pueden emplearse promotores heterólogos y no heterólogos (es decir, endógenos) para dirigir la expresión de los ácidos nucleicos de la presente invención.

En algunas formas de realización, los ácidos nucleicos aislados que sirven como promotor, potenciador u otros elementos pueden introducirse en la posición apropiada (cadena arriba, cadena abajo o en el intrón) de una forma no heteróloga de un polinucleótido de la presente invención para aumentar o disminuir la expresión de un polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, los promotores endógenos pueden modificarse *in vivo* o *in vitro* mediante mutación, deleción y/o sustitución.

Vectores y células hospedadoras

La presente invención también se refiere a vectores que incluyen moléculas aisladas de ácido nucleico de la presente invención, células hospedadoras que se obtienen por ingeniería genética con los vectores recombinantes, y la producción de al menos un anticuerpo anti-IL-6 mediante técnicas recombinantes, como es bien

conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook, *et al*., *supra* Ausubel, *et al*., *supra*.

Los polinucleótidos pueden unirse opcionalmente a un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un hospedador. Generalmente, se introduce un vector plásmido en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, puede empaquetarse *in vitro* utilizando una línea celular de empaquetamiento apropiada y a continuación transducirse a las células hospedadoras.

El inserto de ADN debe unirse operativamente a un promotor apropiado. Los constructos de expresión contendrán adicionalmente sitios para la iniciación de la transcripción, la terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión al ribosoma para la traducción. La porción codificante de los transcritos maduros expresados por los constructos incluirá preferentemente una iniciación de la traducción al principio y un codón de terminación (por ejemplo, UAA, UGA o UAG) situado apropiadamente al final del ARNm que se traducirá, siendo preferentes UAA y UAG para la expresión de células eucariotas o de mamífero.

Los vectores de expresión incluirán, preferentemente aunque opcionalmente, al menos un marcador seleccionable. Tales marcadores incluyen, por ejemplo, pero no se limitan a, resistencia a metotrexato (MTX), dihidrofolato reductasa (DHFR, patentes de EE.UU. Nº 4.399.216, 4.634.665, 4.656.134, 4.956.288, 5.149.636, 5.179.017), ampicilina, neomicina (G418), ácido micofenólico o glutamina sintetasa (GS, patentes de EE.UU. Nº 5.122.464, 5.770.359, 5.827.739) para el cultivo de células eucariotas, y genes de resistencia a tetraciclina o ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias u organismos procariotas. Las condiciones y medios de cultivo apropiados para las células hospedadoras anteriormente descritas son conocidas en la técnica. Los vectores adecuados resultarán evidentes para el experto en la material. La introducción de un constructo vector en una célula hospedadora puede efectuarse mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros métodos conocidos. Tales métodos están descritos en la técnica, tal como Sambrook, *supra*, capítulos 1-4 y 16-18; Ausubel, *supra*, capítulos 1, 9, 13, 15, 16.

Al menos un anticuerpo de la presente invención puede expresarse en una forma modificada, tal como una proteína de fusión, y puede incluir no sólo señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Por ejemplo, puede añadirse una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, al extremo N-terminal de un anticuerpo para mejorar la estabilidad y persistencia en la célula hospedadora, durante la purificación, o durante la posterior manipulación y almacenamiento. Además, pueden añadirse restos peptídicos a un anticuerpo de la presente invención para facilitar la purificación. Tales regiones pueden eliminarse antes de la preparación final de un anticuerpo o al menos un fragmento del mismo. Tales métodos están descritos en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Sambrook, *supra*, capítulos 17.29-17.42 y 18.1-18.74; Ausubel, *supra*, capítulos 16, 17 y 18.

Los expertos en la materia son conocedores de los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de un ácido nucleico que codifique una proteína de la presente invención.

Como alternativa, los ácidos nucleicos de la presente invención pueden expresarse en una célula hospedadora mediante su activación (por manipulación) en una célula hospedadora que contiene ADN endógeno que codifica un anticuerpo de la presente invención. Tales métodos son bien conocidos en la técnica, por ejemplo, como se describe en las patentes de EE.UU. Nº 5.580.734, 5.641.670, 5.733.746 y 5.733.761.

Las células de mamífero ejemplifican cultivos celulares útiles para la producción de los anticuerpos, porciones especificadas o variantes de los mismos. Los sistemas de células de mamífero suelen estar en forma de monocapas de células aunque también pueden utilizarse biorreactores o suspensiones de células de mamífero. Se han desarrollado en la técnica varias líneas celulares hospedadoras adecuadas capaces de expresar proteínas glucosiladas intactas, e incluyen las líneas celulares COS-1 (por ejemplo, ATCC CRL 1650), COS-7 (por ejemplo, ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (por ejemplo, ATCC CRL-10), CHO (por ejemplo, ATCC CRL 1610) y BSC-1 (por ejemplo, ATCC CRL-26), células Cos-7, células CHO, células hep G2, P3X63Ag8.653, SP2/0-GA14, células 293, células HeLa y similares, que pueden adquirirse fácilmente en, por ejemplo, la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, Va (www.atcc.org). Las células hospedadoras preferentes incluyen células de origen linfoide, tales como células de mieloma y linfoma. Son células hospedadoras especialmente preferentes las células P3X63Ag8.653 (número de referencia de la ATCC CRL-1580) y las células SP2/0-Ag14 (número de referencia de la ATCC CRL-1851). En una forma de realización especialmente preferente, la célula recombinante es una célula SP2/0-Ag14 o una P3X63Ab8.653.

Los vectores de expresión para estas células pueden incluir una o más de las siguientes secuencias de control de expresión, tales como, pero no limitadas a, un origen de replicación, un promotor (por ejemplo, promotores temprano o tardío de SV40, el promotor de CMV (patentes de EE.UU. Nº 5.168.062, 5.385.839), un promotor tk de HSV, un promotor pgk (fosfoglicerato quinasa), un promotor EF-1 alfa (patente de EE.UU. Nº 5.266.491), al menos un promotor de inmunoglobulina humana; un potenciador, y/o sitios de procesamiento de la información, tales como

sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación (por ejemplo, un sitio de adición de poli A del antígeno T grande de SV40), y secuencias terminadoras de la transcripción. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al*., *supra*; Sambrook, *et al*., *supra*. Otras células útiles para la producción de los ácidos nucleicos o proteínas de la presente invención se conocen y/o están disponibles, por ejemplo, en el catálogo de líneas celulares e hibridomas de la Colección Americana de Cultivos Tipo (www.atcc.org) u otras fuentes comerciales o conocidas.

Cuando se emplean células hospedadoras eucariotas, por lo general se incorporan en el vector secuencias terminadoras de la transcripción o de poliadenilación. Un ejemplo de una secuencia terminadora es la secuencia de poliadenilación del gen de la hormona bovina de crecimiento. También pueden incluirse secuencias para un corte y empalme preciso del transcrito. Un ejemplo de una secuencia de corte y empalme es el intrón VP1 de SV40 (Sprague, *et al*., J. Virol. 45:773-781 (1983)). Además, pueden incorporarse en el vector secuencias génicas para controlar la replicación en la célula hospedadora, como se conoce en la técnica.

Producción de un anticuerpo

Al menos un anticuerpo anti-IL-6 de la presente invención puede ser opcionalmente producido por una línea celular, una línea celular mixta, una célula inmortalizada o población clonal de células inmortalizadas, como es bien conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel, *et al*., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook, *et al*., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª edición, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow y Lane, Antibodies: a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan, *et al*., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan *et al*., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

En un enfoque, se produce un hibridoma por fusión de una línea celular inmortal adecuada (por ejemplo, una línea celular de mieloma tal como, pero no limitada a, Sp2/0, SP2/0-Ag14, NSO, NS1, NS2, AE-1, L.5, >243, P3X63Ag8.653, Sp2 SA3, Sp2 MAI, Sp2 SS1, Sp2 SA5, U937, MLA 144, ACT IV, MOLT4, DA-1, JURKAT, WEHI, K-562, COS, RAJI, NIH 3T3, HL-60, MLA 144, NAMAIWA, NEURO 2A, o similares, o heteromielomas, productos de fusión de los mismos, o cualquier célula o célula de fusión derivada de los mismos, o cualquier otra línea celular adecuada como se conoce en la técnica (véase, por ejemplo, www.atcc.org, www.lifetech.com, y similares), con células productoras de anticuerpos, tales como, pero no limitadas a, células de bazo clonadas o aisladas, de sangre periférica, linfáticas, de la amígdala, u otras células que contengan linfocitos B o células inmunitarias, o cualquier otra tipo de célula que exprese secuencias de CDR o de la región estructural o constante o variable de la cadena pesada o ligera, ya sea como ácido nucleico endógeno o heterólogo, como ADN recombinante o endógeno, viral, bacteriano, de algas, procariota, de anfibios, de insectos, de reptiles, de peces, de mamífero, de roedor, equino, ovino, de cabra, de oveja, de primates, eucariota, genómico, ADNc, ADNr, ARN o ADN mitocondrial, ARN o ADN de cloroplastos, ARNnh, ARNm, ARNt, monocatenario, bicatenario o tricatenario, hibridado, y similares, o cualquier combinación de los mismos. Véase, por ejemplo, Ausubel, *supra*, y Colligan, Immunology, *supra*, capítulo 2.

También puede utilizarse cualquier otra célula hospedadora adecuada para expresar el ácido nucleico heterólogo o endógeno que codifica un anticuerpo, fragmento especificado o variante del mismo, de la presente invención. Las células fusionadas (hibridomas) o células recombinantes pueden aislarse utilizando condiciones de cultivo selectivas u otros métodos conocidos adecuados, y clonarse por dilución limitante o separación de células u otros métodos conocidos. Las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada pueden seleccionarse mediante un ensayo adecuado (por ejemplo, ELISA).

Los anticuerpos de la presente invención también pueden prepararse utilizando al menos un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IL-6 para proporcionar animales o mamíferos transgénicos, tales como cabras, vacas, caballos, ovejas, y similares, que produzcan tales anticuerpos en su leche. Pueden proporcionarse tales animales utilizando métodos conocidos. Véase, por ejemplo, pero sin limitarse a, las patentes de EE.UU. Nº 5.827.690, 5.849.992, 4.873.316, 5.849.992, 5.994.616, 5.565.362, 5.304.489, y similares.

Los anticuerpos de la presente invención pueden prepararse adicionalmente utilizando al menos un ácido nucleico que codifica un anticuerpo anti-IL-6 para proporcionar plantas y células vegetales cultivadas transgénicas (por ejemplo, pero no limitadas a, tabaco y maíz) que produzcan tales anticuerpos, porciones especificadas o variantes en las partes de la planta o en células cultivadas de las mismas. Como ejemplo no limitativo, se han utilizado con éxito hojas de tabaco transgénico que expresan proteínas recombinantes para proporcionar grandes cantidades de proteínas recombinantes, por ejemplo, utilizando un promotor inducible. Véase, por ejemplo, Cramer *et al*., Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95-118 (1999) y las referencias citadas en el mismo. Además, se ha utilizado maíz transgénico para expresar proteínas de mamífero a niveles de producción comercial, con actividades biológicas equivalentes a las producidas en otros sistemas recombinantes o purificadas a partir de fuentes naturales. Véase, por ejemplo, Hood *et al*., Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 (1999) y las referencias citadas en el mismo, también se han producido anticuerpos en grandes cantidades a partir de semillas de plantas transgénicas, incluidos fragmentos de anticuerpos, tales como anticuerpos monocatenarios (scFv), incluidas las semillas de tabaco y tubérculos de patata. Véase, por ejemplo, Conrad *et al*., Plant Mol. Biol. 38:101-109 (1998) y las referencias citadas

en el mismo. Por lo tanto, los anticuerpos de la presente invención también pueden producirse utilizando plantas transgénicas, según métodos conocidos. Véase también, por ejemplo, Fischer *et al*., Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108 (oct., 1999), Ma *et al*., Trends Biotechnol. 13:522-7 (1995); Ma *et al*., Plant Physiol. 109:341-6 (1995); Whitelam *et al*., Biochem. Soc. Trans. 22:940-944 (1994), y referencias citadas en los mismos.

Purificación de un anticuerpo

Puede recuperarse y purificarse un anticuerpo anti-IL-6 a partir de cultivos de células recombinantes mediante métodos bien conocidos, incluidos, pero no limitados a, purificación con proteína A, precipitación con etanol o sulfato de amonio, extracción de ácidos, cromatografía de intercambio aniónico o catiónico, cromatografía en fosfocelulosa, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de afinidad, cromatografía en hidroxiapatita y cromatografía en lectina. También puede emplearse para la purificación la cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC"). Véase, por ejemplo, Colligan, Current Protocols in Immunology, o Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), por ejemplo, los capítulos 1, 4, 6, 8, 9, 10.

Los anticuerpos de la presente invención incluyen productos purificados naturalmente, productos de procedimientos de síntesis química, y productos producidos mediante técnicas recombinantes a partir de un hospedador eucariota, incluidas, por ejemplo, las células de levadura, de plantas superiores, de insectos y de mamíferos. Dependiendo del hospedador empleado en un procedimiento de producción recombinante, el anticuerpo de la presente invención puede estar glicosilado o puede no estar glicosilado, siendo preferente que esté glicosilado. Tales métodos se describen en muchos manuales de laboratorio convencionales, tales como Sambrook, *supra*, secciones 17.37-17.42; Ausubel, *supra*, capítulos 10, 12, 13, 16, 18 y 20, Colligan, Protein Science, *supra*, capítulos 12-14.

Clonación y expresión del anticuerpo para IL-6 en células de mamífero

Un vector de expresión de mamífero típico contiene al menos un elemento promotor, que interviene en la iniciación de la transcripción del ARNm, la secuencia codificante del anticuerpo, y las señales requeridas para la terminación de la transcripción y la poliadenilación del transcrito. Los elementos adicionales incluyen potenciadores, secuencias de Kozak y secuencias intermedias flanqueadas por sitios donadores y aceptores de corte y empalme del ARN. Puede conseguirse una transcripción altamente eficaz con los promotores temprano y tardío de SV40, las repeticiones terminales largas (LTR) de retrovirus, por ejemplo, RSV, HTLVI, HIVI y el promotor temprano del citomegalovirus (CMV). Sin embargo, también pueden utilizarse elementos celulares (por ejemplo, el promotor de la actina humana). Los vectores de expresión adecuados para su uso en la práctica de la presente invención incluyen, por ejemplo, vectores tales como pIRES1neo, pRetro-Off, pRetro-On, PLXSN o pLNCX (Clonetech Labs, Palo Alto, CA), pADNc3.1 (+/-), pcDNA/Zeo (+/-) o pcDNA3.1/Hygro (+/-) (Invitrogen), PSVL y PMSG (Pharmacia, Uppsala, Suecia), pRSVcat (ATCC 37152), pSV2dhfr (ATCC 37146) y pBC12MI (ATCC 67109). Las células hospedadoras de mamífero que podrían utilizarse incluyen células HeLa 293, H9 y Jurkat humanas, células NIH3T3 y C127 de ratón, células Cos 1, Cos 7 y CV 1, células QC1-3 de codorniz, células L de ratón y células de ovario de hámster chino (CHO).

Como alternativa, el gen puede expresarse en líneas celulares estables que contengan el gen integrado en un cromosoma. La co-transfección con un marcador seleccionable tal como dhfr, gpt, neomicina o higromicina permite la identificación y el aislamiento de las células transfectadas.

El gen transfectado también puede amplificarse para que exprese grandes cantidades del anticuerpo codificado. El marcador DHFR (dihidrofolato reductasa) es útil para desarrollar líneas celulares que porten varios cientos o incluso varios miles de copias del gen de interés. Otro marcador de selección útil es la enzima glutamina sintasa (GS) (Murphy, *et al*., Biochem J. 227:277-279 (1991); Bebbington, *et al*., Bio/Technology 10:169-175 (1992)). Utilizando estos marcadores, se cultivan las células de mamífero en medio selectivo y se seleccionan las células que tengan la mayor resistencia. Estas líneas celulares contienen el gen o los genes amplificados integrados en un cromosoma. Para la producción de anticuerpos suelen utilizarse células de ovario de hámster chino (CHO) y NSO.

Los vectores de expresión pC1 y pC4 contienen el promotor fuerte (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Cullen, *et al*., Molec. Célula. Biol. 5:438-447 (1985)) además de un fragmento del potenciador de CMV (Boshart, *et al*., Cell, 41:521-530 (1985)). Los sitios de clonación múltiple, por ejemplo, con los sitios de escisión de enzimas de restricción BamHI, XbaI y Asp718, facilitan la clonación del gen de interés. Los vectores contienen además el intrón 3', la señal de poliadenilación y de terminación del gen de la preproinsulina de rata.

Clonación y expresión en células CHO

El vector pC4 se utiliza para la expresión del anticuerpo para IL-6. El plásmido pC4 es un derivado del plásmido pSV2-dhfr (ATCC con Nº de referencia 37146). El plásmido contiene el gen DHFR de ratón bajo el control del promotor temprano de SV40. Pueden seleccionarse células de ovario de hámster chino u otras células que carecen de actividad dihidrofolato que se transfectan con estos plásmidos cultivando las células en un medio

selectivo (por ejemplo, alfa minus MEM, Life Technologies, Gaithersburg, MD) complementado con el agente quimioterapéutico metotrexato. La amplificación de los genes DHFR en células resistentes a metotrexato (MTX) ha sido bien documentada (véase, por ejemplo, F.W. Alt, *et al*., J. Biol. Chem. 253:1357-1370 (1978); J.L. Hamlin y C. Ma, Biochem et Biophys. Acta 1097:107-143 (1990); y M. J. Page y M. A. Sydenham, Biotechnology 9:64-68 (1991)). Las células cultivadas en concentraciones crecientes de MTX desarrollan resistencia al fármaco por sobreproducción de la enzima diana, DHFR, como resultado de la amplificación del gen DHFR. Si se une un segundo gen al gen de la DHFR, normalmente se co-amplifica y se sobreexpresa. Es conocido en la técnica que puede utilizarse este enfoque para desarrollar líneas celulares que porten más de 1.000 copias del gen o de los genes amplificados. Posteriormente, cuando se retira el metotrexato, se obtienen líneas celulares que contienen el gen amplificado integrado en uno o más cromosomas de la célula hospedadora.

El plásmido pC4 contiene para expresar el gen de interés el promotor fuerte de la repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rous (Cullen, *et al*., Molec. Cell. Biol. 5:438-447 (1985)) más un fragmento aislado del potenciador del gen temprano inmediato de citomegalovirus (CMV) humano (Boshart, *et al*., Cell, 41:521-530 (1985)). Cadena abajo del promotor se encuentran los sitios de escisión de enzimas de restricción BamHI, XbaI y Asp718 que permiten la integración de los genes. Detrás de estos sitios de clonación el plásmido contiene el intrón 3' y el sitio de poliadenilación del gen de la preproinsulina de rata. También pueden utilizarse otros promotores de alta eficacia para la expresión, por ejemplo, el promotor de b-actina humana, los promotores temprano o tardío de SV40 o las repeticiones terminales largas de otros retrovirus, por ejemplo, VIH y HTLVI. Pueden utilizarse los sistemas de expresión génica Tet-Off y Tet-On de Clontech y sistemas similares para expresar la IL-6 de manera regulada en células de mamífero (M. Gossen, y H. Bujard, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 89:5547-5551 (1992)). Para la poliadenilación del ARNm pueden utilizarse también otras señales, por ejemplo, de genes de la globina o la hormona de crecimiento humana. También pueden seleccionarse líneas celulares estables que porten un gen de interés integrado en los cromosomas tras la co-transfección con un marcador seleccionable tal como gpt, G418 o higromicina. Es ventajoso utilizar más de un marcador seleccionable al principio, por ejemplo, G418 y metotrexato.

El plásmido pC4 se digiere con enzimas de restricción y a continuación se desfosforila utilizando fosfatasa intestinal de ternero mediante procedimientos conocidos en la técnica. A continuación se aísla el vector de un gel de agarosa al 1%.

Se utiliza la secuencia de ADN que codifica el anticuerpo para IL-6 completo, por ejemplo, como se presenta en las SEQ ID Nº: 7 y 8, correspondientes a las regiones variables de la HC y la LC de un anticuerpo para IL-6 de la presente invención, según las etapas de método conocidas. En este constructo también se utiliza ácido nucleico aislado que codifica una región constante humana adecuada (es decir, regiones HC y LC).

A continuación, el vector desfosforilado y el ADN que codifica la región variable y constante aislados se ligan con ADN ligasa de T4. A continuación se transforman células XL-1 Blue o HB101 de *E. coli* y se identifican las bacterias que contienen el fragmento insertado en el plásmido pC4 utilizando, por ejemplo, el análisis de enzimas de restricción.

Para la transfección se utilizan células de ovario de hámster chino (CHO) que carecen de un gen DHFR activo. Se cotransfectan 5 µg del plásmido de expresión pC4 con 0,5 µg del plásmido pSV2-neo utilizando lipofectina. El plásmido pSV2-neo contiene un marcador seleccionable dominante, el gen neo de Tn5 que codifica una enzima que confiere resistencia frente a un grupo de antibióticos incluido G418. Se siembran las células en alfa minus MEM complementado con 1 µg/ml de G418. Después de 2 días, se tratan las células con tripsina y se siembran en placas de clonación de hibridoma (Greiner, Alemania) en alfa minus MEM complementado con 10 ng/ml, 25 ng/ml ó 50 ng/ml de metotrexato más 1 µg/ml de G418. Después de aproximadamente 10-14 días, se tratan los clones individuales con tripsina y a continuación se siembran en placas de Petri de 6 pocillos o matraces de 10 ml utilizando diferentes concentraciones de metotrexato (50 nM, 100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM). A continuación, los clones que crecen a las concentraciones más altas de metotrexato se transfieren a nuevas placas de 6 pocillos que contienen concentraciones aún más altas de metotrexato (1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 20 mM). Se repite el mismo procedimiento hasta que se obtienen clones que crecen a una concentración entre 100 mM-200 mM. Se analiza la expresión del producto génico deseado, por ejemplo, mediante SDS-PAGE y transferencia de Western o mediante análisis de HPLC de fase inversa.

Anticuerpos anti-idiotipo contra la composición de anticuerpo anti-IL-6

Además de anticuerpos anti-IL-6 monoclonales o híbridos, en el presente documento se describe un anticuerpo antiidiotípico (anti-Id) específico para tales anticuerpos de la invención. Un anticuerpo anti-Id es un anticuerpo que reconoce determinantes únicos asociados generalmente con la región de unión al antígeno de otro anticuerpo. El anti-Id puede prepararse inmunizando a un animal de la misma especie y tipo genético (por ejemplo cepa de ratón) como fuente del anticuerpo Id con el anticuerpo o que contiene una región CDR del mismo. El animal inmunizado reconocerá y responderá a los determinantes idiotípicos del anticuerpo inmunizante y producirá un anticuerpo anti-Id. El anticuerpo anti-Id también puede utilizarse como "inmunógeno" para inducir una respuesta inmunitaria en otro animal más, produciendo un denominado anticuerpo anti-anti-Id.

Composiciones de anticuerpos anti-IL-6

La presente invención también proporciona al menos una composición de un anticuerpo anti-IL-6 que comprende un anticuerpo de la invención que se proporciona en una forma, mezcla o composición de origen no natural. Tales composiciones comprenden composiciones de origen no natural que comprenden al menos una o dos variantes especificadas, fragmentos, dominios o variantes delecionadas en el extremo C-terminal y/o N-terminal, de longitud completa, de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-IL-6 seleccionados del grupo que consiste en el 70%-100% de los aminoácidos contiguos de las SEQ ID Nº: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, o variantes, dominios o fragmentos especificados de los mismos. Las composiciones de anticuerpo anti-IL-6 preferentes incluyen al menos una o dos variantes, dominios o fragmentos, de longitud completa, como al menos una CDR o LBR que contiene porciones de la secuencia del anticuerpo anti-IL-6 del 70%-100% de las SEQ ID Nº: 1, 2, 3, 4, 5, 6, o variantes, dominios o fragmentos especificados de las mismas. Otras composiciones preferentes comprenden el 40%-99% de al menos uno de 70%-100% de las SEQ ID Nº: 1, 2, 3, 4, 5, 6, o variantes, dominios o fragmentos especificados de las mismas. Tales porcentajes de composición son en peso, volumen, concentración, molaridad o molalidad como soluciones líquidas o secas, mezclas, suspensión, emulsiones o coloides, como se conoce en la técnica o como se describe en el presente documento.

Las composiciones de anticuerpo anti-IL-6 de la presente invención pueden comprender adicionalmente al menos una de cualquier cantidad adecuada y eficaz de una composición o composición farmacéutica que comprenda al menos un anticuerpo anti-IL-6 a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite tal modulación, tratamiento o terapia, que opcionalmente comprende adicionalmente al menos uno seleccionado de al menos un antagonista de TNF (por ejemplo, pero no limitado a un anticuerpo o fragmento contra TNF, un fragmento receptor o de TNF soluble, proteínas de fusión de los mismos, o un antagonista de TNF de molécula pequeña), un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auranofina, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato de oro sodio, sulfato de hidroxicloroquina, leflunomida, sulfasalazina), un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo, aminoglucósido, un antifúngico, un antiparasitario, un antiviral, un carbapenem, cefalosporina, una flurorquinolona, un macrólido, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina, otro antimicrobiano), un antipsoriásico, un corticosteroide, un esteroide anabólico, un agente relacionado con la diabetes, un mineral, un producto nutricional, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con calcio, un antidiarreico, un antitusivo, un antiemético, un antiulceroso, un laxante, un anticoagulante, un epoetina (por ejemplo, epoetina alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-CSF, Leukine), una vacunación, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona de crecimiento, un medicamento de reemplazo hormonal, un modulador del receptor de estrógenos, un midriático, un ciclopléjico, un agente alquilante, un antimetabolito, un antimitótico, un radiofármaco, un antidepresivo, un antimaníaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpaticomimético, un estimulante, donepezilo, tacrina, un medicamento para el asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrienos, una metilxantina, un cromolina, una epinefrina o análogo, dornasa alfa (Pulmozyme), una citocina o un antagonista de citocinas. Los ejemplos no limitativos de tales citocinas incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de IL-1 a IL-23. Las dosis adecuadas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Wells *et al*., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2ª edición, Appleton y Lange, Stamford, CT (2000). PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000).

Tales agentes antiinfecciosos o anticancerosos también pueden incluir moléculas de toxina que se asocian, se unen, se formulan conjuntamente o se administran conjuntamente con al menos un anticuerpo de la presente invención. La toxina puede actuar opcionalmente para destruir selectivamente el tejido o la célula patológica. La célula patológica puede ser una célula cancerosa u otra célula. Tales toxinas pueden ser, pero no se limitan a, un fragmento de toxina o toxina recombinante o purificada que comprende al menos un dominio citotóxico funcional de la toxina, por ejemplo, seleccionada de entre al menos una de ricina, toxina de la difteria, una toxina de veneno o una toxina bacteriana. El término toxina también incluye endotoxinas y exotoxinas producidas por cualquier virus o bacteria de origen natural, mutante o recombinante que puedan causar cualquier estado patológico en seres humanos y otros mamíferos, incluido el choque tóxico, que puede causar la muerte. Tales toxinas pueden incluir, pero no se limitan a, enterotoxina lábil al calor (LT) de *E. coli* enterotoxigénica, enterotoxina estable al calor (ST), citotoxina de *Shigella*, enterotoxinas de *Aeromonas*, toxina-1 del síndrome de choque tóxico (TSST-1), enterotoxina estafilocócica A (SEA), B (SEB) o C (SEC), enterotoxinas estreptocócicas y similares. Tales bacterias incluyen, pero no se limitan a, cepas de una especie de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (por ejemplo, cepas del serotipo 0157:H7), especies de *Staphylococcus* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus, Staphylococcus pyogenes*), especies de *Shigella* (por ejemplo, *Shigella dysenteriae, Shigella flexneri, Shigella boydii* y *Shigella sonnei*), especies de *Salmonella* (por ejemplo, *Salmonella typhi, Salmonella cholerae-suis, Salmonella enteritidis*), especies de *Clostridium* (por ejemplo, *Clostridium perfringens, Clostridium dificile, Clostridium botulinum*), especies de *Campylobacter* (por ejemplo, *Campylobacter jejuni, Campylobacter fetus*), especies de *Helicobacter* (por ejemplo, *Helicobacter pylori*), especies de *Aeromonas* (por ejemplo, *Aeromonas sobria, Aeromonas hydrophila, Aeromonas caviae*), *Pleisomonas shigelloides, Yersina enterocolitica*, especies de *Vibrio* (por ejemplo, *Vibrio cholerae, Vibrio parahemolyticus*), especies de *Klebsiella, Pseudomonas aeruginosa* y estreptococos. Véase, por ejemplo, Stein, ed.,

INTERNAL MEDICINE, 3ª ed., págs. 1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990), Evans *et al*., eds., Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control, 2ª. ed., págs. 239-254, Plenum Medical Book Co., Nueva York (1991); Mandell *et al*., Principles and Practice of Infectious Diseases, 3ª ed., Churchill Livingstone, Nueva York (1990); Berkow *et al*., eds., The Merck Manual, 16ª edición, Merck y Co., Rahway, Nueva Jersey, 1992; Wood *et al*., FEMS Microbiology Immunology, 76:121-134 (1991); Marrack *et al*., Science, 248:705-711 (1990).

Las combinaciones, composiciones o compuestos de anticuerpo anti-IL-6 de la presente invención pueden comprender adicionalmente al menos uno de cualquier auxiliar adecuado, tal como, pero no limitado a, diluyente, aglutinante, estabilizador, tampones, sales, disolventes lipófilos, conservante, adyuvante o similares. Resultan preferentes los auxiliares farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos no limitativos y los métodos de preparación de tales soluciones estériles son bien conocidos en la técnica, tales como, pero limitados a, Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Pueden seleccionarse de manera rutinaria vehículos farmacéuticamente aceptables que sean adecuados para el modo de administración, la solubilidad y/o la estabilidad de la composición de anticuerpo anti-IL-6, fragmento o variante como es bien conocido en la técnica o como se describe en el presente documento.

Los excipientes y aditivos farmacéuticos útiles en la presente composición incluyen, pero no se limitan a proteínas, péptidos, aminoácidos, lípidos e hidratos de carbono (por ejemplo, azúcares, incluidos monosacáridos, di-, tri-, tetra- y oligosacáridos; azúcares derivatizados tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados y similares; y polisacáridos o polímeros de azúcar), que pueden estar presentes solos o en combinación, que comprenden en solitario o en combinación un 1%-99,99% en peso o volumen. Los excipientes proteicos ejemplares incluyen albúmina de suero, tal como albúmina de suero humano (HSA), albúmina humana recombinante (rHA), gelatina, caseína, y similares. Los componentes representativos de aminoácido/anticuerpo, que también pueden actuar en una capacidad de tamponamiento, incluyen alanina, glicina, arginina, betaína, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, aspartamo, y similares. Un aminoácido preferente es la glicina.

Los excipientes de hidratos de carbono adecuados para su uso en la invención incluyen, por ejemplo, monosacáridos tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones, y similares; y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol), mioinositol y similares. Los excipientes de hidratos de carbono preferentes para su uso en la presente invención son manitol, trehalosa y rafinosa.

Las composiciones de anticuerpo anti-IL-6 también pueden incluir un tampón o un agente de ajuste del pH; por lo general, el tampón es una sal preparada a partir de un ácido o base orgánica. Los tampones representativos incluyen sales de ácidos orgánicos tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; Tris, clorhidrato de trometamina, o tampones de fosfato. Los tampones preferentes para su uso en las presentes composiciones son sales de ácidos orgánicos tales como citrato.

Además, las composiciones de anticuerpo anti-IL-6 de la invención pueden incluir excipientes/aditivos poliméricos tales como polivinilpirrolidonas, ficoles (un azúcar polimérico), dextratos (por ejemplo, ciclodextrinas, tales como 2-hidroxipropil-β-ciclodextrina), polietilenglicoles, saborizantes, antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, tensioactivos (por ejemplo, polisorbatos tales como "TWEEN 20" y "TWEEN 80"), lípidos (por ejemplo, fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (por ejemplo, colesterol), y quelantes (por ejemplo, EDTA).

Estos y otros aditivos y/o excipientes farmacéuticos conocidos adecuados para su uso en las composiciones de anticuerpo anti-IL-6, porción o variante, según la invención son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se enumera en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19ª ed., Williams & Williams, (1995), y en "Physician's Desk Reference", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998). Los materiales excipientes o vehículos preferentes son hidratos de carbono (por ejemplo, sacáridos y alditoles) y tampones (por ejemplo, citrato) o agentes poliméricos.

Formulaciones

Como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona formulaciones estables, que son preferentemente un tampón de fosfato con solución salina o una sal elegida, así como formulaciones y soluciones conservadas que contienen un conservante así como formulaciones conservadas multiuso adecuadas para uso farmacéutico o veterinario, que comprenden al menos un anticuerpo anti-IL-6 en una formulación farmacéuticamente aceptable. Las formulaciones conservadas contienen al menos un conservante conocido u opcionalmente seleccionado del grupo que consiste en al menos un fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, nitrito fenilmercúrico, fenoxietanol, formaldehído, clorobutanol, cloruro de magnesio (por ejemplo, hexahidrato), alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio,

deshidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos en un diluyente acuoso. Puede utilizarse cualquier mezcla o concentración adecuada como se conoce en la técnica, tal como 0,001%-5%, o cualquier intervalo o valor en el mismo, tal como, pero no limitado a 0,001; 0,003; 0,005; 0,009; 0,01; 0,02; 0,03; 0,05; 0,09; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4,; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9; 1,0; 1,1; 1,2; 1,3; 1,4; 1,5; 1,6; 1,7; 1,8; 1,9; 2,0; 2,1; 2,2; 2,3; 2,4; 2,5; 2,6; 2,7; 2,8; 2,9; 3,0; 3,1; 3,2; 3,3; 3,4; 3,5; 3,6; 3,7; 3,8; 3,9; 4,0; 4,3; 4,5; 4,6; 4,7; 4,8; 4,9, o cualquier intervalo o valor en el mismo. Los ejemplos no limitativos incluyen, sin conservante, m-cresol al 0,1%-2% (por ejemplo, 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5%, 0,9%, 1,0%), alcohol bencílico al 0,1%-3% (por ejemplo, 0,5%, 0,9%, 1,1,%, 1,5%, 1,9%, 2,0%, 2,5%), timerosal al 0,001%-0,5% (por ejemplo, 0,005%, 0,01%), fenol al 0,001%-2,0% (por ejemplo, 0,05%, 0,25%, 0,28%, 0,5%, 0,9%, 1,0%), alquilparabeno(s) al 0,0005%-1,0% (por ejemplo, 0,00075%, 0,0009%, 0,001%, 0,002%, 0,005%, 0,0075%, 0,009%, 0,01%, 0,02%, 0,05%, 0,075%, 0,09%, 0,1%, 0,2%, 0,3%, 0,5%, 0,75%, 0,9%, 1,0%), y similares.

Como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona un artículo de fabricación, que comprende material de envasado y al menos un vial que comprende una solución de al menos un anticuerpo anti-IL-6 con los conservantes y/o tampones prescritos, opcionalmente en un diluyente acuoso, en el que dicho material de envasado comprende una etiqueta que indica que tal solución puede mantenerse durante un período de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 horas o superior. La invención comprende adicionalmente un artículo de fabricación, que comprende material de envasado, un primer vial que comprende, liofilizado, al menos un anticuerpo anti-IL-6, y un segundo vial que comprende un diluyente acuoso de tampón o conservante prescrito, en el que dicho material de envasado comprende una etiqueta que indica a un paciente cómo reconstituir el al menos un anticuerpo anti-IL-6 en el diluyente acuoso para formar una solución que puede mantenerse durante un período de veinticuatro horas o más.

El al menos un anticuerpo anti-IL-6 utilizado según la presente invención puede producirse por medios recombinantes, incluidos a partir de células de mamífero o preparaciones transgénicas, o puede purificarse a partir de otras fuentes biológicas, como se describe en el presente documento o como se conoce en la técnica.

El intervalo de al menos un anticuerpo anti-IL-6 en el producto de la presente invención incluye cantidades que producen tras la reconstitución, si se encuentran en un sistema húmedo/seco, concentraciones de aproximadamente 1,0 µg/ml a aproximadamente 1.000 mg/ml, aunque son posibles concentraciones inferiores y superiores y dependen del vehículo de administración previsto, por ejemplo, las formulaciones en solución diferirán de los métodos por microbomba o bomba osmótica, o por vía pulmonar, por vía transmucosa o por parche transdérmico.

Preferentemente, el diluyente acuoso comprende adicionalmente de manera opcional un conservante farmacéuticamente aceptable. Los conservantes preferentes incluyen los seleccionados del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos. La concentración de conservante utilizado en la formulación es una concentración suficiente para producir un efecto antimicrobiano. Tales concentraciones dependen del conservante seleccionado y son determinados fácilmente por el experto en la materia.

Pueden añadirse opcional y preferentemente al diluyente otros excipientes, por ejemplo, agentes isotónicos, tampones, antioxidantes, potenciadores de conservantes. Comúnmente se utiliza un agente de isotonicidad, tal como glicerina, a concentraciones conocidas. Se añade preferentemente un tampón fisiológicamente tolerado para proporcionar un mejor control del pH. Las formulaciones pueden cubrir un amplio intervalo de pH, tal como de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 10, e intervalos preferentes de aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 9, y el intervalo más preferente de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0. Preferentemente, las formulaciones de la presente invención tienen un pH entre aproximadamente 6,8 y aproximadamente 7,8. Los tampones preferentes incluyen tampones de fosfato, lo más preferentemente fosfato de sodio, especialmente solución salina tamponada con fosfato (PBS).

Para reducir la agregación, pueden añadirse opcionalmente a las formulaciones o composiciones otros aditivos, tales como solubilizantes farmacéuticamente aceptables como Tween 20 (polioxietileno (20) monolaurato de sorbitán), Tween 40 (polioxietileno (20) monopalmitato de sorbitán), Tween 80 (polioxietileno (20) monooleato de sorbitán), Pluronic F68 (copolímeros de bloque de polioxietileno polioxipropileno), y PEG (polietilenglicol) o tensioactivos no iónicos tales como polisorbato 20 u 80 o poloxámero 184 o 188, polioles de Pluronic®, otros copolímeros de bloque y quelantes tales como EDTA y EGTA. Estos aditivos son especialmente útiles si para administrar la formulación se utiliza una bomba o recipiente de plástico. La presencia de un tensioactivo farmacéuticamente aceptable mitiga la propensión de la proteína a agregarse.

Las formulaciones de la presente invención pueden prepararse mediante un proceso que comprende mezclar al menos un anticuerpo anti-IL-6 y un conservante seleccionado del grupo que consiste en fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal o mezclas de los mismos en un diluyente acuoso. La mezcla del al menos un anticuerpo anti-IL-6 y conservante en un diluyente acuoso se lleva a cabo

utilizando procedimientos de disolución y mezclado convencionales. Para preparar una formulación adecuada, por ejemplo, se combina una cantidad medida de al menos un anticuerpo anti-IL-6 en solución tamponada con el conservante deseado en una solución tamponada en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y el conservante a las concentraciones deseadas. Un experto habitual en la técnica reconocerá las variaciones de este proceso. Por ejemplo, el orden en el que se añaden los componentes, si se utilizan aditivos adicionales, la temperatura y el pH a los que se prepara la formulación, son factores que pueden optimizarse para la concentración y los medios de administración utilizados.

Las formulaciones reivindicadas pueden proporcionarse a pacientes como soluciones transparentes o como viales dobles que comprenden un vial de liofilizado de al menos un anticuerpo anti-IL-6 que se reconstituye con un segundo vial que contiene agua, un conservante y/o excipientes, preferentemente un tampón de fosfato y/o solución salina y una sal elegida, en un diluyente acuoso. El vial de solución individual o el vial doble que requiere la reconstitución pueden reutilizarse múltiples veces y pueden ser suficientes para un solo ciclo o múltiples ciclos de tratamiento del paciente y por lo tanto pueden proporcionan un régimen de tratamiento más conveniente que el disponible actualmente.

Los artículos de fabricación reivindicados en el presente documento son útiles para la administración durante un período comprendido entre el uso inmediato y las veinticuatro horas o más. Por consiguiente, los artículos de fabricación reivindicados en el presente documento ofrecen ventajas significativas para el paciente. Las formulaciones de la invención pueden almacenarse opcionalmente de forma segura a temperaturas de aproximadamente 2°C a aproximadamente 40°C y conservar la actividad biológica de la proteína durante periodos de tiempo prolongados, permitiendo por tanto una etiqueta en el paquete que indique que la solución puede mantenerse y/o utilizarse durante un periodo de 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 ó 96 horas o más. Si se utiliza un diluyente conservado, tal etiqueta puede incluir el uso hasta 1-12 meses, medio año, un año y medio y/o dos años.

Las soluciones de al menos un anticuerpo anti-IL-6 de la invención pueden prepararse mediante un proceso que comprende mezclar al menos un anticuerpo en un diluyente acuoso. La mezcla se realiza utilizando procedimientos de disolución y mezcla convencionales. Para preparar un diluyente adecuado, por ejemplo, se combina una cantidad medida de al menos un anticuerpo en agua o tampón en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y opcionalmente un conservante o tampón a las concentraciones deseadas. Un experto habitual en la técnica reconocerá las variaciones de este proceso. Por ejemplo, el orden en el que se añaden los componentes, si se utilizan aditivos adicionales, la temperatura y el pH a los que se prepara la formulación, son factores que pueden optimizarse para la concentración y los medios de administración utilizados.

Los productos reivindicados pueden proporcionarse a los pacientes como soluciones transparentes o como viales dobles que comprenden un vial de liofilizado de al menos un anticuerpo anti-IL-6 que se reconstituye con un segundo vial que contiene el diluyente acuoso. El vial de solución individual o el vial doble que requiere reconstitución pueden reutilizarse múltiples veces y pueden ser suficientes para un solo ciclo o múltiples ciclos de tratamiento del paciente y por lo tanto proporcionan un régimen de tratamiento más conveniente que el disponible actualmente.

Los productos reivindicados pueden proporcionarse indirectamente a los pacientes proporcionando a las farmacias, clínicas u otras instituciones e instalaciones de este tipo, soluciones transparentes o viales dobles que comprenden un vial de liofilizado de al menos un anticuerpo anti-IL-6 que se reconstituye con un segundo vial que contiene el diluyente acuoso. La solución transparente en este caso puede ser de hasta un litro o incluso de mayor tamaño, proporcionando un depósito grande desde el cual puedan recuperarse, una o múltiples veces, porciones más pequeñas de la al menos una solución de anticuerpo para transferirse a viales más pequeños y ser proporcionada por la farmacia o la clínica a sus clientes y/o pacientes.

Los dispositivos reconocidos que comprenden estos sistemas de viales individuales incluyen los dispositivos de inyector de pluma para la administración de una solución tal como los BD Pen, BD Autojector®, Humaject®, NovoPen®, B-D®Pen, Autopen® y OptiPen®, GenotropinPen®, Genotronorm Pen®, Humatro Pen®, RecoPen®, Roferon Pen®, Biojector®, iject®, J-tip Needle-Free Injector®, Intraject®, Medi-Ject®, por ejemplo, como los fabricados o desarrollados por Becton Dickensen (Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com), Disetronic (Burgdorf, Suiza, www.disetronic.com; Bioject, Portland, Oregon (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, Reino Unido, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, www.mediject.com). Los dispositivos reconocidos que comprenden un sistema de vial doble incluyen los sistemas de inyector de pluma para reconstituir un fármaco liofilizado en un cartucho para la administración de la solución reconstituida, tales como la HumatroPen®.

Los productos reivindicados en el presente documento incluyen material de envasado. El material de envasado ofrece, además de la información requerida por los organismos reguladores, las condiciones en las que puede utilizarse el producto. El material de envasado de la presente invención proporciona instrucciones al paciente para reconstituir el al menos un anticuerpo anti-IL-6 en el diluyente acuoso para formar una solución y para utilizar la solución durante un período de 2-24 horas o más para el producto húmedo/seco de dos viales. Para el producto en

solución de un solo vial, la etiqueta indica que tal solución puede utilizarse durante un periodo de 2-24 horas o más. Los productos reivindicados en el presente documento son útiles para el uso del producto farmacéutico en seres humanos.

Las formulaciones de la presente invención pueden prepararse mediante un proceso que comprende mezclar al menos un anticuerpo anti-IL-6 y un tampón seleccionado, preferentemente un tampón de fosfato que contiene solución salina o una sal elegida. La mezcla del al menos un anticuerpo y un tampón en un diluyente acuoso se lleva a cabo utilizando procedimientos de disolución y mezcla convencionales. Para preparar una formulación adecuada, por ejemplo, se combina una cantidad medida de al menos un anticuerpo en agua o tampón con el agente de tamponamiento deseado en agua en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y el tampón a las concentraciones deseadas. Un experto habitual en la técnica reconocerá las variaciones de este proceso. Por ejemplo, el orden en el que se añaden los componentes, si se utilizan aditivos adicionales, la temperatura y el pH a los que se prepara la formulación, son factores que pueden optimizarse para la concentración y los medios de administración utilizados.

Las formulaciones estables o conservadas reivindicadas pueden proporcionarse a los pacientes como soluciones transparentes o como viales dobles que comprenden un vial de liofilizado de al menos un anticuerpo anti-IL-6 que se reconstituye con un segundo vial que contiene un conservante o tampón y excipientes en un diluyente acuoso. El vial de solución individual o el vial doble que requiere reconstitución pueden reutilizarse múltiples veces y pueden ser suficientes para un solo ciclo o múltiples ciclos de tratamiento del paciente y por lo tanto proporcionan un régimen de tratamiento más conveniente que el disponible actualmente.

Puede administrarse a un paciente al menos un anticuerpo anti-IL-6, en las soluciones o formulaciones estables o conservadas descritas en el presente documento, por medio de diversos métodos de administración, incluidos la inyección SC o IM; por vía transdérmica, pulmonar, transmucosa, por implante, bomba osmótica, cartucho, microbomba u otros medios que el experto en la materia entiende y como es bien conocido en la técnica.

Aplicaciones Terapéuticas

La IL-6, debido a su actividad pleiotrópica, está implicada en la patología de diversas enfermedades. Por lo tanto, resultaría deseable utilizar un anticuerpo híbrido o humano contra la IL-6 neutralizante de alta afinidad, en enfermedades relacionadas con la IL-6 tales como el cáncer, la caquexia, el lupus eritematoso sistémico, la artritis reumatoide, la osteoporosis, el traumatismo cerebral, el edema cerebral, la depresión y la insuficiencia cardiaca congestiva. Puede utilizarse cCLB8 o cualquier derivado de este mAb incluidos los híbridos o humanizados, o fragmentos, para aliviar el dolor de huesos, inhibir el crecimiento de tumores tales como renal, de próstata, de mama, de pulmón, el cáncer de colon, el melanoma y el mieloma múltiple, los trastornos linfoproliferativos y otras enfermedades en las que se ha implicado la IL-6. Este anticuerpo puede utilizarse como agente único o en combinación con otros agentes terapéuticos. Además, este Mab puede utilizarse como quimiosensibilizador, por lo cual puede aumentar la eficacia terapéutica de los agentes citotóxicos. Este anticuerpo puede utilizarse como radiosensibilizador, por lo cual puede mejorar la eficacia de la radiación. También puede utilizarse en combinación con otros inmunomoduladores tumorales tales como IL-2, IL-12 y/o IFN alfa.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona un método para modular o tratar al menos una enfermedad relacionada con IL-6 en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, como se conoce en la técnica o como se describe en el presente documento, utilizando al menos un anticuerpo anti-IL-6 de la presente invención.

Se sabe que la IL-6 aumenta la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de las células plasmáticas malignas en el mieloma múltiple (MM) a través de un mecanismo autocrino o paracrino que implica la inhibición de la apoptosis de las células malignas. El MM es un trastorno maligno incurable de las células plasmáticas, en el que se ha postulado que el bloqueo de la IL-6 es un tratamiento eficaz (Anderson *et al*., Multiple Myeloma: New Insights and Therapeutic Approaches. Hematology: 147-165, 2000). La IL-6 también tiene un efecto tumorigénico en el carcinoma de células basales en el que las células transfectadas con IL-6 mostraron una mayor velocidad de crecimiento del tumor por supresión de la apoptosis y la promoción promoviendo activamente (Jee *et al*., Overexpression of interleukin-6 in human basal cell carcinoma cell lines increases anti-apoptotic activity and tumorigenic potency. Oncogene, vol. 20, Nº 2 págs. 198-208, 2001). La IL-6 también puede promover la resistencia de las células de cáncer de mama frente a la quimioterapia mediante la inducción de la expresión del gen mdr1 (vías de la metalotioneína y mdr1) (Conze *et al*., Autocrine Production of Interleukin 6 Causes Multidrug Resistance in Breast Cancer Cells. Cancer Res 61: 8851-8858, 2001).

La capacidad de la IL-6 para intervenir en la supervivencia de las células tumorales y la evolución de la enfermedad fue confirmada por los efectos inhibidores de un mAb anti-IL-6 sobre el crecimiento del tumor tanto *in vitro* como *in vivo*. Se informó que el bloqueo de la IL-6 puede inhibir el crecimiento de tumores cerebrales humanos (glioblastoma) *in vitro* (Goswami *et al*., Interleukin-6-mediated autocrine growth promotion in human glioblastoma multiforme cell line U87MG. J Neurochem 71: 1837-1845, 1998). Utilizando el mismo enfoque, se demostró que la inyección del anticuerpo anti-IL-6 CLB8 murino prolongaba la supervivencia de ratones portadores de tumores

humanos (Mauray *et al*., Epstein-Barr virus-dependent lymphoproliferative disease: critical role of IL-6. Eur J Immunol; 30(7):2065-73, 2000). También se informó que el anticuerpo anti-IL-6 mCLB8 inducía la regresión del crecimiento de tumores de carcinoma renal humano y disminuía las concentraciones de calcio en suero en ratones desnudos (Weisglass *et al*., The role of interleukin-6 in the induction of hypercalcemia in renal cell carcinoma transplanted into nude mice. Endocrinology 138(5):1879-8,1995). El anticuerpo CLB-8 también inducía la regresión de xenoinjertos de tumor de próstata humano resistente a hormonas establecido, en ratones (Smith *et al*. 2001). El anticuerpo monoclonal anti-interleucina-6 induce la regresión de xenoinjertos de cáncer de próstata humano en ratones desnudos (Smith y Keller, Prostate; 48(1):47-53).

La IL-6 también puede ser un factor pronóstico y un marcador de tumores malignos. En el carcinoma de células renales (CCR) se informó que los niveles elevados de IL-6 se correlacionaban con la metástasis tumoral y finalmente con un mal pronóstico y una baja supervivencia (Jean-Yves Blay *et al*. 1992). Además, en el CCR, los niveles séricos elevados de IL-6 se asocian con una pobre respuesta al tratamiento con IL-2 (Fumagalli *et al*. 1999. Pretreatment serum markers and lymphocyte response to interleukin-2 therapy. Br J Cancer 80(3-4):407-11) y se correlacionaban con el grado de toxicidad asociada a IL-2 (Capuron *et al*. 2001. Association between immune activation and early depressive symptoms in cancer patients treated with interleukin-2-based therapy. Psychoneuroendocrinology; 26(8):797-808).

Los niveles elevados de IL-6 también se correlacionan con un mal pronóstico y presencia de enfermedad metastásica en el cáncer de mama (Kurebayashi 2000 y Benoy 2002. Regulation of interleukin-6 secretion from breast cancer cells and its clinical implications. Breast Cancer; 7(2):124-9. Serum interleukin 6, plasma VEGF, serum VEGF, and VEGF platelet load in breast cancer patients. Clin Breast Cancer; 2(4):311-5).

Existe la hipótesis de que la IL-6 es un factor causante de la morbilidad asociada a cáncer, tal como la astenia/caquexia y la resorción ósea. Se descubrió que la caquexia (Cahlin *et al*. 2000) y la resorción ósea (posterior hipercalcemia) (Sandhu *et al*. 1999) inducidas por el tumor estaban disminuidas en ratones knockout para IL-6. La depresión asociada al cáncer, y el edema cerebral como consecuencia de tumores cerebrales también se ha asociado con niveles elevados de IL-6 (Musselman *et al*. 2001). El anti-anticuerpo anti-IL-6 cCLB8 de la invención también inhibía la caquexia inducida por melanoma humano y carcinoma de próstata humano en ratones desnudos.

Experiencia clínica con agentes anti-IL-6

Se han llevado a cabo varios ensayos clínicos que utilizan anticuerpos monoclonales contra la IL-6 en múltiples enfermedades como la leucemia de células plasmáticas, el mieloma múltiple, el trastorno proliferativo de los linfocitos B, la artritis reumatoide, el carcinoma renal y el linfoma asociado al SIDA.

Un estudio de Fase I de aumento escalonado de la dosis con el anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6 de la presente invención para el tratamiento de pacientes resistentes con mieloma múltiple en estadio avanzado (N=12), demostró que algunos pacientes presentaban estabilización de la enfermedad. Después de la interrupción del tratamiento hubo una aceleración en el aumento de los niveles de proteína M, lo que sugería un rebrote de la enfermedad después de la retirada del tratamiento. El anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6 inhibe la libre circulación de IL-6. Lo que es más importante, no se observó toxicidad (excepto trombocitopenia transitoria en dos pacientes con tratamiento previo intenso) ni reacciones alérgicas. La proteína C-reactiva (CRP) se redujo por debajo del nivel de detección en todos los pacientes. El anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6 demostró una larga semivida en circulación de 17,8 días, y no se observó ninguna respuesta inmunitaria de anticuerpos anti-híbridos humanos (HACA) (van Zaanen *et al*. 1998). La administración de CNTO 328 no provocó cambios en la presión sanguínea, el pulso, la temperatura, la hemoglobina, las funciones del hígado y las funciones renales. Excepto por la trombocitopenia transitoria en dos pacientes con tratamiento previo intenso, no se observaron reacciones alérgicas o de toxicidad, y no se observó respuesta inmunitaria de anticuerpos anti-híbridos humanos (HACA). Tres pacientes desarrollaron complicaciones relacionadas con la infección durante el tratamiento, sin embargo, era poco probable una posible relación con el anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6 debido a que las complicaciones infecciosas son comunes en el mieloma múltiple en fase terminal y son una causa importante de muerte. Además, los tres pacientes fueron capaces de responder a la infección incluso en presencia de anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6, lo que sugiere que la terapia anti-IL-6 no es capaz de bloquear la IL-6 durante la infección. No se registraron muertes asociadas al tratamiento. En conclusión, los resultados de este estudio sugieren que el anticuerpo cCLB-8 anti-IL-6 era seguro en pacientes con mieloma múltiple.

Por lo tanto, en el presente documento se describe un método para modular o tratar al menos una enfermedad maligna en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluidas, pero no limitadas a, al menos una de entre: mieloma múltiple, leucemia, leucemia aguda, leucemia linfoblástica aguda (LLA), LLA de linfocitos B, linfocitos T o FAB, leucemia mieloide aguda (LMA), leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfocítica crónica (LLC), leucemia de células pilosas, síndrome mielodisplásico (SMD), un linfoma, enfermedad de Hodgkin, un linfoma maligno, linfoma no-Hodgkin, linfoma de Burkitt, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorrectal, carcinoma de células renales, carcinoma pancreático, carcinoma prostático, carcinoma nasofaríngeo, histiocitosis maligna, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia por malignidad, tumores sólidos, adenocarcinomas, sarcomas, melanoma maligno, hemangioma, enfermedad metastásica, resorción ósea asociada a cáncer, dolor óseo asociado a cáncer; la

supresión de metástasis cancerosas; la mejora de la caquexia por cáncer; y el tratamiento de enfermedades inflamatorias tal como la glomerulonefritis proliferativa mesangial y similares. Opcionalmente puede utilizarse un método de este tipo en combinación con, mediante la administración antes, al mismo tiempo o después de la administración de tal anticuerpo para IL-6, radioterapia, un antiangiogénico, un agente quimioterapéutico, un inhibidor de transferasa de farnesilo o similares.

En el presente documento también se describe un método para modular o tratar al menos una enfermedad relacionada con la inmunidad mediada por IL-6, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluidas, pero no limitadas a, al menos una de entre artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis reumatoide juvenil sistémica, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, úlcera gástrica, artropatías seronegativas, artrosis, enfermedad inflamatoria intestinal, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico, síndrome antifosfolípido, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, fibrosis pulmonar idiopática, vasculitis sistémica/granulomatosis de Wegener, sarcoidosis, orquitis/procedimientos de reversión de la vasectomía, enfermedades alérgicas/atópicas, asma, rinitis alérgica, eczema, dermatitis alérgica de contacto, conjuntivitis alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, trasplantes, rechazo de órganos trasplantados, enfermedad de injerto contra hospedador, síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, síndrome séptico, sepsis por gram positivos, sepsis por gram negativos, sepsis con cultivo negativo, sepsis fúngica, fiebre neutropénica, urosepsis, meningococcemia, traumatismo/hemorragia, quemaduras, exposición a radiación ionizante, pancreatitis aguda, síndrome de dificultad respiratoria del adulto, hepatitis alcohólica, patologías inflamatorias crónicas, sarcoidosis, patología de Crohn, anemia de células falciformes, diabetes, nefrosis, enfermedades atópicas, reacciones de hipersensibilidad, rinitis alérgica, fiebre del heno, rinitis perenne, conjuntivitis, endometriosis, asma, urticaria, anafilaxis sistémica, dermatitis, anemia perniciosa, enfermedad hemolítica, trombocitopenia, rechazo de injerto de cualquier órgano o tejido rechazo de trasplante de riñón, rechazo de trasplante de corazón, rechazo de trasplante de hígado, rechazo de trasplante de páncreas, rechazo de trasplante de pulmón, rechazo de trasplante de médula ósea (BMT), rechazo de aloinjerto de piel, rechazo de trasplante de cartílago, rechazo de injerto de hueso, rechazo de trasplante de intestino delgado, rechazo de implante de timo fetal, rechazo de trasplante de paratiroides, rechazo de xenoinjerto de cualquier órgano o tejido, rechazo de aloinjerto, reacciones de hipersibilidad antirreceptor, enfermedad de Graves, enfermedad de Raynoud, diabetes de tipo B insulinorresistente, miastenia grave, citotoxicidad mediada por anticuerpos, reacciones de hipersensibilidad de tipo III, lupus eritematoso sistémico, síndrome POEMS (síndrome de polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal y de cambios en la piel), polineuropatía, organomegalia, endocrinopatía, gammapatía monoclonal, síndrome de cambios en la piel, síndrome antifosfolipídico, pénfigo, esclerodermia, enfermedad mixta del tejido conectivo, enfermedad idiopática de Addison, diabetes mellitus, hepatitis activa crónica, cirrosis biliar primaria, vitiligo, vasculitis, síndrome de cardiotomía post-IM, hipersensibilidad de tipo IV, dermatitis de contacto, neumonitis por hipersensibilidad, granulomas debidos a organismos intracelulares, sensibilidad a fármacos, metabólico/idiopático, enfermedad de Wilson, hemocromatosis, deficiencia de alfa-1-antitripsina, retinopatía diabética, tiroiditis de Hashimoto, osteoporosis, evaluación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal, cirrosis biliar primaria, tiroiditis, encefalomielitis, caquexia, fibrosis quística, enfermedad pulmonar crónica neonatal, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), linfohistiocitosis hematofagocítica familiar, afecciones dermatológicas, psoriasis, alopecia, síndrome nefrótico, nefritis, nefritis glomerular, insuficiencia renal aguda, hemodiálisis, uremia, toxicidad, preeclampsia, tratamiento con okt3, terapia anti-CD3, tratamiento con citocinas, quimioterapia, radioterapia (por ejemplo, incluida pero no limitada a, astenia, anemia, caquexia, y similares), intoxicación crónica por salicilatos, apnea del sueño, obesidad, insuficiencia cardíaca, sinusitis, enfermedad inflamatoria intestinal, y similares. Véase, por ejemplo, Merck Manual, 12ª y 17ª ediciones, Merck & Company, Rahway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells *et al*., Eds., 2ª edición, Appleton y Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000).

En el presente documento también se describe un método para modular o tratar al menos una enfermedad infecciosa en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluida, pero no limitada a, al menos una de entre: infección bacteriana aguda o crónica, procesos infecciosos o parasitarios agudos y crónicos, incluidos infecciones bacterianas, víricas y fúngicas, infección por VIH/neuropatía, meningitis, hepatitis (A, B o C, o similares) por VIH, artritis séptica, peritonitis, neumonía, epiglotitis, *E. coli* 0157:H7, síndrome urémico hemolítico/púrpura trombocitopénica trombolítica, malaria, fiebre hemorrágica del dengue, leishmaniasis, lepra, síndrome de choque tóxico, miositis estreptocócica, gangrena gaseosa, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium intracellulare*, neumonía por *Pneumocystis carinii*, enfermedad inflamatoria pélvica, orquitis/epididimitis, legionela, enfermedad de Lyme, gripe A, virus de Epstein-Barr, síndrome hemofagocítico asociado a virus, encefalitis viral/meningitis aséptica, y similares.

Cualquiera de tales métodos puede comprender opcionalmente administrar una cantidad eficaz de al menos una composición o composición farmacéutica que comprenda al menos un anticuerpo anti-IL-6 a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite tal modulación, tratamiento o terapia. Las indicaciones para el tratamiento con la terapia anti-IL-6 se describen en las siguientes referencias. Van Snick, "Interleukin-6: An Overview", Ann. Rev. Immunol., 8:253-278 (1990); Campbell *et al*., "Essential Role for Interferon-gamma. And Interleukin-6 in Autoimmune Insulin-Dependent Diabetes in NOD/Wehi Mice", J. Clin. Invest., 87:739-742 (1991); Heinrich *et al*., "Interleukin-6 Monoclonal Antibody Therapy for a Patient with Plasma Cell Leukemia", Blood, 78(5):1198-1204 (1991); Starnes *et al*., "Anti-IL-6 Monoclonal Antibodies Protect Against Lethal Escherichia coli Infection and Lethal Tumor Necrosis Factor-alpha. Challenge in Mice", J. Immunol., 145(12):4185-4191 (1990);

Strassman *et al*., "Evidence for the Involvement of Interleukin 6 in Experimental Cancer Cachexia", J. Clin. Invest., 89:1681-1684 (1992).

Cualquier método descrito en el presente documento puede comprender la administración de una cantidad eficaz de una composición o composición farmacéutica que comprenda al menos un anticuerpo anti-IL-6 a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite tal modulación, tratamiento o terapia. Un método de este tipo puede comprender adicionalmente de manera opcional la co-administración o la terapia de combinación para tratar tales enfermedades inmunitarias o enfermedades malignas, en el que la administración de dicho al menos un anticuerpo anti-IL-6, porción especificada o variante del mismo, comprende adicionalmente administrar, antes, al mismo tiempo, y/o después, al menos uno seleccionado de entre al menos un antagonista de TNF (por ejemplo, pero no limitado a un anticuerpo o fragmento contra TNF, un fragmento o receptor de TNF soluble, proteínas de fusión de los mismos, o un antagonista de TNF de molécula pequeña), un fragmento o anticuerpo para IL-18, un antagonista de IL-18 de molécula pequeña o una proteína de unión al receptor de IL-18, un fragmento o anticuerpo para IL-1 (incluidas IL-1 alfa e IL-1 beta), un antagonista del receptor de IL-1 soluble, un antirreumático (por ejemplo, metotrexato, auranofina, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato de oro sodio, sulfato de hidroxicloroquina, leflunomida, sulfasalazina, radioterapia, un antiangiogénico, un agente quimioterapéutico, talidomida, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (AINE), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano (por ejemplo, aminoglucósido, un antifúngico, un antiparasitario, un antiviral, un carbapenem, cefalosporina, una flurorquinolona, un macrólido, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina, otro antimicrobiano), un antipsoriásico, un corticosteroide, un esteroide anabólico, un agente relacionado con la diabetes, un mineral, un producto nutricional, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con calcio, un epoetina (por ejemplo, epoetina alfa), un filgrastim (por ejemplo, G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-CSF, Leukine), una vacunación, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (por ejemplo, basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona de crecimiento, un fármaco de reemplazo hormonal, un modulador del receptor de estrógenos, un midriático, un ciclopléjico, un agente alquilante, un antimetabolito, un antimitótico, un radiofármaco, un antidepresivo, un antimaníaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpaticomimético, un estimulante, donepezilo, tacrina, un medicamento para el asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrienos, una metilxantina, una cromolina, una epinefrina o análogo, dornasa alfa (Pulmozyme), una citocina o un antagonista de citocinas. Las dosis adecuadas son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Wells *et al*., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2ª edición, Appleton y Lange, Stamford, CT (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA (2000).

Los antagonistas de TNF adecuados para las composiciones, la terapia de combinación, la co-administración, y/o los dispositivos de la presente invención (que comprenden adicionalmente al menos un anticuerpo, porción especificada y variante del mismo, de la presente invención), incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-TNF, fragmentos de unión al antígeno de los mismos, y moléculas receptoras que se unen específicamente a TNF; compuestos que previenen y/o inhiben la síntesis de TNF, la liberación de TNF o su acción sobre las células diana, tales como talidomida, tenidap, inhibidores de la fosfodiesterasa (por ejemplo, pentoxifilina y rolipram), agonistas del receptor de adenosina A2b y potenciadores del receptor de adenosina A2b; compuestos que previenen y/o inhiben la señalización de receptor de TNF, tales como los inhibidores de proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAP); compuestos que bloquean y/o inhiben la escisión de TNF de membrana, tales como inhibidores de metaloproteinasas; compuestos que bloquean y/o inhiben la actividad de TNF, tales como la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) (por ejemplo, captopril); y compuestos que bloquean y/o inhiben la producción de TNF y/o la síntesis, tales como inhibidores de MAP quinasas.

Tratamientos terapéuticos.

Cualquier método descrito en el presente documento puede comprender un método para tratar un trastorno mediado por IL-6, que comprende administrar una cantidad eficaz de una composición o composición farmacéutica que comprenda al menos un anticuerpo anti-IL-6 a una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite tal modulación, tratamiento o terapia. Un método de este tipo puede comprender adicionalmente de manera opcional la co-administración o terapia de combinación para el tratamiento de tales enfermedades inmunitarias, en el que la administración de dicho al menos un anticuerpo anti-IL-6, porción especificada o variante del mismo, comprende adicionalmente administrar, antes, al mismo tiempo y/o después, al menos un agente como se ha descrito anteriormente.

Por lo general, el tratamiento de los estados patológicos se efectúa administrando una cantidad o dosis eficaz de al menos una composición de un anticuerpo anti-IL-6 que suma, en promedio, un intervalo de al menos aproximadamente 0,01 a 500 miligramos de al menos un anticuerpo anti-IL-6 por kilogramo de peso del paciente por dosis, y preferentemente de al menos aproximadamente 0,1 a 100 miligramos de anticuerpo/kilogramo de peso del paciente por administración única o múltiple, dependiendo de la actividad específica de contenido en la composición. Como alternativa, la concentración sérica eficaz puede comprender 0,1 µg/ml-5.000 µg/ml de concentración sérica por administración simple o múltiple. Los médicos conocen las dosis adecuadas y, por supuesto, dependerán de la patología concreta, la actividad específica de la composición que se administra y el paciente concreto sometido a

tratamiento. En algunos casos, para alcanzar la cantidad terapéutica deseada, puede ser necesario proporcionar una administración repetida, es decir, administraciones individuales repetidas de una dosis medida o supervisada concreta, en la que se repitan las administraciones individuales hasta que se logre el efecto o la dosis diaria deseada.

Las dosis preferentes pueden incluir opcionalmente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 y/o 100-500 mg/kg/administración, o cualquier intervalo, valor o fracción de los mismos, o para lograr una concentración sérica de 0,1, 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,5, 1,9, 2,0, 2,5, 2,9, 3,0, 3,5, 3,9, 4,0, 4,5, 4,9, 5,0, 5,5, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 20, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14,0, 14,5, 4,9, 5,0, 5,5,, 5,9, 6,0, 6,5, 6,9, 7,0, 7,5, 7,9, 8,0, 8,5, 8,9, 9,0, 9,5, 9,9, 10, 10,5, 10,9, 11, 11,5, 11,9, 12, 12,5, 12,9, 13,0, 13,5, 13,9, 14, 14,5, 15, 15,5, 15,9, 16, 16,5, 16,9, 17, 17,5, 17,9, 18, 18,5, 18,9, 19, 19,5, 19,9, 20, 20,5, 20,9, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.500, 2.000, 2.500, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500 y/o 5.000 µg/ml de concentración sérica por administración única o múltiple, o cualquier intervalo, valor o fracción de los mismos.

Como alternativa, la dosis administrada puede variar dependiendo de factores conocidos, tales como las características farmacodinámicas del agente concreto y su modo y vía de administración; la edad, la salud y el peso del receptor; la naturaleza y el alcance de los síntomas, la clase de tratamiento concurrente, la frecuencia del tratamiento y el efecto deseado. Por lo general, una dosificación de ingrediente activo puede ser de aproximadamente 0,1 a 100 miligramos por kilogramo de peso corporal. Por lo general es eficaz una cantidad de 0,1 a 50 miligramos por kilogramo, y preferentemente de 0,1 a 10 miligramos por kilogramo por administración o en forma de liberación sostenida para obtener los resultados deseados.

Como un ejemplo no limitativo, el tratamiento de seres humanos o animales puede proporcionarse como una dosificación de sola vez o periódica de al menos un anticuerpo de la presente invención de 0,1 mg/kg a 100 mg/kg, tal como 0,5, 0,9, 1,0, 1,1, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 o 100 mg/kg, al día, en al menos uno de los días 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 ó 40, o como alternativa o adicionalmente, en al menos una de la semana 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51 ó 52, o como alternativa o adicionalmente, en al menos uno de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 ó 20 años, o cualquier combinación de los mismos, utilizando dosis únicas, de infusión o repetidas.

Las formas de dosificación (composición) adecuadas para la administración interna contienen generalmente de aproximadamente 0,1 miligramo a aproximadamente 500 miligramos de ingrediente activo por unidad o recipiente. En estas composiciones farmacéuticas el ingrediente activo estará presente por lo común en una cantidad de aproximadamente un 0,5%- 99,999% en peso en base al peso total de la composición.

Formulaciones y administración parenterales

Para la administración parenteral, el anticuerpo puede formularse como una solución, suspensión, emulsión o polvo liofilizado en asociación, o proporcionado por separado, con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptable. Ejemplos de tales vehículos son agua, solución salina, solución de Ringer, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 1%-10%. También pueden utilizarse liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites no volátiles. El vehículo o polvo liofilizado puede contener aditivos que mantengan la isotonicidad (por ejemplo, cloruro de sodio, manitol) y la estabilidad química (por ejemplo, tampones y conservantes). La formulación se esteriliza mediante técnicas conocidas o adecuadas.

Los vehículos farmacéuticos adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, un texto de referencia habitual en este campo.

Las formulaciones para la administración parenteral pueden contener como excipientes comunes agua estéril o solución salina, polialquilenglicoles tales como polietilenglicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y similares. Pueden prepararse suspensiones acuosas u oleosas para inyección utilizando un emulsionante o humidificador apropiado y un agente de suspensión, según métodos conocidos. Los agentes para inyección pueden ser un agente de dilución no tóxico no administrable por vía oral, tal como una solución acuosa o una suspensión o solución inyectable estéril en un disolvente. Como vehículo o disolvente utilizable, se admiten agua, solución de Ringer, solución salina isotónica, etc.; como disolvente común, o disolvente en suspensión, puede utilizarse aceite no volátil estéril. Para ello, puede utilizarse cualquier tipo de ácido graso y aceite no volátil, incluidos ácidos grasos o aceites grasos naturales o sintéticos o semisintéticos; mono- di- o triglicéridos naturales o sintéticos o semisintéticos. La administración parenteral se conoce en la técnica e incluye, pero no se limita a, los medios

convencionales de inyección, un dispositivo de inyección sin aguja con gas presurizado como se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.851.198, y un dispositivo perforador con láser como se describe en la patente de EE.UU. Nº 5.839.446.

Administración alternativa

Un anticuerpo anti-IL-6 puede administrarse por vía parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelial, intracerebelar, intracerebroventricular, intracolónica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocárdica, intraosteal, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarrectal, intrarrenal, intrarretiniana, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, transdérmica o por bolo. Puede prepararse al menos una composición de un anticuerpo anti-IL-6 para su uso para la administración parenteral (subcutánea, intramuscular o intravenosa) o cualquier otra administración particularmente en forma de soluciones o suspensiones líquidas; para su uso en la administración vaginal o rectal particularmente en formas semisólidas tales como, pero no limitadas a, cremas y supositorios; para la administración bucal o sublingual tal como, pero no limitada a, en forma de comprimidos o cápsulas; o por vía intranasal tal como, pero no limitada a, en forma de polvos, aerosoles o gotas nasales o determinados agentes; o por vía transdérmica, tal como sin limitarse a un gel, pomada, loción, suspensión o sistema de administración mediante parche con potenciadores químicos tales como dimetilsulfóxido para modificar la estructura de la piel o para aumentar la concentración de fármaco en el parche transdérmico (Junginger, *et al*. en "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D.S., Eds., págs. 59-90 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1994), o con agentes oxidantes que permiten la aplicación de formulaciones que contienen proteínas y péptidos sobre la piel (documento WO 98/53847), o aplicaciones de campos eléctricos para crear vías de transporte transitorias tal como electroporación, o para aumentar la movilidad de los fármacos cargados a través de la piel tal como iontoforesis, o aplicación de ultrasonidos tal como sonoforesis (patentes de EE.UU. Nº 4.309.989 y 4.767.402).

Administración pulmonar/nasal

Para la administración pulmonar, preferentemente se administra al menos una composición de anticuerpo anti-IL-6 en un tamaño de partícula eficaz para alcanzar las vías respiratorias inferiores de los pulmones o los senos paranasales. Puede administrarse un anticuerpo anti-IL-6 mediante cualquiera de diversos dispositivos nasales o de inhalación conocidos en la técnica para la administración de un agente terapéutico por inhalación. Estos dispositivos capaces de depositar formulaciones en aerosol en la cavidad sinusal o en los alvéolos de un paciente incluyen nebulizadores, generadores de polvo seco, pulverizadores, inhaladores de dosis medida, y similares. También se conocen en la técnica otros dispositivos adecuados para dirigir la administración pulmonar o nasal de anticuerpos. Todos estos dispositivos pueden hacer uso de formulaciones adecuadas para la administración para dispersar el anticuerpo en un aerosol. Tales aerosoles pueden estar compuestos por cualquiera de las soluciones (tanto acuosa como no acuosa) o partículas sólidas. Los inhaladores de dosis medida como el inhalador de dosis medida Ventolin®, utilizan por lo general un gas propulsor y requieren el accionamiento durante la inspiración (véanse, por ejemplo, los documentos WO 94/16970, WO 98/35888). Los inhaladores de polvo seco como Turbuhaler™ (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Discus® (Glaxo), inhalador Spiros™ (Dura), dispositivos comercializados por Inhale Therapeutics y el inhalador de polvo Spinhaler® (Fisons), utilizan el accionamiento por la respiración de un polvo mixto (EE.UU. 4.668.218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, EE.UU. 5.458.135 Inhale, WO 94/06498 Fisons). Los nebulizadores como AERx™ de Aradigm, el nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt), y el nebulizador Acorn II® (Marquest Medical Products) (EE.UU. 5.404.871 Aradigm, WO 97/22376), producen aerosoles a partir de soluciones, mientras que los inhaladores de dosis medida, inhaladores de polvo seco, etc. generan aerosoles de partículas pequeñas. Estos ejemplos específicos de dispositivos de inhalación disponibles en el mercado pretenden ser representativos de los dispositivos específicos adecuados para esta práctica, y no pretenden ser limitativos. Preferentemente, una composición que comprende al menos un anticuerpo anti-IL-6 se administra mediante un inhalador de polvo seco o un pulverizador. Hay varias características deseables de un dispositivo de inhalación para la administración de al menos un anticuerpo de la presente invención. Por ejemplo, la administración mediante el dispositivo de inhalación es ventajosamente fiable, reproducible y precisa. El dispositivo de inhalación puede administrar opcionalmente partículas secas pequeñas, por ejemplo, inferiores a aproximadamente 10 µm, preferentemente de aproximadamente 1 µm-5 µm, para una buena respirabilidad.

Administración de composiciones de anticuerpo para IL-6 como aerosol

Puede producirse un aerosol que incluya la proteína de la composición de anticuerpo para IL-6 forzando una suspensión o solución de al menos un anticuerpo anti-IL-6 a través de una boquilla a presión. Pueden elegirse la configuración y el tamaño de la boquilla, la presión aplicada, y la velocidad de alimentación de líquido para conseguir el tamaño de partícula y la salida deseada. Puede producirse un electrospray, por ejemplo, mediante un campo eléctrico en conexión con un capilar o boquilla de alimentación. Ventajosamente, las partículas de al menos una proteína de la composición de anticuerpo anti-IL-6 administradas por un pulverizador tienen un tamaño de partícula inferior a aproximadamente 10 µm, preferentemente en el intervalo comprendido entre aproximadamente 1 µm a aproximadamente 5 µm, y lo más preferentemente de aproximadamente 2 µm a aproximadamente 3 µm.

Las formulaciones de al menos una proteína de la composición de anticuerpo anti-IL-6 adecuadas para su uso con un pulverizador incluyen por lo general la proteína de la composición de anticuerpo en una solución acuosa a una concentración de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg de al menos una proteína de la composición de anticuerpo anti-IL-6 por ml de solución o en mg/g, o cualquier intervalo o valor en el mismo, por ejemplo, pero no limitado a, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16,17,18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90 ó 100 mg/ml o mg/g. La formulación puede incluir agentes tales como un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un tensioactivo y, preferentemente, zinc. La formulación también puede incluir un excipiente o agente para la estabilización de la proteína de la composición de anticuerpo, tal como un tampón, un agente reductor, una proteína en bruto o un hidrato de carbono. Las proteínas en bruto útiles en la formulación de las proteínas de composición de anticuerpo incluyen albúmina, protamina, o similares. Los hidratos de carbono típicos útiles en la formulación de las proteínas de composición de anticuerpo incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa, o similares. La formulación de proteína de la composición de anticuerpo también puede incluir un tensioactivo, que puede reducir o prevenir la agregación inducida por la superficie de la proteína de la composición de anticuerpo causada por la atomización de la solución al formar un aerosol. Pueden emplearse diversos tensioactivos convencionales, tales como alcoholes y ésteres de ácidos grasos de polioxietileno, y ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitol. Las cantidades variarán generalmente entre un 0,001% y un 14% en peso de la formulación. Los tensioactivos especialmente preferentes para estos fines son monooleato de polioxietilensorbitán, polisorbato 80, polisorbato 20, o similares. También pueden incluirse en la formulación agentes adicionales conocidos en la técnica para la formulación de una proteína tal como los anticuerpos para IL-6, o porciones especificadas o variantes.

Administración de composiciones de anticuerpo para IL-6 mediante un nebulizador

La proteína de la composición de anticuerpo puede administrarse mediante un nebulizador, tal como un nebulizador de chorro o un nebulizador ultrasónico. Por lo general, en un nebulizador de chorro, se utiliza una fuente de aire comprimido para crear un chorro de aire a alta velocidad a través de un orificio. A medida que el gas se expande más allá de la boquilla, se crea una región de baja presión, que arrastra una solución de proteína de la composición de anticuerpo a través de un tubo capilar conectado a un depósito de líquido. La corriente de líquido desde el tubo capilar se cizalla en gotitas y filamentos inestables a medida que sale del tubo, creando el aerosol. Puede emplearse una variedad de configuraciones, caudales y tipos de deflectores para conseguir las características de rendimiento deseadas de un determinado nebulizador de chorro. En un nebulizador ultrasónico, se utiliza energía eléctrica de alta frecuencia para crear energía mecánica de vibración, empleando por lo general un transductor piezoeléctrico. Esta energía se transmite a la formulación de proteína de la composición de anticuerpo directamente o a través de un líquido de acoplamiento, creando un aerosol que incluye la proteína de la composición de anticuerpo. Ventajosamente, las partículas de proteína de la composición de anticuerpo administradas por un nebulizador tienen un tamaño de partícula inferior a aproximadamente 10 µm, preferentemente en el intervalo comprendido entre aproximadamente 1 µm y aproximadamente 5 µm, y los más preferentemente entre aproximadamente 2 µm y aproximadamente 3 µm.

Las formulaciones de al menos un anticuerpo anti-IL-6 adecuadas para su uso con un nebulizador, ya sea de chorro o ultrasónico, incluyen por lo general una concentración de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg de al menos una proteína anticuerpo anti-IL-6 por ml de solución. La formulación puede incluir agentes tales como un excipiente, un tampón, un agente de isotonicidad, un conservante, un tensioactivo, y, preferentemente, zinc. La formulación también puede incluir un excipiente o agente para la estabilización de la al menos una proteína de la composición de anticuerpo anti-IL-6, tal como un tampón, un agente reductor, una proteína en bruto, o un hidrato de carbono. Las proteínas en bruto útiles en la formulación de al menos una proteína de la composición de anticuerpo anti-IL-6 incluyen albúmina, protamina, o similares. Los hidratos de carbono típicos útiles en la formulación de al menos un anticuerpo anti-IL-6 incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa, o similares. La formulación de al menos un anticuerpo anti-IL-6 también puede incluir un tensioactivo, que puede reducir o prevenir la agregación inducida por la superficie del al menos un anticuerpo anti-IL-6 causada por la atomización de la solución al formarse un aerosol. Pueden emplearse diversos tensioactivos convencionales, tales como alcoholes y ésteres de ácidos grasos de polioxietileno, y ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitol. Las cantidades variarán generalmente entre un 0,001% y un 4% en peso de la formulación. Los tensioactivos especialmente preferentes para estos fines son monooleato de polioxietilensorbitán, polisorbato 80, polisorbato 20, o similares. También pueden incluirse en la formulación agentes adicionales conocidos en la técnica para la formulación de una proteína tal como la proteína anticuerpo.

Administración de composiciones de anticuerpo para IL-6 mediante un inhalador de dosis medida

En un inhalador de dosis medida (MDI), un propelente, al menos un anticuerpo anti-IL-6, y cualquier excipiente u otros aditivos están contenidos en un recipiente como una mezcla que incluye un gas comprimido licuado. El accionamiento de la válvula dosificadora libera la mezcla en forma de aerosol, que contiene preferentemente partículas en el intervalo de tamaño inferior a aproximadamente 10 µm, preferentemente de aproximadamente 1 µm a aproximadamente 5 µm, y lo más preferentemente de aproximadamente 2 µm a

aproximadamente 3 µm. El tamaño de partícula de aerosol deseado puede obtenerse empleando una formulación de proteína de la composición de anticuerpo producida mediante diversos métodos conocidos por los expertos en la materia, incluidos molienda por chorro, secado por pulverización, condensación de punto crítico, o similares. Los inhaladores de dosis medida preferentes incluyen los fabricados por 3M o Glaxo y el empleo de un propelente de hidrofluorocarbono.

Las formulaciones de al menos un anticuerpo anti-IL-6 para su uso con un dispositivo inhalador de dosis medida incluirán generalmente un polvo finamente dividido que contiene al menos un anticuerpo anti-IL-6 como suspensión en un medio no acuoso, por ejemplo, suspendido en un propelente con la ayuda de un tensioactivo. El propelente puede ser cualquier material convencional empleado para este fin, tal como clorofluorocarbono, un hidroclorofluorocarbono, un hidrofluorocarbono o un hidrocarburo, incluidos triclorofluorometano, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetanol y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, HFA-134a (hidrofluoroalcano-134a), HFA-227 (hidrofluoroalcano-227), o similares. Preferentemente, el propelente es un hidrofluorocarbono. Puede elegirse el tensioactivo para que estabilice el al menos un anticuerpo anti-IL-6 como suspensión en el propelente, para proteger el agente activo frente a la degradación química, y similares. Los tensioactivos adecuados incluyen trioleato de sorbitán, lecitina de soja, ácido oleico, o similares. En algunos casos resultan preferentes los aerosoles en solución que utilizan disolventes tales como etanol. También pueden incluirse en la formulación agentes adicionales conocidos en la técnica para la formulación de una proteína tal como la proteína.

Un experto en la materia reconocerá que los métodos pueden conseguirse mediante la administración pulmonar de al menos una composición de anticuerpo anti-IL-6 por medio de dispositivos no descritos en el presente documento.

Formulaciones y administración orales

Las formulaciones para la administración oral se basan en la co-administración de adyuvantes (por ejemplo, resorcinoles y tensioactivos no iónicos tales como polioxietilen oleil éter y n-hexadecil polietilen éter) para aumentar artificialmente la permeabilidad de las paredes intestinales, así como la co-administración de inhibidores enzimáticos (por ejemplo, inhibidores de la tripsina pancreática, diisopropil fluorofosfato (DFF) y trasilol) para inhibir la degradación enzimática. Puede mezclarse el compuesto integrante activo de la forma de dosificación de tipo sólido para la administración oral con al menos un aditivo, incluido sacarosa, lactosa, celulosa, manitol, trehalosa, rafinosa, maltitol, dextrano, almidones, agar, arginatos, quitinas, quitosanos, pectinas, goma de tragacanto, goma arábiga, gelatina, colágeno, caseína, albúmina, polímeros sintéticos o semisintéticos y glicérido. Estas formas de dosificación también pueden contener otro(s) tipo(s) de aditivos, por ejemplo, un diluyente inactivo, un lubricante tal como estearato de magnesio, parabeno, un conservante tal como ácido sórbico, ácido ascórbico, alfa-tocoferol, un antioxidante tal como cisteína, un disgregante, un aglutinante, un espesante, un agente tampón, un edulcorante, un saporífero, un aromatizante, etc.

Los comprimidos y píldoras pueden procesarse adicionalmente en preparaciones con cubierta entérica. Las preparaciones líquidas para la administración oral incluyen preparaciones en solución, suspensión, elixir, jarabe, y emulsión, y permitidos para su uso médico. Estas preparaciones pueden contener agentes diluyentes inactivos utilizados por lo común en dicho campo, por ejemplo, agua. También se han descrito los liposomas como sistemas de transporte de fármacos para la insulina y la heparina (patente de EE.UU Nº 4.239.754). Más recientemente, se han utilizado microesferas de polímeros artificiales de aminoácidos mixtos (proteinoides) para transportar productos farmacéuticos (patente de EE.UU Nº 4.925.673). Además, los compuestos transportadores descritos en la patente de EE.UU. Nº 5.879.681 y en la patente de EE.UU. Nº 5.5871.753 se utilizan para administrar agentes biológicamente activos por vía oral son conocidos en la técnica.

Formulaciones y administración por vía mucosa

Para la absorción a través de las superficies mucosas, las composiciones y los métodos de administración de al menos un anticuerpo anti-IL-6 incluyen una emulsión que comprende una pluralidad de partículas submicrométricas, una macromolécula mucoadhesiva, un péptido bioactivo y una fase continua acuosa, que promueve la absorción a través de las superficies mucosas consiguiendo la mucoadhesión de las partículas de emulsión (patente de EE.UU. Nº 5.514.670). Las superficies mucosas adecuadas para la aplicación de las emulsiones de la presente invención pueden incluir las vías de administración por la córnea, conjuntival, bucal, sublingual, nasal, vaginal, pulmonar, estomacal, intestinal y rectal. Las formulaciones para la administración vaginal o rectal, por ejemplo, supositorios, pueden contener como excipientes, por ejemplo, polialquilenglicoles, vaselina, manteca de cacao, y similares. Las formulaciones para la administración intranasal pueden ser sólidas y contener como excipientes, por ejemplo, lactosa o pueden ser soluciones acuosas u oleosas de gotas nasales. Para la administración bucal, los excipientes incluyen azúcares, estearato de calcio, estearato de magnesio, almidón pregelatinizado, y similares (patente de EE.UU. Nº 5.849.695).

Formulaciones y administración transdérmica

Para la administración transdérmica, el al menos un anticuerpo anti-IL-6 se encapsula en un dispositivo de transporte tal como un liposoma o nanopartículas, micropartículas, microcápsulas o microesferas poliméricas (conocidas colectivamente como micropartículas a menos que se indique lo contrario). Se conocen varios dispositivos adecuados, incluidas las micropartículas hechas de polímeros sintéticos, tales como ácidos polihidroxilados tal como el ácido poliláctico, ácido poliglicólico y copolímeros de los mismos, poliortoésteres, polianhídridos y polifosfacenos, y polímeros naturales tales como colágeno, poliaminoácidos, albúmina y otras proteínas, alginato y otros polisacáridos, y combinaciones de los mismos (patente de EE.UU. Nº 5.814.599).

Formulaciones y administración prolongada

A veces puede ser deseable administrar los compuestos de la presente invención al sujeto durante períodos prolongados de tiempo, por ejemplo, durante períodos de una semana a un año a partir de una sola administración. Pueden utilizarse diversas formas de dosificación mediante implantes o depot, de liberación lenta. Por ejemplo, una forma de dosificación puede contener una sal no tóxica farmacéuticamente aceptable de los compuestos que tenga un bajo grado de solubilidad en los fluidos corporales, por ejemplo, (a) una sal de adición de ácido con un ácido polibásico tal como ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido tánico, ácido pamoico, ácido algínico, ácido poliglutámico, ácidos naftalen mono- o di-sulfónicos, ácido poligalacturónico, y similares; (b) una sal con un catión metálico polivalente tal como zinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio y similares, o con un catión orgánico formado a partir de por ejemplo, N,N'-dibencil-etilendiamina o etilendiamina; o (c) combinaciones de (a) y (b), por ejemplo, una sal de tanato de zinc. Además, los compuestos de la presente invención o, preferentemente, una sal relativamente insoluble tal como las que se acaban de describir, pueden formularse en un gel, por ejemplo, un gel de monoestearato de aluminio con, por ejemplo, aceite de sésamo, adecuado para inyección. Las sales especialmente preferentes son sales de zinc, sales de tanato de zinc, sales de pamoato, y similares. Otro tipo de formulación depot de liberación lenta para inyección contendría el compuesto o sal dispersada para encapsularse en un polímero no antigénico y no tóxico, de degradación lenta, tal como un polímero de ácido poliláctico/ácido poliglicólico, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. Nº 3.773.919. Los compuestos o, preferentemente, las sales relativamente insolubles tales como las descritas anteriormente también pueden formularse en microgránulos de Silastic de matriz de colesterol, especialmente para el uso en animales. En la literatura se conocen formulaciones depot o de implante de liberación lenta adicionales por ejemplo, liposomas con gas o líquido (patentes de EE.UU. Nº 5.770.222 y "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J.R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978).

Abreviaturas

BSA - albúmina de suero bovino
EIA - inmunoensayo enzimático
FBS - suero fetal bovino
H2O2 - peróxido de hidrógeno
HRP - peroxidasa de rábano
Ig - inmunoglobulina
IL-6 - interleucina-6
IP - intraperitoneal
IV - intravenoso
Mab - anticuerpo monoclonal
OD - densidad óptica
OPD - diclorhidrato de o-fenilendiamina
PEG - polietilenglicol
PSA - penicilina, estreptomicina, anfotericina
RT - temperatura ambiente
SQ - subcutáneo
v/v - volumen por volumen
p/v - peso por volumen

EJEMPLO I: GENERACIÓN DE MAB CLB8 MURINO

Inmunización

El hibridoma que da como resultado la anticuerpo CLB-IL6-8 murino se derivó de una fusión realizada en un laboratorio del Dr. Lucien Aarden, Central Laboratory of the Netherlands Red Cross Transfusion Service (CLB) como se ha informado (Brackenhoff *et al*., J. Immunol. (1990) 145:561-568).

Se inmunizaron, por vía intramuscular (IM), ratones hembra Balb/c de ocho semanas de edad obtenidos de animales reproductores libres de los patógenos especificados del CLB, con 10 µg de interleucina-6 recombinante

(rIL-6) (CLB) purificada emulsionada en adyuvante completo de Freund. Se llevaron a cabo tres inyecciones IM posteriores, cada una de ellas con 10 µg de rIL-6 en adyuvante incompleto de Freund, a intervalos de 4-8 semanas.

Fusión celular

Cuatro días después de la última inyección IM de refuerzo, se sacrificó un ratón; se le retiró el bazo y se picó finamente. Se obtuvo una suspensión de células individuales en solución salina equilibrada de Earle ambiental. Se lavaron y contaron las células. Se llevó a cabo una fusión en una relación 1:3 de células de bazo viables respecto a células de mieloma murino (SP2/0-Ag14) en presencia de polietilenglicol al 42% (p/v) en medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM). Se estableció la pareja de fusión no secretora de Ig SP2/0 a partir de un banco de células mantenido en el CLB. Después de la fusión, se resuspendieron las células en IMDM complementado con suero fetal bovino al 5%, 50 µM de penicilina/estreptomicina, 2-mercaptoetanol $5x10^{-5}$ M (2-ME) y HAT (hipoxantina 6x10-4 M, aminopterina $6,5x10^{-7}$ M, timidina $6,4x10^{-5}$ M). La proliferación de estos hibridomas inmediatamente después de la fusión es dependiente de IL-6, por lo tanto, se añadieron al medio de selección 100 U/ml de IL-6 murina purificada (Van Smick, Bruselas). A continuación se distribuyen las células fusionadas en placas de 96 pocillos a $1x10^5$ células/pocillo de 100 µl.

Caracterización primaria de hibridomas anti-IL-6 murinos

Los híbridos secretores de anti-IL-6 se seleccionaron mediante un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y un radioinmunoensayo (RIA) (Brackenhoff *et al* (1990) 145:561-568). Se empleó un ELISA en fase sólida para el cribado de los anticuerpos monoclonales específicos para la IL-6 humana. Se recubrieron placas de fondo plano (Dynatech), 100 µl/pocillo, con rIL-6 purificado (0,5 µg/ml) durante toda la noche a temperatura ambiente en tampón de fosfato salino (PBS). Se lavaron las placas con PBS, Tween 20 al 0,02% (v/v) (PBS/Tween) y se incubaron con diluciones 1:2 de sobrenadantes de cultivo en PBS/Tween complementado con gelatina al 0,2% (PTG) durante 2 horas a temperatura ambiente. Después del lavado, se incubaron las placas con monoclonal de rata anti-cadena ligera kappa de ratón 226 (Einstein University, NY) conjugado con peroxidasa de rábano en PTG (2 µg/ml) durante 1 hora. Se lavaron las placas y se detectó la peroxidasa unida con 100 µl/pocillo de 3,5,3,5, tetrametilbencidina/peróxido de hidrógeno al 0,003% en acetato de sodio 0,1-M, pH 5,5. Se detuvo la reacción coloreada con H_2SO_4 2M y se leyeron las placas a 450 nM en un lector Multiscan de Titertek. Se eligieron los pocillos que dieron una OD positiva.

También se empleó un RIA en fase sólida para el cribado de hibridomas anti-IL-6. Se acoplaron anticuerpos de cabra anti-Ig murina con sefarosa CL-4B activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia). Se lavó la sefarosa y se resuspendió a 10 mg/ml en PBS, Tween 20 al 0,1%, azida de sodio al 0,1%. Se añadieron los sobrenadantes de hibridoma a perlas de sefarosa en presencia de aproximadamente 20.000 recuentos/minuto de 125I-rIL-6 (CLB) durante 6 horas con mezcla constante. Se lavaron exhaustivamente las perlas en PBS/Tween y se contaron en un contador gamma. Se eligieron los pocillos que dieron las actividades específicas más altas.

Los hibridomas que fueron positivos en ambos sistemas de ensayo se establecieron y subclonaron dos veces a diluciones limitantes en IMDM complementado con 2x10-5 M 2-ME y SFB al 5% (IMDM completo). Se seleccionó el subclon CLB-IL6-8 independiente de IL-6 y se mantuvo en IMDM completo. Los cultivos madre dieron negativo para micoplasma utilizando una tinción de Hoescht indirecta después de 4 días de cultivo en células diana Vero76. La determinación del isotipo del sobrenadante por medio del kit de isotipo de anticuerpo monoclonal de ratón Innogenetics Line ImmunoAssay (INNO-LIA) dio un solo isotipo IgG1 kappa murino. Esta determinación de isotipo se confirmó mediante un EIA de captura.

El hibridoma murino y la línea celular se produjo así, CLBIL-6/8 se denominó CLB 8. Se quimerizó y se caracterizó adicionalmente como se describe a continuación.

EJEMPLO 2: QUIMERIZACIÓN Y SECUENCIACIÓN

Clonación y expresión de los genes de la región variable de cCLB8

Se aisló el ADN genómico del hibridoma murino C143A que segrega un anticuerpo monoclonal murino específico para la IL-6 humana.

Para la cadena ligera, se digirió el ADN con la endonucleasa de restricción Hind III y se sometió a electroforesis a través de un gel de agarosa al 0,8%. Se cortó la porción del gel que contenía fragmentos de ADN de aproximadamente 3,4 kb de longitud, y se eluyó el ADN. Se ligaron los fragmentos en el vector 8charon27, y se empaquetaron en partículas de bacteriófago. Para la cadena pesada, se digirió el ADN con la endonucleasa de restricción Eco RI y se sometió a electroforesis a través de un gel de agarosa al 0,8%. Se cortó la porción del gel que contenía fragmentos de ADN de aproximadamente 3,6 kb de longitud, y se eluyó el ADN. Se ligaron los fragmentos en el vector 8gt10, y se empaquetaron en partículas de bacteriófago.

Se sembraron bibliotecas de bacteriófagos de cadena pesada y ligera en *E. coli*, y se cultivaron durante toda la noche. Las placas se transfirieron a filtros de nitrocelulosa y se hibridaron con fragmentos de ADN marcado con ^{32}P correspondientes a secuencias de J_κ murina (cadena ligera) o J_H murina. Se identificaron las placas positivas y se purificaron en placa. Se aisló el ADN de los fagos y se aislaron los insertos Hind III (cadena ligera) o Eco RI (cadena pesada) y se clonaron en vectores de expresión de inmunoglobulina.

Se utilizaron plásmidos de expresión de la cadena pesada y ligera para cotransfectar células SP2/0, y se aplicó selección con ácido micofenólico. Se identificaron y subclonaron los clones individuales que producían el anticuerpo híbrido para asegurar la monoclonalidad y para generar productores superiores.

Se ensayó el anticuerpo purificado a partir de líneas celulares individuales para determinar la capacidad de neutralización en un ensayo de proliferación de células B9 dependiente de IL-6. El anticuerpo híbrido se denomina CLB8 o cCLB8 a lo largo de toda la presente solicitud.

Región variable de la cadena pesada de cCLB8

```
E   V   Q   L   V   E   S   G   G   K   L   L   K   P   G   G   S   L   K   L
GAG GTG CAA CTG GTG GAA TCT GGA GGA AAA TTA CTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC

S   C   A   A   S   G   F   T   F   S   S   F   A   M   S   W   F   R   Q   S
TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TTT GCC ATG TCT TGG TTT CGC CAG TCT
                                                                        CDR 1

 P   E   K   R   L   E   W   V   A   E   I   S   S   G   G   S   Y   T   Y   Y
CCA GAG AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA GAA ATT AGT AGT GGT GGG AGT TAC ACC TAC TAT

      CDR 2

  P   D   T   V   T   G   R   F   T   I   S   R   D   N   A   K   N   T   L   Y
CCT GAC ACT GTG ACG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTG TAC

  L   E   M   S   S   L   R   S   E   D   T   A   M   Y   Y   C   A   R   G   L
CTG GAA ATG AGC AGT CTG AGG TCT GAG GAC ACG GCC ATG TAT TAT TGT GCA AGG GGT TTA

  W   G   Y   Y   A   L   D   Y   W   G   Q   G   T   S   V   T   V   S   S
TGG GGG TAC TAT GCT CTT GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA
        CDR 3
```

Región variable de la cadena Ligera de cCLB8

Q I V L I Q S P A I M S A S P G E K V T

CAA ATT GTT CTC ATA CAG TCT CCA GCA ATC ATG TCT GCA TCT CCA GGG GAG AAG GTC ACC

M T C S A S S S V S Y M Y W Y Q Q K P G

ATG ACC TGC AGT GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATG TAC TGG TAC CAG CAG AAG CCA GGA

CDR 1

S S P R L L I Y D T S N L A S G V P V R

TCC TCC CCC AGA CTC CTG ATT TAT GAC ACA TCC AAC CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGC

CDR 2

F S G S G S G T S Y S L T I S R M E A E

TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACC TCT TAC TCT CTC ACA ATC AGC CGA ATG GAG GCT GAG

D A A T Y Y C Q Q W S G Y P Y T F G G G

GAT GCT GCC ACT TAT TAC TGC CAG CAG TGG AGT GGT TAC CCA TAC ACG TTC GGA GGG GGG

CDR 3

T K L E I K

ACC AAG CTG GAA ATA AAA

EJEMPLO 3. MEDIDA DE LA UNIÓN DE cCLB8 A LA IL-6 HUMANA MEDIANTE EIA EN FASE SÓLIDA

Se utilizó un EIA en fase sólida para evaluar las características de unión del Mab cCLB8 a la IL-6 humana. En resumen, se recubrieron las placas con IL-6 humana recombinante (RDI) a 1 µg/ml en PBS durante toda la noche a 4°C. Después del lavado en solución salina 0,15 M que contenía Tween 20 al 0,02% (v/v), se bloquearon los pocillos con BSA al 1% (p/v) en PBS, 200 µl/pocillo durante 1 hora a RT. Se incubó el anticuerpo purificado en diluciones dobles en serie a partir de una concentración inicial de 5 µg/ml durante 1 hora a 37°C. Se lavó la placa y a continuación se hibridó con 50 µl/pocillo de anticuerpo de cabra anti-IgG humana marcado con HRP (Tago) diluida 1:20.000 en PBS-BSA al 1% durante 1 hora a RT. Se lavó de nuevo la placa y se añadieron 100 µl/pocillo de la solución de sustrato citrato-fosfato (ácido cítrico 0,1 M y fosfato de sodio 0,2 M, H_2O_2 al 0,01% y 1 mg/ml de OPD) durante 15 minutos a RT. A continuación se añadió solución de parada (ácido sulfúrico 4N) a 25 µl/pocillo y se cuantificó la absorción a 490 nm utilizando un fotómetro de placa automatizado. La figura 1 muestra la unión de cCLB8 a IL-6 medida como OD 490 nm que demuestra que cCLB8 se une a la IL-6 humana recombinante de una forma dependiente de la concentración.

EJEMPLO 4. ENSAYOS DE NEUTRALIZACIÓN *IN VITRO*

El bloqueo de IL-6 por cCLB8 inhibe la secreción de IgM y MCP-1

Se evaluó el anticuerpo monoclonal híbrido cCLB8 en dos formatos de bioensayo simple para determinar su bioactividad neutralizante sobre la secreción inducida por IL-6 de la IgM humana y la quimiocina MCP-1. En estos estudios se utilizaron dos líneas celulares humanas. La línea celular SKW6.4 se derivó originalmente de un linfoma de Burkitt de linfocitos B transformados por EBV y que segrega IgM soluble en respuesta a la IL-6. La línea celular U937 es monoblástica, comprometida con la diferenciación de monocitos y se aisló originalmente de un paciente con linfoma histiocítico difuso. Las células U937 secretan MCP-1 en respuesta a la IL-6. Se evaluó la inhibición por cCLB8 de estas bioactividades concretas, ya que podían supervisarse fácilmente utilizando un formato de EIA. Antes del ensayo, se privó a las células de suero durante toda la noche y a continuación se cultivaron al día siguiente en solitario, con IL-6 o con IL-6 preincubada con diversas concentraciones de anticuerpo o un anticuerpo de control negativo. A las 72 horas de incubación, ser recogieron los sobrenadantes y se utilizaron en EIA específicos para IgM y para MCP-1. Los resultados, como se muestra en las figuras 2 y 3, demuestran que cCLB8 inhibe significativamente la secreción de IgM y MCP-1 mediada por IL-6 *in vitro*.

En el experimento representado en la figura 2, se recubrieron placas de EIA con anticuerpo de cabra anti-IgM humana, Fc5µ, específico de fragmento, en tampón carbonato 10 mM, pH 9,6 durante toda la noche a 4°C. Se lavaron las placas con solución salina 0,15 M con Tween 20 al 0,02% v/v y se bloquearon con PBS/BSA al 1% p/v durante 1 hora. Se añadió el sobrenadante del cultivo celular en diluciones dobles en serie. Después de la incubación y posteriores lavados con Tween al 0,02%, solución salina 0,15 M, se hibridó la placa con anticuerpo de cabra anti-IgM humana específico de cadena µ, marcado con HRP. A continuación se añadió el sustrato OPD y siguiendo el desarrollo del color, se leyó la OD a 490 nm. Los datos indican que cCLB8, pero no el mAb híbrido de control negativo emparejado por isotipo, inhibe la secreción de IgM mu.

En el experimento representado en la figura 3, se recubrieron placas de EIA con anticuerpo de cabra anti-MCP-1 humana en tampón carbonato 10 mM, pH 9,6 durante toda la noche a 4°C. Se lavaron las placas con solución salina 0,15 M con Tween 20 al 0,02% v/v y se bloquearon con PBS/BSA al 1% p/v durante 1 hora. Se añadió el sobrenadante del cultivo celular en diluciones dobles en serie. Después de una incubación de dos horas y posteriores lavados con Tween al 0,02%, solución salina 0,15 M, se hibridó la placa con anticuerpo anti-MCP-1 humana biotinilado según las instrucciones del fabricante. Se lavaron las placas de nuevo y se añadió estreptavidina marcada con HRP durante 1 hora. Se realizó el desarrollo de color con sustrato TMB. Se leyó la OD a 450. Los datos indican que cCLB8, pero no cK931, inhibe la producción de MCP-1 mediada por IL-6.

Neutralización de la fosforilación de STAT3 mediada por IL-6.

El receptor de IL-6 consiste en una subunidad de unión de 80 kD, IL6Rα y la subunidad de transducción de señales, gp130. IL-6 se une a la subunidad IL6Rα e inicia la asociación de IL6Rα y gp130 que da como resultado un receptor de alta afinidad y la transducción de señales. IL6Rα también existe en una forma soluble. IL6 puede unirse a la IL6R soluble (sIL6R) y el complejo puede actuar sobre las células que expresan gp130. Se ha demostrado que IL6 activa la STAT3. Se utilizó una línea celular humana de leucemia monocítica aguda, THP-1, para demostrar la inhibición de la fosforilación de STAT3 por cCLB8. Se estimularon las células con (IL6 + sIL6R) +/- cCLB8 o un anticuerpo irrelevante (K931) como control negativo. Se inmunoprecipitaron los lisados celulares con anti-STAT3, se resolvieron las muestras en SDS-PAGE al 7,5% y se transfirieron a una membrana Hybond-P, seguido de transferencia de Western utilizando antifosfotirosina-HRP. Para la detección se utilizó ECLplus.

Los datos representados en la Figura 4 demuestran que cCLB8 puede inhibir la fosforilación de STAT3 cuando a) se permite que se una a rhIL6 antes de la adición de sIL6R, b) se permite que se una a sIL6R antes de la adición de rhIL6, o c) cuando se permite que rhIL6 se una a sIL6R antes de la adición de cCLB8 y células. Se incubaron células THP-1 en medios sin suero durante 16 horas, se rasparon de los matraces y se resuspendieron en 0,5 ml de medio. Calles 2-6, se incubó IL6 +/- anticuerpo durante 15 minutos, a continuación, se añadió sIL6R y se incubó durante 15 minutos. Se añadieron las células y se incubaron 15 minutos más. Calle 7, se incubó IL6 con sIL6R durante 15 minutos, a continuación, se añadió CLB-IL6 y se incubaron durante 15 minutos. Se añadieron las células y se incubó 15 minutos más. Las muestras se inmunoprecipitaron con anti-STAT3 [1 µg/ml], se resuspendieron en tampón de muestra de Laemmli y se resolvieron en SDS-PAGE al 7,5% y se transfirieron a Hybond-P. La membrana se incubó con anti-fosfotirosina-HRP.

cCLB8 inhibe la producción de amiloide A sérico

IL-1β es un potente inductor de la producción de amiloide A sérico (SAA) de células HepG2 de hepatoma humano en presencia de IL-6 humana (Smith y McDonald, Clin. Exp. Immunol. 90:293-9 (1992)). Por lo tanto, se ensayó el Mab cCLB8 para determinar su capacidad para inhibir la producción de SAA inducida por IL-1β/IL-6 de estas células. En resumen, se sembraron células HepG2 a 2,25 x 10^5/pocillo durante 24 horas. Se preincubaron IL-6 (100 ng/ml, RDI) e IL-6sR (200 ng/ml, S&D) durante 30 minutos, y se mezclaron con IL-1β (1 ng/ml, R&D). Se diluyeron en serie el Mab cCLB8 y un Mab de control de isotipo negativo (cSF25) y a continuación se preincubaron con la mezcla anteriormente indicada durante 30 minutos más.

Para los resultados experimentales mostrados en la figura 5, se preincubaron diluciones en serie de cCLB8 o cSF25 (un Mab irrelevante emparejado por isotipo) con IL-6SR e IL-1β y a continuación se cultivaron con células HepG2 durante 24 horas. A continuación se analizó el sobrenadante celular para determinar los niveles de producción de amiloide A sérico mediante ELISA (kit Human SAA ELISA, Biosource, realizado según las instrucciones del fabricante). Las barras de error indican el EEM de las muestras duplicadas. Los datos de la figura 5 indican que cCLB8 era capaz de inhibir la producción de SAA inducida por IL-1β/IL-6 de células HepG2 de una forma dependiente de la dosis.

Inhibición por Mab cCLB8 de la proliferación celular inducida por IL-6

Se induce la proliferación de la línea celular de mieloma B murino, 7TD1 en presencia de IL-6. Para demostrar la capacidad del Mab cCLB8 para neutralizar la actividad de IL-6, se incubaron las células a 37°C durante 72 horas en IMDM que contenía FBS al 10% y 0,5 ng/ml de IL-6 humana recombinante (R&D Systems), y con diluciones en serie de Mab cCLB8 o un Mab de control negativo 17-1A. Se midió la proliferación celular mediante un ensayo de luminiscencia de ATP (ATPLite, Packard Bioscience) que se correlaciona directamente con el número de células.

Los datos mostrados en la figura 6 demuestran que la IL-6 estimula espectacularmente la proliferación de las células 7TD1 y cCLB8 inhibe esta proliferación celular de una forma dependiente de la concentración con una CE_{50} de 7,2 ng/ml. Las barras de error indican el EEM de las muestras duplicadas. El símbolo * representa la proliferación de las células en ausencia de rIL-6.

EJEMPLO 5: MAPEO DE EPÍTOPOS

Se han caracterizado los epítopos de varios mAb anti-IL-6 neutralizantes, incluido CLB8, utilizando la unión de anticuerpos a proteína mutantes IL-6 humanas como se describe en (Brakenhoff, J. *et al*. (1990) J. Immunology 145:561-568). Se prepararon mutantes con deleción amino-terminal y carboxilo-terminal y se analizó el panel de anticuerpos contra IL-6 mediante experimentos de competición de anticuerpos. En base a los estudios de competición, se dividieron los Mab neutralizantes en 2 grupos (I y II). En este método, los restos incluidos en el epítopo de un determinado Mab se definen por su incapacidad para reconocer las correspondientes variantes por sustitución de aminoácidos individuales específicas de sitio de la proteína antigénica. CLB.IL-6/8 se mapeó al sitio I en la molécula IL-6 humana que está compuesta por aminoácidos Gln29-Leu34 muy cerca del extremo carboxilo terminal de la molécula. Estudios adicionales (Kalai, M, *et al*., Eur. J. Biochem. 249, 690-700 (1997)) demostraron que CLB.IL-6/8 reconocía restos de aminoácidos cruciales para la unión de IL-6 a IL-6R (gp80). Estos estudios también indicaban que su epítopo cubre los extremos del bucle AB y de las regiones de hélice D de la molécula de IL-6.

EJEMPLO 6: CARACTERIZACIÓN *IN VIVO*

El tratamiento con los Mab anti-IL-6 humana (cCLB8) y anti-IL-6 de ratón retrasa la caquexia por cáncer

Se inocularon células de melanoma humano (A375S2) en ratones desnudos hembra y se inició el tratamiento con Mab el mismo día. Se inyectaron los anticuerpos por vía intraperitoneal a una dosis de 10 mg/kg (2 veces por semana) y se utilizó C57 (anti-CMV) como mAb de control. Se utilizó la combinación de cCLB8 (anti-IL-6 humana) y MP520F3 (Mab contra IL-6 de ratón, R&D Systems) para crear un bloqueo combinado que inhibía significativamente la pérdida de peso de los animales portadores de tumores de melanoma humano en comparación con los animales tratados con el anticuerpo de control C57 (Figura 7). El tratamiento con anticuerpos no tuvo efecto sobre el crecimiento del tumor o el peso final del tumor. Estos hallazgos indican que la IL-6 participa en la pérdida de peso del animal inducida por el tumor, y el bloqueo de la IL-6 puede retrasar la caquexia por cáncer en este modelo.

Figura 7. El bloqueo combinado de IL-6 humana y de ratón (mAb anti-IL6 cCLB8 y mAb anti-IL6 MP520F3) da como resultado una inhibición significativa de la pérdida de peso del animal. La pérdida de peso del animal corregida en el eje Y es (peso del animal-peso del tumor al final del estudio) menos el peso del animal al inicio del estudio. Cada barra es la media de los datos de al menos 14 animales/grupo y las barras de error indican la desviación estándar. Un análisis de la prueba de la t de dos colas indicó que el grupo de anti-IL-6 inhibía significativamente la pérdida de peso corporal con p = 0,007.

EJEMPLO 7: MEDICIONES DE AFINIDAD

Se obtuvieron de BIAcore, un BIAcore 2000, un chip sensor CM-5 (superficie de oro en el chip cubierto con una matriz de dextrano carboximetilado), HBS (HEPES 10 mM con NaCl 0,15 M, 3,4 EDTA mM, y tensioactivo P20 al 0,05% a pH 7,4), reactivos de acoplamiento de amina (N-hidroxisuccinamida (NHS), N-etil-N'-(3-metilaminopropil)-carbodiimida (EDC) y HCl de etanolamina 1M) y se prepararon según las instrucciones del fabricante. El anticuerpo anti-Fc humano (cabra anti-IgG humana Jackson AffiniPure, Fc, Cat # 109-005-098, Lote# 48646,) se adquirió de Jackson ImmunoResearch.

El anticuerpo monoclonal IgG CLB8 híbrido (Lote # PD1F03) en 5 ml de cloruro de sodio 0,15 M, fosfato de sodio 0,01 M, pH 7,2, estaba fabricado por Centocor. La IL-6 humana recombinante (Lote # A1197111) se adquirió de R&D Systems.

Se diluyó un anticuerpo anti-Fc humano (1,8 mg/ml) a una concentración de 50 µg/ml en tampón de NaOAc (10 mM, pH 4,8) y se acopló a la matriz de dextrano carboximetilado de un chip sensor CM-5 utilizando la química de acoplamiento de amina del fabricante, como se describe en el manual de los sistemas BIAcore. Utilizando el asistente de preparación de la superficie para alcanzar 10.000 RU, los grupos carboxilo en las superficies del sensor se activaron primero con NHS/EDC, seguido de la adición del anticuerpo anti-Fc humano. Se bloquearon los grupos activados restantes inyectando etanolamina 1M. Se acopló individualmente cada una de las células de flujo. Empleando estas condiciones, se prepararon las superficies de las cuatro células de flujo que contenían 7.554-9.571 unidades de resonancia (RU) de anticuerpo anti-Fc humano. En los experimentos preliminares, se determinó que tres inyecciones (15 ul a 30 µl/min) de H_3PO_4 100 mM/CHAPS al 0,05% eliminaban de manera eficaz la inmunoglobulina unida y conservaban la capacidad de unión del anticuerpo anti-Fc humano inmovilizado.

Se realizaron dos experimentos en el BIAcore 2000 a 25ºC y a un caudal de 30 µl/minuto. Se disolvió el cCLB8 en HBS a 5 ug/ml. Se disolvió el analito, IL-6, en HBS a 0,25 µg/ml, 0,125 µg/ml, 0,062 µg/ml, 0,031 µg/ml y 0,015 µg/ml. Se hizo fluir una cantidad establecida de anticuerpo a lo largo de su respectiva célula de flujo seguido de inyecciones de 30 µl de cada concentración de IL-6 a 30 µl/min (fase de asociación) y un flujo de tampón durante 800 segundos sin interrupción (fase de disociación). Se regeneró la superficie del chip mediante tres inyecciones secuenciales de 15 µl cada una con H_3PO_4 100 mM/CHAPS al 0,05%. Las inyecciones de HBS sirven de referencia (sensograma en blanco) para la sustracción de los índices de refracción en bruto para su análisis. Utilizando el modelo 1:1 en el BIAanalysis 3,0, se realizó un ajuste local para la disociación (k_d, [s-1] y para la asociación (k_a, [M-1s-1]) y se calculó (k_d/k_a) la constante de disociación (K_D, [M]).

El análisis se realizó utilizando BIAevaluation versión 3.0. Las constantes cinéticas se derivaron de los datos del sensograma ajustando las curvas experimentales a las ecuaciones de velocidad derivadas de los modelos del mecanismo de interacción. Un análisis global utilizando un modelo de unión 1:1 con ajuste local de RUmax, se determinaron la k_a, k_d, K_D (Tabla 1).

Tabla 1: Mediciones de afinidad para el Mab cCLB8 mediante Biacore

Muestra	k_a ($m^{-1}s^{-1}$)(x10^6)	k_d (s^{-1}) (x10^{-5})	K_D(M) (x10^{-11})	Chi^2
cCLB8	1,1	6,2	5,7	0,111
cCLB8	0,37	5,2	14	0,236

EJEMPLO 8: ANTICUERPOS ANTI-IDIOTIPO

El desarrollo de sistemas de ensayo eficaces (inmunohistoquímica y detección en suero) para cCLB8 requiere el uso de anticuerpos antiidiotípicos. Por lo tanto, se inmunizan ratones Balb/c con cCLB8 para generar anticuerpos antiidiotípicos contra cCLB8 que pueden utilizarse como sondas farmacocinéticos en ensayos inmunohistoquímicos y de detección en suero.

Inmunización

Se inmunizaron cinco ratones Balb/c (Charles River Laboratories) de 6-7 semanas de edad durante un periodo de 12 semanas con cCLB8 (Centocor, PD1F03) proporcionado a 50 µg IP y 25 µg SC. Cada ratón recibió inyecciones IP y SC. Las inyecciones se dieron a intervalos de 2 semanas durante todo el régimen de inmunización. Se emulsión el material de inyección administrado IP con un volumen igual de adyuvante de Freund (Sigma). La primera inyección IP utilizó adyuvante completo de Freund en un volumen total de 200 µl. Las inyecciones IP posteriores contenían adyuvante incompleto de Freund. El material de inyección administrado SC se diluyó en PBS y se dividió entre dos sitios de inyección a 100 µl/sitio. Se sangraron los ratones los días 0, 21, 47 y 77. Se recogió sangre de los ratones anestesiados mediante punción retroorbital, y se recogió el suero para la determinación de títulos mediante EIA en fase sólida para cCLB8. Tres semanas después del final del protocolo de inmunización, el Ratón #1 recibió una inyección final IV de refuerzo de 100 µg de cCLB8 diluido en 125 µl de PBS.

Generación de anticuerpos monoclonales antiidiotípicos cCLB8 de ratón

Una fusión utilizando un bazo de ratón Balb/c inmunizado con cCLB8 dio como resultado la identificación de 7 anticuerpos anti-id específicos para cCLB8 mediante EIA. Se demostró que los 7 anticuerpos anti-id no se unían a otros anticuerpos híbridos ratón/humano tales como C207A, C128A, C168J, C116J, C300A y C301A. Seis de los siete anticuerpos eran del isotipo IgG1κ y un anticuerpo era IgG2bκ. La Tabla 1 resume los resultados de la fusión. Cabe señalar que se alcanzó un título máximo en suero de 1:800 en el ratón después de 47 días y se mantuvo

constante durante el tiempo que duró la inmunización.

Determinación del isotipo

Se logró la determinación del isotipo de los anticuerpos mediante el kit Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit (Life Technologies) en formato de tira reactiva. Se incubó una mezcla de tampón de dilución, sobrenadante de hibridoma y conjugado de rata anti-ratón durante toda la noche a RT con agitación en tubos que contenían tiras recubiertas previamente con diversos isotipos de anticuerpo murino de captura. Se retiraron las tiras de los tubos, se aclararon suavemente en dH_2O y se determinaron los isotipos.

Tabla 1. Propiedades de los anticuerpos monoclonales antiidiotípicos para cCLB8 de ratón

Código C	**Isotipo**
C433A	IgG1κ
C434A	IgG1κ
C435A	IgG1κ
C436A	IgG2bκ
C437A	IgG1κ
C438A	IgG1κ
C439A	IgG1κ

Ensayos de inhibición sérica

Se determinó el efecto del suero humano normal combinado (NHS) sobre la capacidad de los 7 anticuerpos anti-id para unirse a cCLB8. Se incubaron las diluciones dobles en serie de los Mab anti-Id partiendo de 50 µg/ml en presencia de NHS al 0%, 0,5%, 5% y 50% durante 30 minutos a 37°C. Se transfirieron las mezclas a placas recubiertas con cCLB8 y se incubaron durante 30 minutos a 37°C. A continuación, se lavaron las placas, se hibridaron con anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón Fc*HRP. A ninguno de los Mab anti-Id se le impidió la unión a cCLB8 mediante NHS al 0% y al 0,5%. Tres Mab (C433A, C435A y C437A) presentaron inhibición parcial de la unión por NHS al 5%. Todos excepto C434A y C436A se vieron influidos significativamente por una concentración de NHS del 50% (Figuras 8 A-G).

Inhibición de la unión de cCLB8 a HuIL-6 por los Mab anti-id

Se evaluó la capacidad de los 7 anticuerpos anti-Id para inhibir la unión de cCLB8 a HuIL-6. Estudios de EIA anteriores demostraron que cCLB8 se une muy débilmente a placas recubiertas con HuIL-6. Dos Mab (C435A y C437A) a concentraciones 6-25 veces superiores demostraron una inhibición prácticamente completa de la unión de cCLB8 a HuIL-6. C434A expresaba un efecto inhibidor para cCLB8 solamente a una cantidad 25 veces superior. Los dos anticuerpos que mejor inhibían la unión de cCLB8 a HuIL-6 fueron C436A y C439A. Estos dos anticuerpos fueron capaces de inhibir completamente la unión de cCLB8 en un intervalo de concentraciones 3 a 25 veces superior. C433A y C438A no presentaron actividad inhibidora (Figura 9). Este ensayo confirmó los resultados obtenidos en un estudio preliminar.

Unión de anticuerpos anti-id a cCLB8 previamente unido a HuIL-6

Se examinó la capacidad de los 7 anticuerpos anti-id para unirse a cCLB8 que estaba previamente unido a HuIL-6. Se incubó cCLB8 a 10 µg/ml en placas con HuIL-6 durante 30 minutos a 37°C. Se lavaron las placas y a continuación se incubaron con diluciones triples en serie de los mAb anti-id partiendo de 10 µg/ml durante 30 minutos a 37°C. Se lavaron las placas y a continuación se hibridaron con anticuerpo de cabra anti-Ig de ratón Fc*HRP. Al igual que en los estudios preliminares, C436A y C438A fueron los únicos anticuerpos capaces de unirse cCLB8 que estaba previamente unido a HuIL-6. La figura 10 ilustra las capacidades de unión de los 7 anticuerpos anti-id para cCLB8 que estaba previamente unido a HuIL-6.

En resumen, se produjeron siete anticuerpos antiidiotípicos monoclonales a partir de la fusión de células de mieloma murino y células de bazo de un ratón Balb/c inmunizado con anticuerpo híbrido anti-IL-6 humana (cCLB8). Cinco de los anticuerpos anti-id (C434A, C435A, C436A, C437A y C439A) eran capaces de bloquear la unión de cCLB8 HuIL-6. Dos anticuerpos (C436A y C438A) poseían la capacidad de unirse a cCLB8 que estaba previamente unido a HuIL-6 y dos anticuerpos (C434A y C436A) no se vieron prácticamente influidos en su unión a cCLB8 por ninguna concentración de NHS ensayada. Los amplios perfiles de unión de estos anticuerpos antiidiotípicos cCLB8 hacen de algunos de ellos posibles candidatos para su uso como sondas farmacocinéticas en los ensayos inmunohistoquímicos y de detección en suero.

Resultará evidente que la invención puede ponerse en práctica de un modo diferente al descrito particularmente en la descripción y los ejemplos anteriores.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Centocor Inc.

<120> Anticuerpos Anti-IL-6, Composiciones, Métodos y usos

<130> P055093EP

<140> EP
<141> 2002-10-26

<150> US 60/332743
<151> 2001-11-14

<160> 16

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 1

```
Ser Ser Phe Ala Met Ser
1               5
```

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 2

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

Gly
```

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 3

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

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Tyr
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 5

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 7
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

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

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Gly Leu Trp Gly Tyr Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 106

<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 9
<211> 18
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 9
agtagctttg ccatgtct 18

<210> 10
<211> 51
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 10
gaaattagta gtggtgggag ttacacctac tatcctgaca ctgtgacggg c 51

<210> 11
<211> 30
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 11
ggtttatggg ggtactatgc tcttgactac 30

<210> 12
<211> 30
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 12
agtgccagct caagtgtaag ttacatgtac 30

<210> 13
<211> 21
<212> ADN

<213> Mus musculus

<400> 13
gacacatcca acctggcttc t 21

<210> 14
<211> 27
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 14
cagcagtgga gtggttaccc atacacg 27

<210> 15
<211> 357
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 15

```
gaggtgcaac tggtggaatc tggaggaaaa ttactgaagc ctggagggtc cctgaaactc     60
tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt agctttgcca tgtcttggtt tcgccagtct    120
ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcagaa attagtagtg gtgggagtta cacctactat    180
cctgacactg tgacgggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac    240
ctggaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt attattgtgc aaggggttta    300
tgggggtact atgctcttga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctca       357
```

<210> 16
<211> 318
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 16

```
caaattgttc tcatacagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc     60
atgacctgca gtgccagctc aagtgtaagt tacatgtact ggtaccagca gaagccagga    120
tcctccccca gactcctgat ttatgacaca tccaacctgg cttctggagt ccctgttcgc    180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacaa tcagccgaat ggaggctgag    240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtggttacc catacacgtt cggagggggg    300
accaagctgg aaataaaa                                                  318
```

Reivindicaciones

1. Un anticuerpo híbrido, humanizado o CDR injertado o fragmento de anticuerpo capaz de inhibir la IL-6 humana que comprende regiones determinantes complementarias (CDR) de las SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 derivado de un anticuerpo anti-IL-6 monoclonal murino CLB-8 y una región constante derivada de uno o más anticuerpos humanos, en donde dicho anticuerpo híbrido, humanizado o CDR injertado o fragmento de anticuerpo se une a IL-6 con una afinidad (Kd) de al menos 10^{-9} M.

2. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 1 que neutraliza al menos una actividad de IL-6, como al menos una actividad seleccionada del grupo consistente de inhibición de secreción de IgM mu de células SKW6.4, inhibición de IL-6 mediada por la producción de MCP-1, inhibición de señalización de IL-6 en células de leucemia monocíticas humanas THP-1, inhibición de producción de suero amiloide A inducido por IL-6 de células HepG2, e inhibición de proliferación celular inducida por rhIL-6.

3. Un anticuerpo híbrido, humanizado o CDR injertado anti-IL-6 aislado o porción específica o variante, que comprende una región murina variable y constante humana, en donde dicho anticuerpo o porción específica o variante se une específicamente a al menos un epítopo que comprende al menos 3 de los aminoácidos Gln29-Leu34 de IL-6 humana, en donde dicho anticuerpo o porción específica o variante se une a IL-6 con una afinidad de al menos 10^{-9} M.

4. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de la reivindicación 3 que neutraliza al menos una actividad de IL-6, como al menos una actividad seleccionada del grupo consistente de inhibición de secreción de IFN-gamma inducida por IL-6, inhibición de citotoxicidad de células LAK, inhibición de transcripción de ARN, gamma IFN, inhibición de células IFN gamma CD3+ intracelular, y expresión de CD95.

5. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que se une a IL-6 con una afinidad (Kd) de al menos 10^{-10} M o al menos 10^{-11} M.

6. Una molécula de ácido nucleico aislado que comprende un polinucleótido que codifica el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

7. Un vector, que comprende un ácido nucleico de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho vector opcionalmente:

(i) comprende al menos un promotor seleccionado del grupo consistente de un promotor de SV490 tardío o temprano, un promotor de CMV, un promotor de HSV tk, un promotor de pgk (fosfoglicerato quinasa), un promotor de inmunoglobulina humana o un promotor de EF-1 alfa; o
(ii) comprende al menos un gen de selección o porción del mismo seleccionado de al menos uno de metotrexato (MTX), proteína fluorescente verde (GFP), dihidrofolato reductasa (DHFR), neomicina (G418) o glutamina sintetasa (GS).

8. Una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico aislado de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicha célula hospedadora es una célula COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, de mieloma o de linfoma, o cualquier célula derivada, inmortalizada o transformada de las mismas.

9. Un método para producir al menos un anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante, que comprende traducir un ácido nucleico según la reivindicación 6, en condiciones in vitro, in vivo o in situ, de manera que el anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante se exprese en cantidades detectables o recuperables, en donde dicho método comprende opcionalmente mezclar el al menos un anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante en al menos un tampón que contiene solución salina o una sal.

10. Una composición de anticuerpo anti-IL-6 o composición de porción específica o variante, que comprende un anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y un vehículo o diluyente, en donde dicha composición de anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante comprende opcionalmente al menos un compuesto o proteína seleccionado de al menos uno de un antagonista de TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (SNAP), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriásico, un corticosteroide, un esteroide anabólico, un mineral, una sustancia nutricional, una vitamina, una hormona relacionada con el calcio, un antidiarreico, un antitusivo, un antiemético, un antiulceroso, un laxante, un anticoagulante, una epoetina, un filgrastim, un sargramostim, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de sustitución hormonal, un modulador del receptor de estrógenos, un midriático, un ciclopléjico, un agente alquilante, un antimetabolito, un antimitótico, un radiofármaco, un antidepresivo, un antimaníaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpaticomimético, donepezilo, tacrina, un medicamento para el asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrienos, una metilxantina, una cromolina, una epinefrina, dornasa alfa y una citocina.

11. Un anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en terapia de una célula, tejido, órgano o animal.

12. El anticuerpo anti-IL-6 de la reivindicación 11, en donde:

(i) dicho animal es un primate, un mono o un humano;
(ii) dicho anticuerpo es adecuado para el contacto o administración a 0,001-50 mg/kilogramo de dichas células, tejido, órgano o animal;
(iii) dicho anticuerpo es adecuado para el contacto o administración a 0,0001-50 mg/kilogramo de dichas células, tejido, órgano o animal;
(iv) dicho anticuerpo es adecuado para el contacto o administración a 0,01-50 mg/kilogramo de dichas células, tejido, órgano o animal;
(v) dicho anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante es adecuado para el contacto o administración por al menos un modo seleccionado de intravenoso, intramuscular, bolo, subcutáneo, respiratorio, inhalación, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmico; o
(vi) dicho uso comprende además el uso de, antes, concurrentemente o después de dicho anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante, al menos una composición que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de al menos un compuesto o proteína seleccionado de al menos uno de un antagonista de TNF, un antirreumático, un relajante muscular, un narcótico, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (SNAP), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano, un antipsoriásico, un corticosteroide, un esteroide anabólico, un mineral, una sustancia nutricional, una vitamina, una hormona relacionada con el calcio, un antidiarreico, un antitusivo, un antiemético, un antiulceroso, un laxante, un anticoagulante, una epoetina, un filgrastim, un sargramostim, una inmunoglobulina, un inmunosupresor, una hormona de crecimiento, un fármaco de sustitución hormonal, un modulador del receptor de estrógenos, un midriático, un ciclopléjico, un agente alquilante, un antimetabolito, un antimitótico, un radiofármaco, un antidepresivo, un antimaníaco, un antipsicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpaticomimético, donepezilo, tacrina, un medicamento para el asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrienos, una metilxantina, una cromolina, una epinefrina, dornasa alfa y una citocina.

13. Un dispositivo médico, que comprende al menos un anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde dicho dispositivo es adecuado para poner en contacto o administrar dicho al menos un anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante por al menos un modo seleccionado de intravenoso, intramuscular, bolo, subcutáneo, respiratorio, inhalación, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal o transdérmico.

14. Una formulación que comprende al menos un anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, y al menos uno seleccionado de agua estéril, agua tamponada estéril, o al menos un conservante seleccionado del grupo consistente de fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, nitrito fenilmercúrico, fenoxietanol, formaldehído, clorobutanol, cloruro de magnesio, alquilparabeno, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos, en un diluyente acuoso, en donde opcionalmente:

(i) la concentración del anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante es de alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 100 mg/ml;
(ii) la formulación comprende además un agente de isotonicidad;
(iii) la formulación comprende además un tampón fisiológicamente aceptable;
(iv) el anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante está en una forma liofilizada; o
(v) el anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante está en un primer contenedor, y un segundo contenedor opcional comprende agua estéril, agua tamponada estéril, o al menos un conservante seleccionado del grupo consistente de fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencílico, nitrito fenilmercúrico, fenoxietanol, formaldehído, clorobutanol, cloruro de magnesio, alquilparabeno, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, deshidroacetato de sodio y timerosal, o mezclas de los mismos, en un diluyente acuoso, en donde opcionalmente: (a) la concentración del anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante se reconstituye a una concentración de alrededor de 0,1 mg/ml a alrededor de 500 mg/ml; (b) la formulación comprende además un agente de isotonicidad; o (c) la formulación comprende además un tampón fisiológicamente aceptable.

15. Un artículo de fabricación para uso farmacéutico humano, que comprende material de envase y un contenedor que comprende una solución o una forma liofilizada de al menos un anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde opcionalmente:

(i) dicho contenedor es un contenedor de vidrio o plástico que tiene un tope para la administración multi-uso;
(ii) dicho contenedor es un envase blíster, capaz de ser perforado y usado por vía intravenosa, intramuscular, bolo, intraperitoneal, subcutánea, respiratoria, inhalación, nasal, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal,

subdérmica o transdérmica;
(iii) dicho contenedor es un componente de un dispositivo o sistema intravenoso, intramuscular, bolo, intraperitoneal, subcutáneo, respiratorio, inhalación, nasal, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, subdérmico o transdérmico; o
(iv) dicho contenedor es un componente de un inyector o dispositivo inyector de pluma o sistema para intravenoso, intramuscular, bolo, intraperitoneal, subcutáneo, respiratorio, inhalación, nasal, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal, subdérmico o transdérmico.

16. Un método para producir al menos un anticuerpo anti-IL-6 o porción específica o variante de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende proporcionar una célula hospedadora o animal transgénico o planta transgénica o célula vegetal capaz de expresar en cantidades recuperables dicho anticuerpo o porción específica o variante, en donde:

(i) dicha célula hospedadora es una célula mamífera, una célula vegetal o una célula de levadura; o
(ii) dicho animal transgénico es un mamífero como una cabra, una vaca, una oveja, un caballo, y un primate no humano.

17. Un animal o planta transgénico no humano que expresa al menos un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

FIGURA 1.

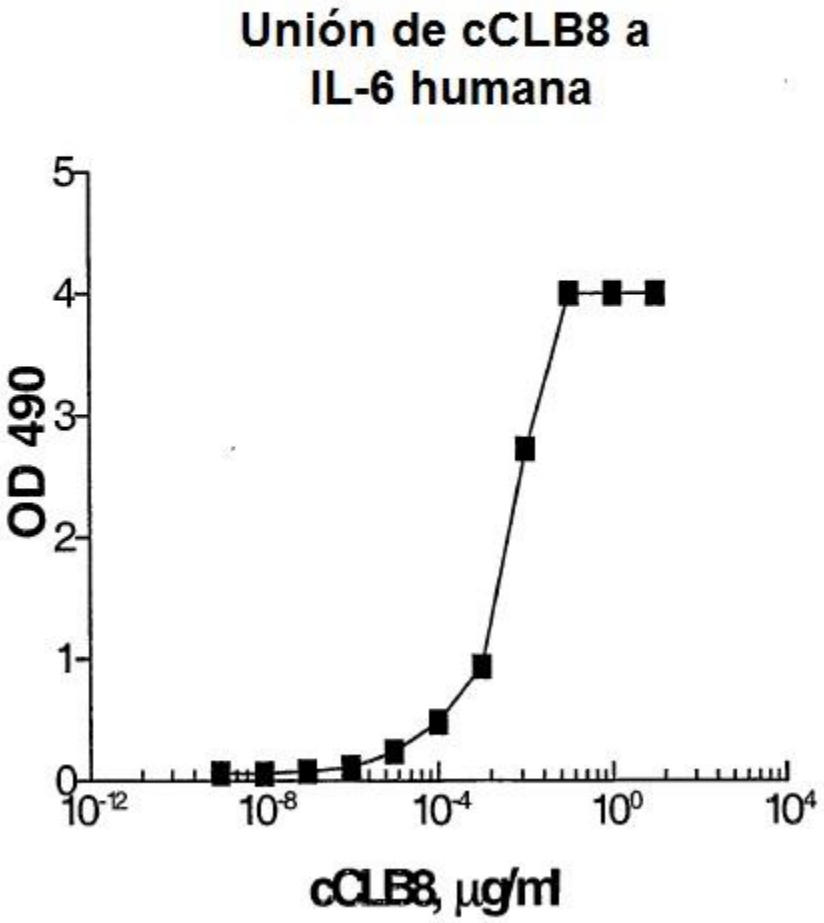

Unión de cCLB8 a
IL-6 humana
OD 490
5
4
3
2
1
0
10-12
10-8
10-4
100
104
cCLB8, µg/ml

FIGURA 2.

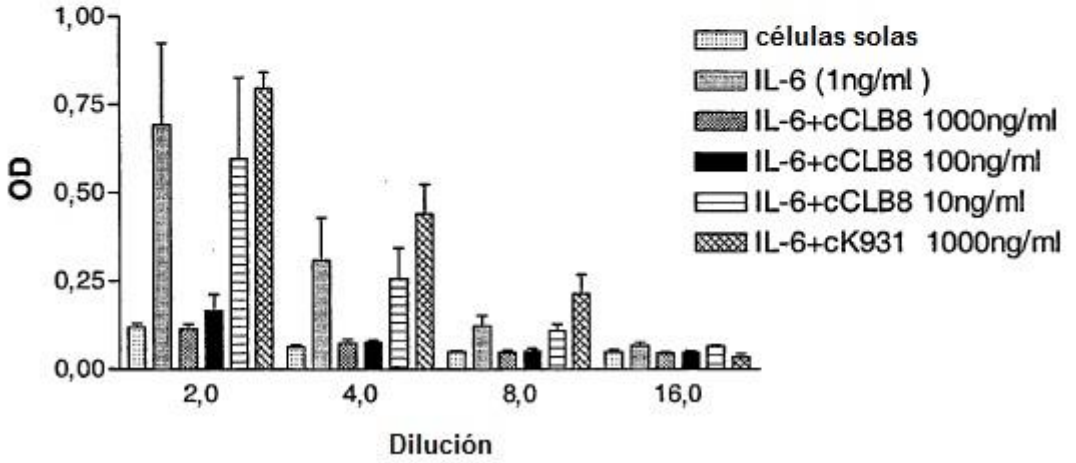

1,00
0,75
0,50
0,25
0,00
OD
2,0
4,0
8,0
16,0
Dilución
células solas
IL-6 (1ng/ml)
IL-6+cCLB8 1000ng/ml
IL-6+cCLB8 100ng/ml
IL-6+cCLB8 10ng/ml
IL-6+cK931 1000ng/ml

FIGURA 3.

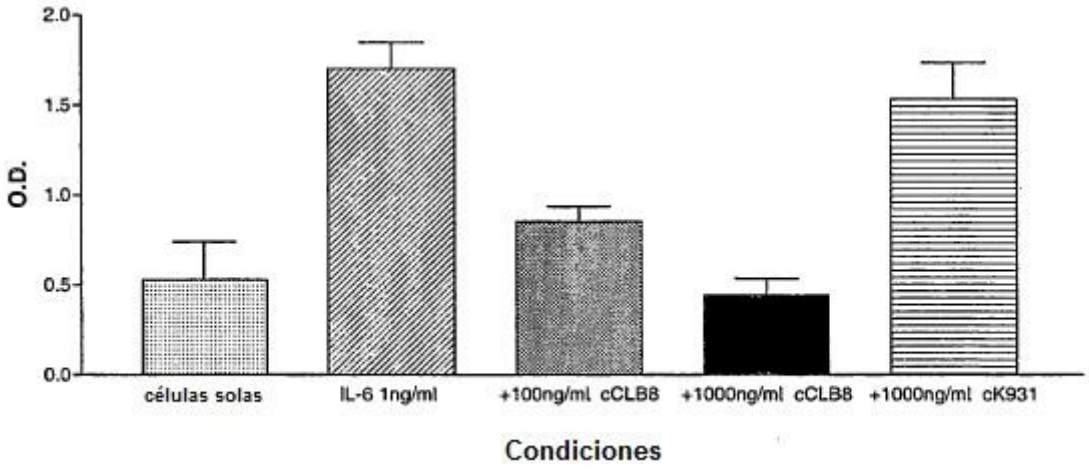

2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
O.D.
células solas
IL-6 1ng/ml
+100ng/ml cCLB8
+1000ng/ml cCLB8
+1000ng/ml cK931
Condiciones

FIGURA 4

cCLB8 INHIBE LA SEÑALIZACIÓN DE IL6 EN THP-1

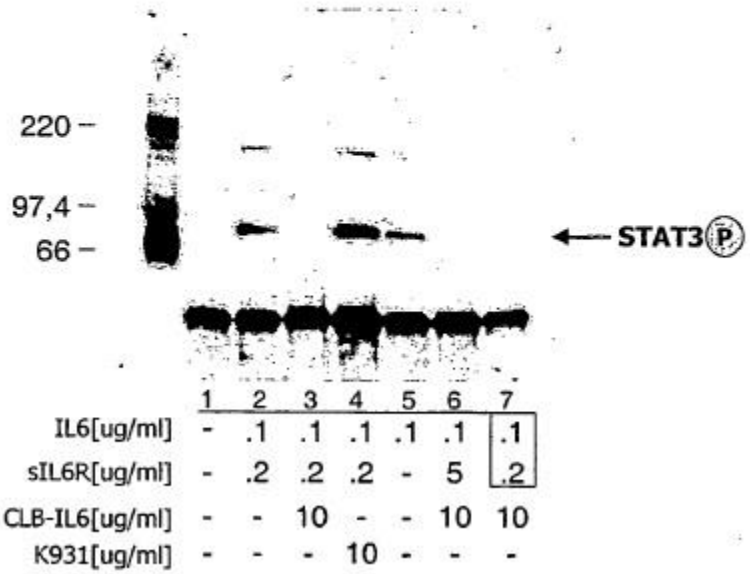
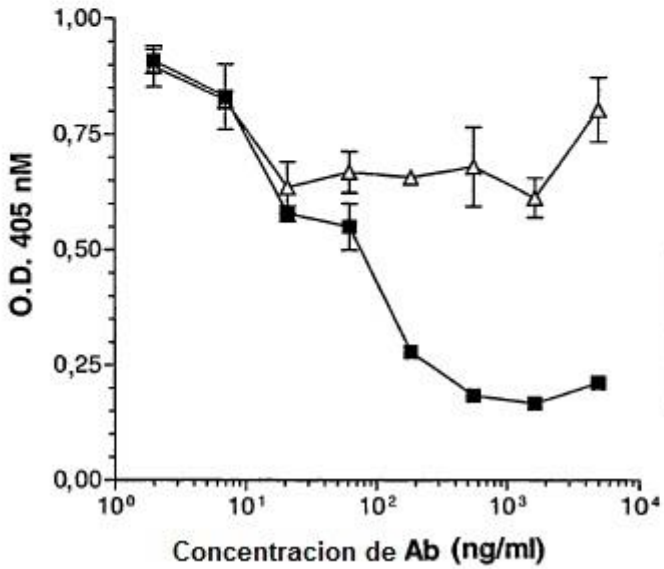


FIGURA 5.



	cCLB8	cSF25
Ecuación 1 Valores de mejor ajuste		
INFERIOR	0.1565	0.6753
SUPERIOR	0.9695	0.8950
LOGEC50	1.537	0.8725
PENDIENTE	-0.8766	-11.32
EC50	34.43	7.456

FIGURA 6.

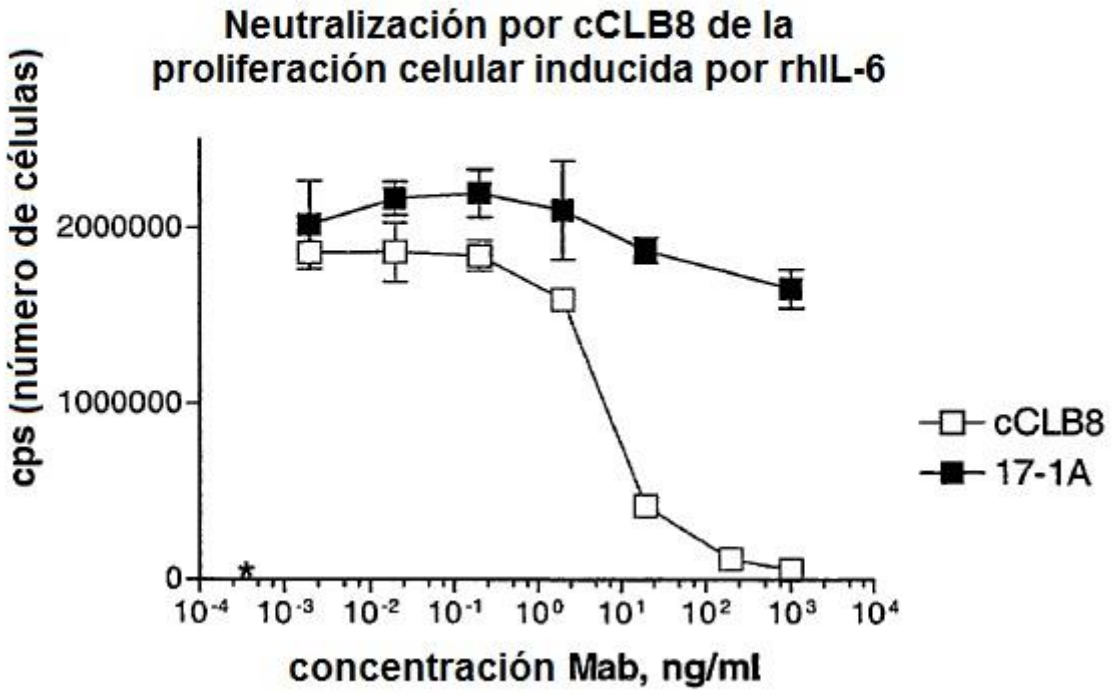

Neutralización por cCLB8 de la
proliferación celular inducida por rhIL-6
cps (número de células)
2000000
1000000
0
*
10⁻⁴ 10⁻³ 10⁻² 10⁻¹ 10⁰ 10¹ 10² 10³ 10⁴
concentración Mab, ng/ml
cCLB8
17-1A

FIGURA 7.

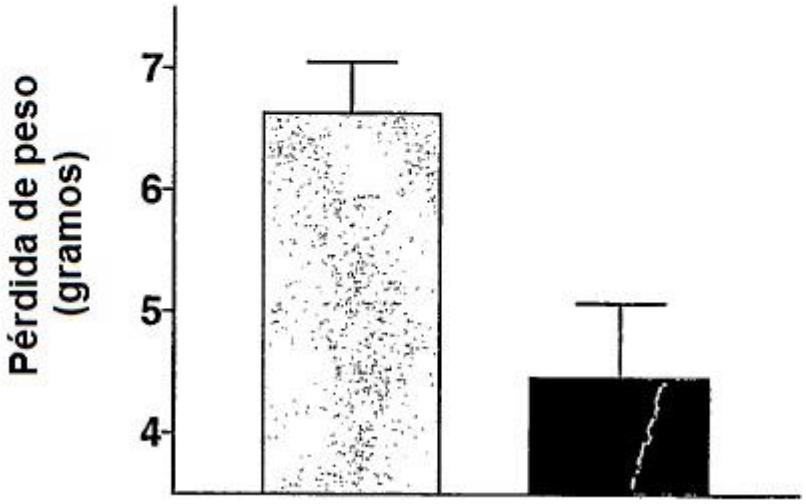
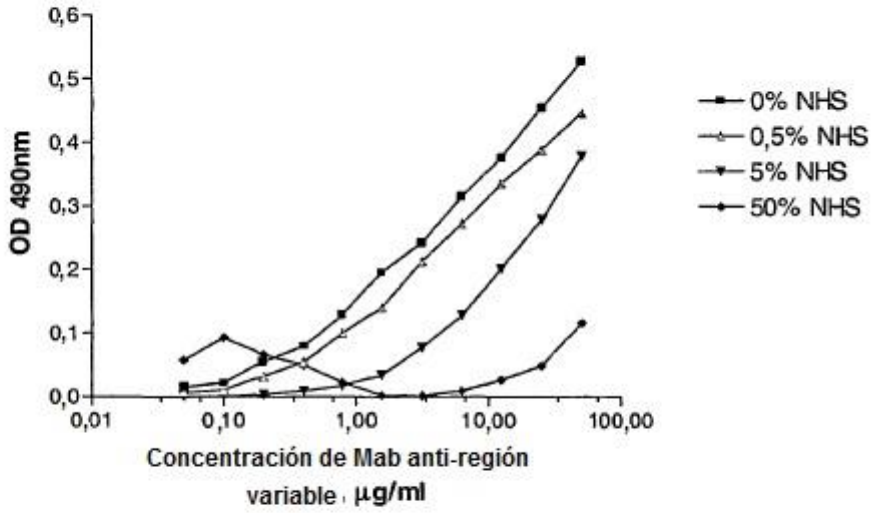
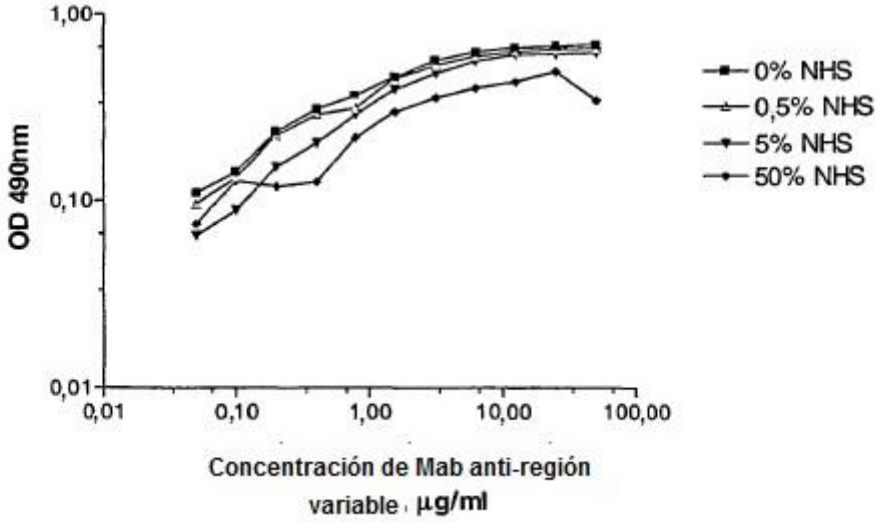


FIGURA 8

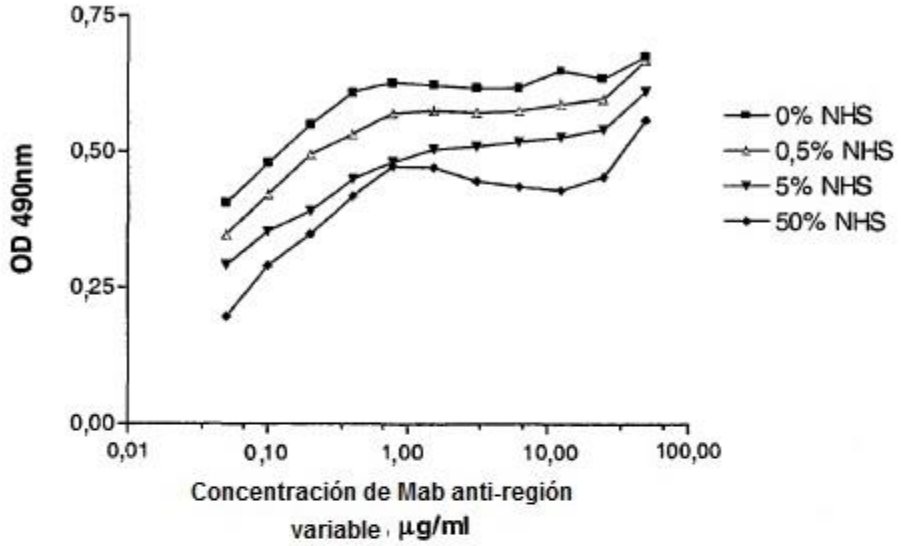
A. C433A



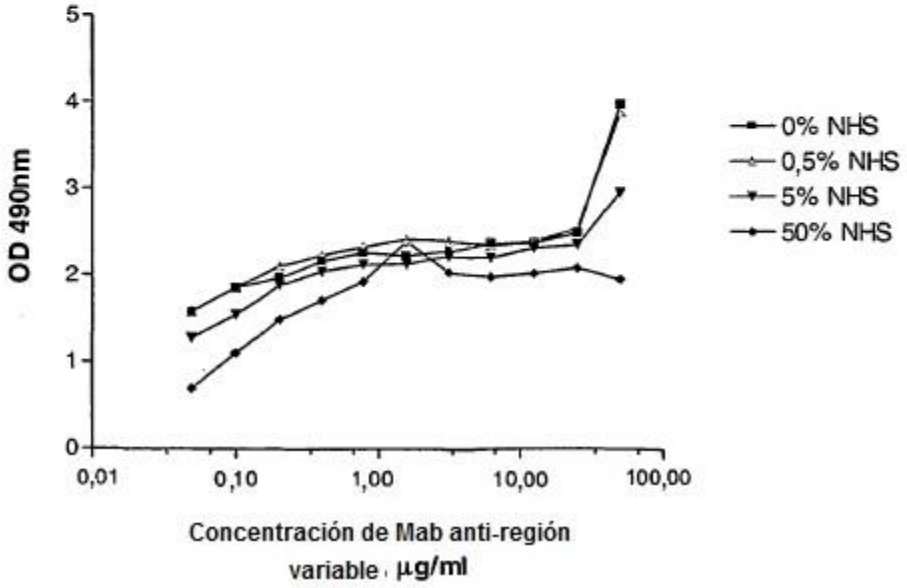
B. C434A



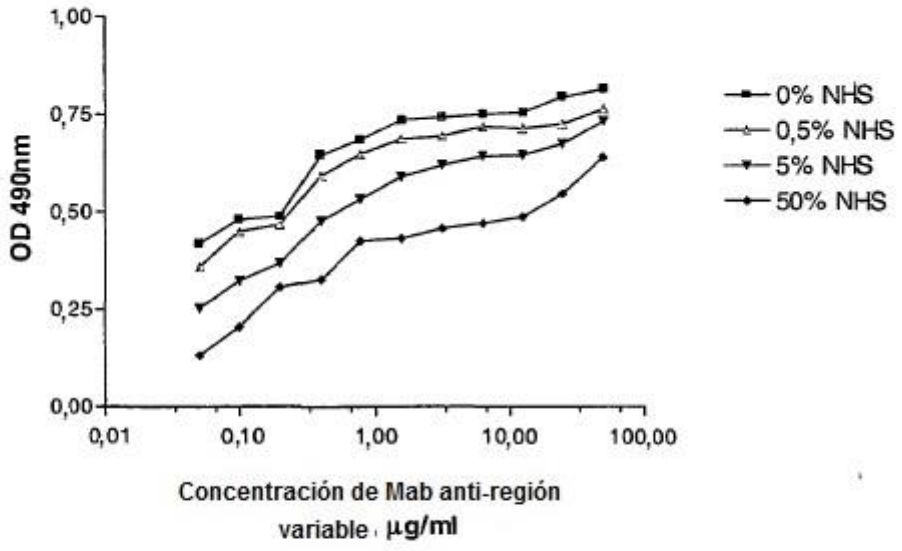
C. C435A



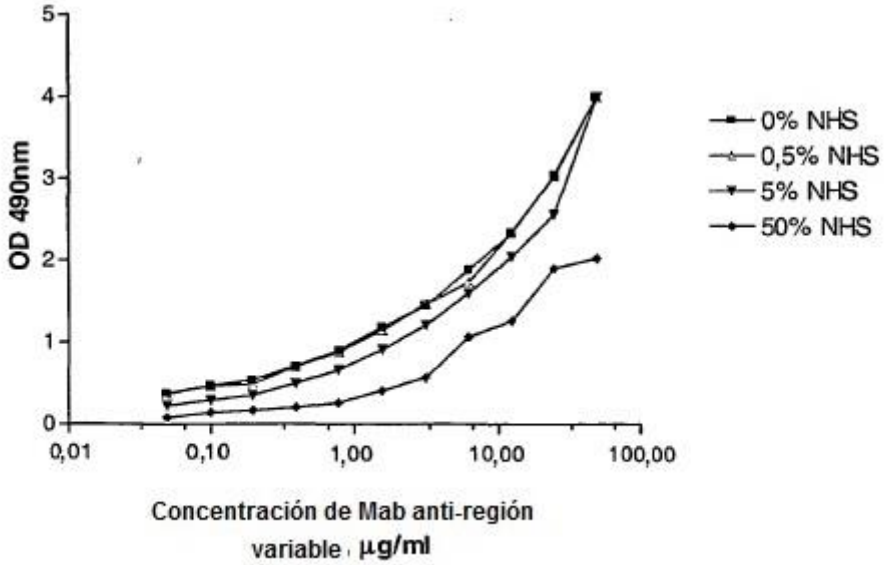
D. C436A



E. C437A



F. C438A



G. C439A

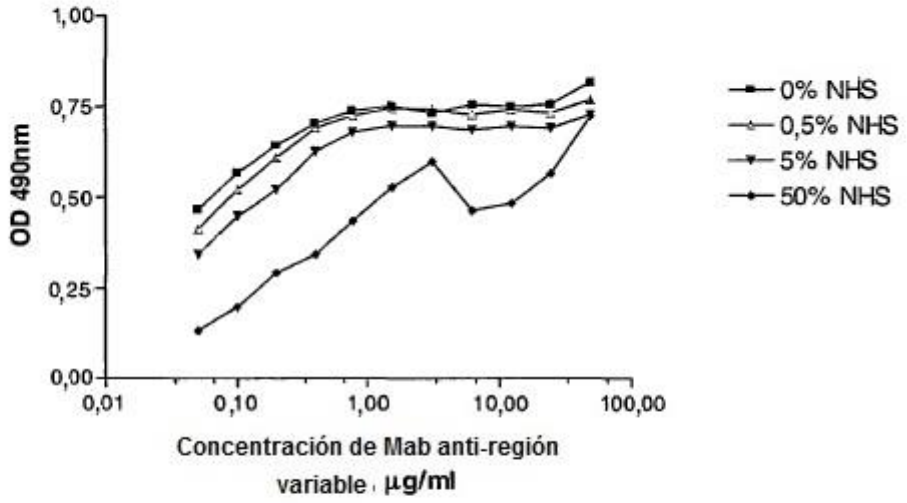


FIGURA 9

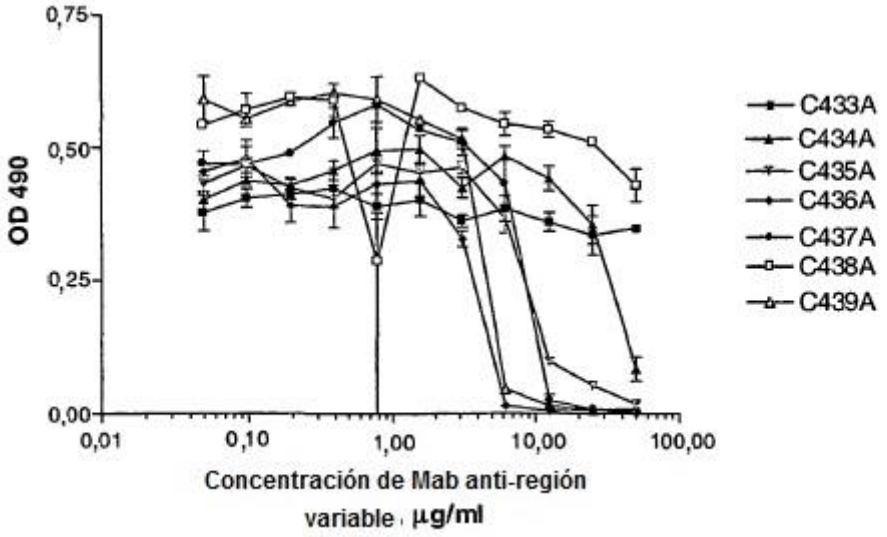
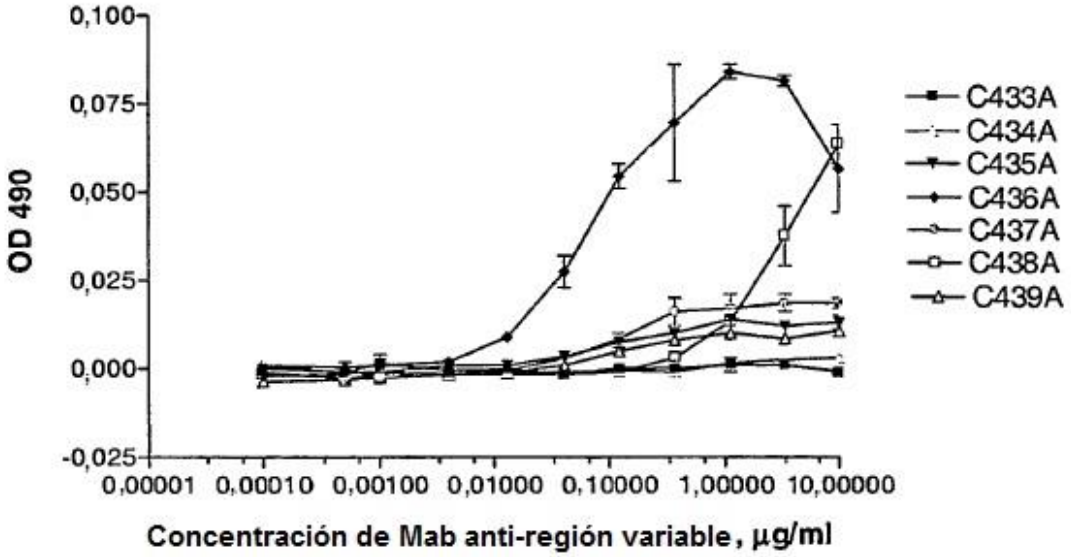


FIGURA 10


0,100
0,075
0,050
0,025
0,000
-0,025
OD 490
0,00001
0,00010
0,00100
0,01000
0,10000
1,00000
10,00000
Concentración de Mab anti-región variable, µg/ml
C433A
C434A
C435A
C436A
C437A
C438A
C439A