

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 020**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.10.2013** E 13189422 (2)

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017** EP 2722341

54 Título: **Anticuerpos contra la interleucina-6 y sus usos**

30 Prioridad:

22.10.2012 US 201261716802 P

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

05.04.2018

73 Titular/es:

**FOUNTAIN BIOPHARMA INC. (100.0%)
19F-1, No. 3 Yuan Qu Street Nangang District
Taipei City 115, TW**

72 Inventor/es:

**LIN, WILLIE;
LEE, TONG-YOUNG;
WU, HAN-CHUNG y
TSAO, TANNY CHEN**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 662 020 T3

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

DESCRIPCIÓN

Anticuerpos contra la interleucina-6 y sus usos

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

5 La interleucina-6 humana (IL6), una glicoproteína secretada que tiene 184 aminoácidos (21 kDa), tiene una estructura en haz de cuatro hélices. La IL6 es una citocina multifuncional que actúa sobre diversos tipos de células, por ejemplo, linfocitos B, linfocitos T, fibroblastos, hepatocitos, osteoclastos, células neurales, células mesangiales, queratinocitos epidérmicos y células progenitoras hematopoyéticas, mediante la unión a dos proteínas receptoras distintas, el receptor de IL6 (IL6R) y la glicoproteína 130 (gp130). La formación del complejo IL6/IL6R/gp130 transduce vías de señalización intracelular, incluyendo las mediadas por los transductores de señales (1) fosfatidil inositol-3'-cinasa (PI3K), (2) proteína cinasa activada por mitógeno (MAK) y (3) tirosina cinasa Janus (JAK) y el activador de la transcripción 1 y 3 (STAT1 y STAT3).

15 La IL6 actúa como un inmunorregulador, factor de crecimiento celular, regulador del metabolismo óseo, factor de diferenciación celular e inductor de proteínas de fase aguda contra varias células efectoras. En el hígado, la IL6 induce diversas proteínas de fase aguda tales como la proteína amiloide A sérica (SAA), la proteína C reactiva (CRP), la hepcidina, el fibrinógeno y la haptoglobina, la antiqumotripsina. La importancia patológica de IL6 para diversas enfermedades se ha indicado en numerosos estudios, incluyendo enfermedades inflamatorias crónicas, enfermedades autoinmunes (por ejemplo, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, enfermedad de Castleman y psoriasis), cáncer (por ejemplo, mieloma múltiple, leucemia, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de próstata y varios tipos de cáncer) y caquexia y enfermedad cardíaca coronaria.

20 Los documentos de solicitud de Patente WO2010/088444, WO2006/119115, WO2004/039826, WO2012/092374, EP 1 536 012, WO2007/066082, WO2008/019061, WO2008/065378, WO2009/155180, WO2010/056948 describen todos ellos anticuerpos anti-IL6 humana.

Por lo tanto, es de gran interés desarrollar nuevos antagonistas de IL6 para uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con la señalización de IL6.

25 COMPENDIO DE LA INVENCION

La presente descripción se basa en la identificación de una serie de anticuerpos anti-IL6 ejemplares, por ejemplo, 1-4-62, Ag1-4-6 (también conocido como FB704) o HA91T-3-10, que inesperadamente mostraban una alta afinidad de la unión y especificidad hacia la IL6 humana y actividades superiores para inhibir la proliferación celular inducida por IL6 (por ejemplo, una proliferación de las células cancerosas) y producción de citocinas (por ejemplo, una producción de citocinas inflamatorias), angiogénesis, caquexia inducida por el cáncer y metástasis del cáncer. Tales anticuerpos también mejoraban significativamente los efectos anticancerígenos de otros agentes quimioterapéuticos tales como oxaliplatino, gemcitabina y docetaxel.

Por consiguiente, un aspecto de la presente descripción se refiere a un anticuerpo aislado que se une a la interleucina 6 humana (IL6), que comprende:

35 (a) una región variable de la cadena pesada (V_H), que comprende una región determinante de complementariedad 1 de la cadena pesada (HC CDR1) de SEQ ID NO: 2, una región determinante de complementariedad 2 de la cadena pesada (HC CDR2) de SEQ ID NO: 4 y una región determinante de complementariedad 3 de la cadena pesada (HC CDR3) de SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 16; o

40 (b) una región variable de la cadena ligera (V_L), que comprende una región determinante de complementariedad 1 de la cadena ligera (LC CDR1) de SEQ ID NO: 9, una región determinante de complementariedad 2 de la cadena ligera (LC CDR2) de SEQ ID NO: 11 y una región determinante de complementariedad 3 de la cadena ligera (LC CDR3) de SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15.

En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado anti-IL6 comprende (i) una V_H que comprende la HC CDR1 de SEQ ID NO: 2, la HC CDR2 de SEQ ID NO: 4 y la HC CDR3 de SEQ ID NO: 6; o (ii) una V_H que comprende la HC CDR1 de SEQ ID NO: 2, la HC CDR2 de SEQ ID NO: 4 y la HC CDR3 de SEQ ID NO: 16. En un ejemplo, el anticuerpo comprende una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18.

En otras realizaciones, el anticuerpo anti-IL6 aislado comprende además (i) una V_L que comprende la LC CDR1 de SEQ ID NO: 9, la LC CDR2 de SEQ ID NO: 11 y la LC CDR3 de SEQ ID NO: 13; o (ii) una V_L que comprende la LC CDR1 de SEQ ID NO: 9, la LC CDR2 de SEQ ID NO: 11 y la LC CDR3 de SEQ ID NO: 15. En un ejemplo, el anticuerpo comprende además una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20.

Ejemplos de los anticuerpos anti-IL6 tal y como se describen en este documento incluyen, pero no se limitan a:

(i) un anticuerpo que comprende una V_H que comprende la HC CDR1 de SEQ ID NO: 2, la HC CDR2 de SEQ

ID NO: 4 y la HC CDR3 de SEQ ID NO: 6; y una V_L que comprende la LC CDR1 de SEQ ID NO: 9, la LC CDR2 de SEQ ID NO: 11 y la LC CDR3 de SEQ ID NO: 13;

5 (ii) un anticuerpo que comprende una V_H que comprende la HC CDR1 de SEQ ID NO: 2, la HC CDR2 de SEQ ID NO: 4 y la HC CDR3 de SEQ ID NO: 16 y una V_L que comprende la LC CDR1 de SEQ ID NO: 9, la LC CDR2 de SEQ ID NO: 11 y la LC CDR3 de SEQ ID NO: 13;

(iii) un anticuerpo que comprende una V_H que comprende la HC CDR1 de SEQ ID NO: 2, la HC CDR2 de SEQ ID NO: 4 y la HC CDR3 de SEQ ID NO: 6 y una V_L que comprende la LC CDR1 de SEQ ID NO: 9, la LC CDR2 de SEQ ID NO: 11 y la LC CDR3 de SEQ ID NO: 15;

10 (iv) un anticuerpo que comprende una V_H que comprende la HC CDR1 de SEQ ID NO: 2, la HC CDR2 de SEQ ID NO: 4 y la HC CDR3 de SEQ ID NO: 16 y una V_L que comprende la LC CDR1 de SEQ ID NO: 9, la LC CDR2 de SEQ ID NO: 11 y la LC CDR3 de SEQ ID NO: 15;

(v) un anticuerpo que comprende una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19;

15 (vi) un anticuerpo que comprende una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; y

(vii) un anticuerpo que comprende una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19; y

(viii) un anticuerpo que comprende una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

20 Cualquiera de los anticuerpos anti-IL6 descritos en este documento puede ser un anticuerpo de longitud completa o un fragmento del mismo que se une a antígeno, que puede ser Fab o (Fab')₂. Alternativamente, el anticuerpo anti-IL6 puede ser un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

25 En otro aspecto, la presente descripción proporciona un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo (V_H), una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo (V_L) o ambas, en donde la V_H y la V_L son como se describen en este documento.

En otro aspecto, la presente descripción proporciona un vector (por ejemplo, un vector de expresión) que comprende cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en este documento y una célula hospedadora que comprende un vector de ese tipo.

30 En otro aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para producir un anticuerpo que se une a IL6 humana, que comprende: (i) cultivar la célula hospedadora de la reivindicación 40 en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo y, opcionalmente, (ii) recuperar el anticuerpo.

35 Otro aspecto de la presente descripción se refiere a una composición (por ejemplo, una composición farmacéutica) que comprende (a) cualquiera de los anticuerpos anti-IL6 descritos en este documento, cualquiera de los ácidos nucleicos descritos en este documento o cualquiera de los vectores descritos en este documento; y (b) un vehículo tal como un vehículo farmacéuticamente aceptable.

40 En algunas realizaciones, cualquiera de las composiciones descritas en este documento comprende además otro agente anticancerígeno o un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD, por sus siglas en inglés). Ejemplos del agente anticancerígeno incluyen, pero no se limitan a, docetaxel, oxaliplatino y gemcitabina. Ejemplos de DMARDs incluyen, pero no se limitan a, metotrexato, azatioprina, cloroquina, hidroxiclороquina, ciclosporina A y sulfasalazina.

45 En otro aspecto adicional, la presente descripción proporciona un método para tratar una enfermedad asociada con IL6, que comprende administrar a un sujeto que lo requiere, una cantidad terapéuticamente eficaz de cualquiera de los anticuerpos anti-IL6 descritos en este documento o cualquiera de los ácidos nucleicos que codifican tales anticuerpos anti-IL6. Ejemplos de la enfermedad asociada con IL6 incluyen, pero no se limitan a, trastorno inflamatorio, enfermedades autoinmunes, angiogénesis y cáncer.

50 En algunas realizaciones, la enfermedad asociada con IL6 es el cáncer, que puede ser mieloma múltiple, leucemia, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer oral y cáncer de próstata. En algunos ejemplos, la cantidad del anticuerpo o del ácido nucleico codificador es eficaz para reducir la metástasis tumoral o la caquexia relacionada con el cáncer. En otros ejemplos, el método comprende además administrar al sujeto otro agente anticancerígeno, por ejemplo, oxaliplatino, gemcitabina o docetaxel.

En otras realizaciones, la enfermedad asociada con IL6 es una enfermedad autoinmune, por ejemplo, artritis reumatoide (AR), enfermedad de Crohn, enfermedad de Castleman, esclerosis múltiple, espondilitis anquilosante, artritis

psoriásica o psoriasis. En algunos ejemplos, el método descrito en este documento comprende además administrar al sujeto uno o varios fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs), por ejemplo, metotrexato, azatioprina, cloroquina, hidroxiclороquina, ciclosporina A, sulfasalazina.

5 También se encuentran dentro del alcance de la presente descripción composiciones farmacéuticas para uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con IL6, en donde la composición farmacéutica comprende (a) cualquiera de los anticuerpos anti-IL6 o cualquiera de los ácidos nucleicos/vectores descritos en este documento; (b) un vehículo farmacéuticamente aceptable; y, opcionalmente, (c) un agente anticancerígeno o un DMARD como los descritos en este documento. Las enfermedades ejemplares asociadas con IL6 incluyen, pero no se limitan a, trastorno inflamatorio, enfermedades autoinmunes (por ejemplo artritis reumatoide (AR), enfermedad de Crohn, enfermedad de Castleman, esclerosis múltiple, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica y psoriasis), angiogénesis, cáncer (por ejemplo, mieloma múltiple, leucemia, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer oral y cáncer de próstata), metástasis tumoral, caquexia relacionada con el cáncer.

15 Además, la presente descripción proporciona usos de cualquiera de los anticuerpos anti-IL6 o de cualquiera de los ácidos nucleicos codificantes en un medicamento o para uso en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o una afección asociada con IL6 como las descritas en este documento.

Los detalles de una o varias realizaciones de la invención se exponen en la siguiente descripción. Otras características o ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de los siguientes dibujos y la descripción detallada de varias realizaciones y también a partir de las reivindicaciones adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

20 La Figura 1 es un diagrama que muestra la eficacia de los anticuerpos anti-IL6 de alta afinidad sobre una vía de transducción de la señalización celular y la proliferación. (A) La señalización de STAT3 fosforilado se redujo mediante los anticuerpos anti-IL6, Ag1-4-6 y HAgT1-3-10 de una manera dependiente de la dosis. (B) Los anticuerpos anti-IL6, Ag1-4-6 y HAgT1-3-10 inhibían la señalización de STAT3 a un nivel mucho mayor en comparación con el anticuerpo de control Actemra. (C) Los anticuerpos anti-IL6, 1-4-62, Ag1-4-6 y HAgT1-3-10 inhibían la proliferación de células B9 de una manera dependiente de la dosis y la CI_{50} era 0,618, 0,0468 y 0,00456 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.

25 La Figura 2 es un diagrama que muestra que los anticuerpos anti-IL6 inhibían la producción de quimiocinas en las células HUVECs. Las células HUVECs se cultivaron con IL6, sIL6R, IL6 y sIL6R o una combinación de IL6, sIL6R y un anticuerpo anti-IL6 como se ha indicado durante 24 h. MCP-1 y sICAM-1 en el material sobrenadante del cultivo se midieron mediante ELISA. (A) la secreción de MCP-1 inducida por IL6 + sIL6R se inhibía mediante los anticuerpos anti-IL6 Ag1-4-6 y HAgT1-3-10. (B) Los anticuerpos Ag1-4-6 y HAgT1-3-10 inhibían la producción de sICAM-1 a un nivel superior que Actemra.

La Figura 3 es un diagrama que muestra la especificidad de la unión de anticuerpos anti-IL6 ejemplares descritos en este documento.

35 La Figura 4 es un diagrama que muestra que el anticuerpo Ag1-4-6 (FB704) inhibía la angiogénesis *in vivo*. La proteína recombinante hIL6 se añadió a Matrigel y se inyectó en dos sitios en el lado dorsal de los ratones. Los ratones fueron tratados con anticuerpos a través de una inyección i.v. o una mezcla previa. (A) FB704 inhibía la angiogénesis inducida por IL6, tal y como se observó 6 días después del tratamiento. (B) El tratamiento con anticuerpo FB704 cambiaba significativamente las concentraciones de hemoglobina.

40 La Figura 5 es un diagrama que muestra que el anticuerpo FB704 inhibía la caquexia y la metástasis inducidas por células de cáncer de próstata humanas PC-3. Después de una inyección del tumor, se midieron los pesos corporales de los ratones el día 31. (A) Los pesos corporales de los ratones tratados con PBS se redujeron en aproximadamente un 19%. En contraste, los grupos tratados con dosis elevadas de FB704 y Actemra se mantuvieron estables y se mostraron significativamente diferentes ($P < 0,01$). (B) FB704 ($n = 15$; $P = 0,00001$) y Actemra ($n = 12$; $P = 0,024$) prolongaban significativamente la supervivencia exenta de síntomas de ratones portadores de tumores PC3. FB704 mostraba una eficacia significativamente mejor que Actemra ($P = 0,03$). (C) Una autopsia macroscópica del grupo tratado con PBS mostraba un alargamiento grave e infiltración de células tumorales en el hígado. Sin embargo, grupo tratado con FB704 mostraba una infiltración moderada de células tumorales y casi un 50% de hepatocitos normales en los lóbulos izquierdo y medio del hígado. (D) La inmunohistoquímica mostraba que la densidad de los vasos se reducía después del tratamiento con FB704 en secciones tumorales. (E) Un análisis semicuantitativo de la tinción de CD31 mostraba una disminución significativa después del tratamiento con FB704 ($P < 0,05$). (F) El tratamiento de combinación de FB704 más el quimiofármaco docetaxel proporcionaba una mejor tasa de supervivencia general.

45 La Figura 6 es un diagrama que muestra que el anticuerpo FB704 potenciaba la actividad antitumoral de oxaliplatino o gemcitabina en un xenoinjerto de carcinoma de páncreas. (A) Un tratamiento de los ratones portadores de tumores BxPC-3 con 20 mg/kg de FB704 dos veces a la semana, más oxaliplatino (3 mg/kg) una vez a la semana, daba como resultado una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa del 49% ($P < 0,01$). (B) El peso corporal de los ratones se había incrementado normalmente durante el tratamiento. (C y D) Las masas tumorales individuales se midieron después del experimento y los pesos de los tumores se redujeron significativamente des-

pués de los tratamientos. (E) Se observó el marcador de la proliferación de células tumorales, Ki-67, en diferentes tratamientos de la sección tumoral. (F) La tasa de células positivas para Ki-67 de los grupos de tratamiento con PBS, oxaliplatino, FB704 y FB704 más oxaliplatino era de 26%, 14%, 16% y 7,5%, respectivamente. (G) El tratamiento de los ratones portadores de tumores BxPC-3 con 20 mg/kg de FB704 y gemcitabina (80 mg/kg) dos veces a la semana, daba como resultado una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa del 60% ($P < 0,01$).

La Figura 7 es un diagrama que muestra que los anticuerpos anti-IL6 ejemplares descritos en este documento inhibían la producción de MCP-1 en células U937 y PBMC humanas. (A) Las células U937 se cultivaron con IL6 y se trataron con anticuerpos durante 24 h. MCP-1 se midió mediante un kit de ELISA. Nuestros anticuerpos muestran una inhibición dependiente de la dosis de la producción de MCP-1 ($n = 3$). (B) las células PBMC se cultivaron con IL6 y se trataron con anticuerpos durante 24 h. MCP-1 se midió mediante ELISA. Nuestros anticuerpos mostraban una inhibición dependiente de la dosis de la producción de MCP-1 ($n = 5$).

La Figura 8 es un diagrama que muestra la inhibición de la producción de MCP-1 en RA-FLS a través de anticuerpos anti-IL6 ejemplares descritos en este documento. (A) Células RA-FLS comerciales y (B) células FLS de pacientes con AR se cultivaron con IL6 más sIL6R con presencia o ausencia de anticuerpos durante 24 h. Nuestros anticuerpos muestran una inhibición dependiente de la dosis, de la producción de MCP-1 ($n = 6$).

La Figura 9 es un diagrama que muestra la inhibición de la producción de VEGF en RA-FLS mediante anticuerpos anti-IL6 ejemplares descritos en este documento. (A) Células RA-FLS comerciales y (B) células FLS de pacientes con AR se cultivaron con IL6, sIL6R e IL1 β y se trataron con anticuerpos durante 24 h. Nuestros anticuerpos muestran una inhibición dependiente de la dosis, de la producción de VEGF ($n = 6$).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente descripción se refiere a anticuerpos que se unen a la interleucina-6 humana (IL6), que pueden neutralizar la actividad de la IL6, y a sus usos en la regulación de las vías de señalización mediadas por IL6. Los anticuerpos anti-IL6 descritos en este documento son útiles en el tratamiento de enfermedades o trastornos asociados a IL6, tales como trastornos inflamatorios, enfermedades autoinmunes, angiogénesis, cáncer, metástasis tumoral y caquexia relacionada con el cáncer.

La siguiente descripción solamente tiene por objeto ilustrar diversas realizaciones de la invención. Como tales, las realizaciones específicas descritas en este documento no se deben interpretar como limitaciones del alcance de la invención. Para un experto en la técnica será evidente que se pueden realizar diversos cambios o equivalentes sin apartarse del alcance de la invención.

Técnicas generales

La puesta en práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de biología molecular (incluyendo técnicas recombinantes), microbiología, biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Tales técnicas se explican completamente en publicaciones, tales como Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición (Sambrook, et al., 1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait, compilador, 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis, compilador, 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R. I. Freshney, compilador, 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather y P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J. B. Griffiths y D. G. Newell, compiladores, 1993-8) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology (D. M. Weir y C. C. Blackwell, compiladores); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. Miller y M. P. Calos, compiladores, 1987); Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel, et al., compiladores, 1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, et al., compiladores, 1994); Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., compiladores, 1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999); Immunobiology (C. A. Janeway y P. Travers, 1997); Antibodies (P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach (D. Catty., compilador, IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd y C. Dean, compiladores, Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow y D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti y J. D. Capra, compiladores, Harwood Academic Publishers, 1995).

Definiciones

Con el fin de proporcionar una comprensión clara y eficaz de la presente descripción, primero se definen ciertos términos. Definiciones adicionales se exponen a lo largo de toda la descripción detallada. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen los mismos significados que como lo entiende comúnmente un experto en la técnica pertinente.

Tal y como se utiliza en este documento, los artículos "un" y "una" se refieren a uno o más de uno (es decir, al menos uno) de los objetos gramaticales del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Tal y como se utiliza en este documento, el término "polipéptido" se refiere a un polímero compuesto por residuos de

aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. El término "proteína" se refiere normalmente a polipéptidos relativamente grandes. El término "péptido" se refiere normalmente a polipéptidos relativamente cortos (por ejemplo, que contienen hasta 100, 80, 60, 50, 30 o 20 residuos de aminoácidos).

5 Un anticuerpo (usado indistintamente en la forma plural) es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un carbohidrato, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de antígeno, que se encuentra en la región variable de la molécula de inmunoglobulina. Tal y como se utiliza en este documento, el término "anticuerpo" incluye no solo anticuerpos intactos (es decir, de longitud completa) policlonales o monoclonales, sino también fragmentos de los mismos que se unen a antígeno (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv)), mutantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una porción de anticuerpo, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, anticuerpos lineales, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio de reconocimiento de antígenos con la especificidad requerida, incluyendo variantes de anticuerpos por glicosilación, variantes de la secuencia aminoacídica de anticuerpos y anticuerpos modificados covalentemente.

15 Un anticuerpo de longitud completa intacto comprende dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras. Cada cadena pesada contiene una región variable de la cadena pesada (V_H) y regiones constantes primera, segunda y tercera (C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}). Cada cadena ligera contiene una región variable de la cadena ligera (V_L) y una región constante (C_L). Un anticuerpo de longitud completa puede ser un anticuerpo de cualquier clase, tal como IgD, IgE, IgG, IgA o IgM (o subclases de los mismos) y el anticuerpo no tiene que ser de ninguna clase en particular. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo en el dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM y varias de ellas se pueden dividir adicionalmente en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa, delta, épsilon, gamma y mu, respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

20 La expresión "dominio que se une a antígeno" o "fragmento que se une a antígeno" se refiere a una porción o una región de una molécula de anticuerpo intacta que es responsable de la unión del antígeno. Un dominio que se une a antígeno puede comprender la región variable de la cadena pesada (V_H), la región variable de la cadena ligera (V_L) o ambas. Cada una de las V_H y V_L normalmente contiene tres regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3). Las tres CDRs en la V_H o V_L están flanqueadas por regiones estructurales (FR1, FR2, FR3 y FR4).

25 Ejemplos de fragmentos que se unen a antígeno incluyen, pero no se limitan a: (1) un fragmento Fab, que puede ser un fragmento monovalente que tiene una cadena V_L-C_L y una cadena V_H-C_{H1}; (2) un fragmento F(ab')₂ que puede ser un fragmento bivalente que tiene dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra, es decir, un dímero de Fab; (3) un fragmento Fv que tiene los dominios V_L y V_H de un solo brazo de un anticuerpo; (4) una cadena Fv sencilla (scFv), que puede ser una cadena sencilla de polipéptido compuesta por un dominio V_H y un dominio V_L a través de un enlazador peptídico; y (5) un (scFv)₂, que puede comprender dos dominios V_H unidos por un enlazador peptídico y dos dominios V_L que están asociados con los dos dominios V_H a través de puentes disulfuro.

35 La expresión "anticuerpo humano" se refiere a anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que se corresponden sustancialmente o se obtienen a partir de anticuerpos obtenidos a partir de sujetos humanos, por ejemplo, codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana o variantes de las mismas. Los anticuerpos humanos descritos en este documento pueden incluir uno o varios residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o específica del sitio *in vitro* o mediante mutación somática *in vivo*). Tales mutaciones pueden estar presentes en una o varias de las CDRs o en una o varias de las FRs. En algunos ejemplos, los anticuerpos humanos pueden tener al menos uno, dos, tres, cuatro, cinco o más posiciones reemplazadas con un residuo de aminoácido que no está codificado por la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana.

40 Una sustancia "aislada" significa que ha sido alterada por la mano humana a partir de su estado natural. Si una sustancia "aislada" está presente en la naturaleza, se ha cambiado o retirado de su entorno original o ambos. Por ejemplo, un polipéptido presente naturalmente en un sujeto vivo no está "aislado", pero el polipéptido se aísla si se ha separado sustancialmente de los materiales coexistentes en su estado natural y existe en un estado sustancialmente puro.

45 La expresión "se une específicamente" o "unión específica" se refiere a una reacción de unión que no es aleatoria entre dos moléculas, tal como la unión del anticuerpo con un epítipo del antígeno. Un anticuerpo que "se une específicamente" a una diana o un epítipo, es un término que se entiende en la técnica y los métodos para determinar tal unión específica también son bien conocidos en la técnica. Una molécula se dice que muestra una "unión específica" si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con un antígeno diana en particular o con un epítipo, que como lo hace con dianas/epítopos alternativos. Un anticuerpo "se une específicamente" a un antígeno diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que como se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente (o preferentemen-

te) a un epítipo de IgE, es un anticuerpo que se une a ese epítipo de IgE con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración que como se une a otros epítipos de IgE o epítipos que no son de IgE. También se entiende con la lectura de esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente a un primer antígeno diana se puede unir o no específicamente o se une preferentemente a un segundo antígeno diana. Como tal, "unión específica" o "unión preferencial" no requiere necesariamente (aunque puede incluir) una unión exclusiva. En general, pero no necesariamente, la referencia a unión significa una unión preferencial.

Los términos "sujeto", "individuo" y "paciente" se usan indistintamente en este documento y se refieren a un mamífero que está siendo evaluado para un tratamiento y/o que está siendo tratado. Los sujetos pueden ser humanos, pero también se incluyen otros mamíferos, en particular mamíferos útiles como modelos de laboratorio para una enfermedad humana, por ejemplo, ratón, rata, conejo, perro, etc.

El término "tratamiento" o "tratar" se refiere a una acción, aplicación o terapia, en donde un sujeto, incluyendo un ser humano, se somete a una ayuda médica con el fin de mejorar el estado del sujeto, directa o indirectamente. En particular, el término se refiere a reducir la incidencia o aliviar los síntomas, eliminar la recurrencia, prevenir la recurrencia, prevenir la incidencia, mejorar los síntomas, mejorar el pronóstico o una combinación de los mismos en algunas realizaciones. El experto en la técnica entenderá que el tratamiento no da lugar necesariamente a una ausencia o eliminación completa de los síntomas. Por ejemplo, con respecto al cáncer, "tratamiento" o "tratar" puede referirse a la desaceleración del crecimiento de células neoplásicas o malignas, de la proliferación o la metástasis, evitando o retrasando el desarrollo del crecimiento de células neoplásicas o malignas, la proliferación o la metástasis o una combinación de las mismas.

Una "cantidad eficaz" o una "dosis eficaz" o una "cantidad terapéuticamente eficaz" en relación con la administración de un agente farmacológico, tal como se usa en este documento, se refiere a una cantidad de un fármaco o un agente farmacéutico que, en comparación con un sujeto correspondiente que no ha recibido dicha cantidad, da lugar a un resultado farmacológico deseado o un efecto sobre el tratamiento, curación, prevención o mejora de una enfermedad, trastorno o efecto secundario, o una disminución de la tasa de avance de una enfermedad o un trastorno. La cantidad o dosis eficaz de un agente farmacológico pueden variar dependiendo del ingrediente activo particular empleado, el modo de administración y la edad, el tamaño y el estado del sujeto que se va a tratar. Las cantidades precisas de un agente farmacológico que se tienen que administrar dependen del juicio del médico que atiende y son peculiares para cada individuo.

"Enfermedades o afecciones asociadas a IL6" se refieren a cualquier enfermedad o afección en la que IL6 tiene un papel regulador en la ruta de señalización que conduce a esa enfermedad o trastorno. La IL6 es un miembro de una familia de citocinas que inician las respuestas celulares a través de un complejo de receptor compuesto por al menos una subunidad de la glicoproteína de transducción de señales gp130 y el receptor de IL6 (IL6R). La IL6 se une a IL6R, que entonces dimeriza gp130 lo que desencadena una fosforilación de los residuos de tirosina de gp130. Al menos tres vías principales de señalización están implicadas en la formación del complejo IL6/IL6R/gp130, los transductores de señales (1) fosfatidil inositol-3'-cinasa (PI3K), (2) proteína cinasa activada por mitógeno (MAK) y (3) tirosina cinasa Janus (JAK) y la vía del activador de la transcripción 1 y 3 (STAT1 y STAT3). La IL6 se cree que tiene un papel en el desarrollo de una amplia gama de enfermedades o trastornos, incluyendo, pero limitados a, inflamación, enfermedades autoinmunes (por ejemplo, artritis reumatoide (AR), enfermedad de Crohn, enfermedad de Castleman, esclerosis múltiple, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica y psoriasis), angiogénesis, cáncer (por ejemplo, mieloma múltiple, leucemia, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer oral y cáncer de próstata), metástasis de tumores, caquexia relacionada con el cáncer.

Tal y como se usa en este documento, "artritis reumatoide" se refiere a un tipo de enfermedad autoinmune, que se caracteriza por inflamaciones de las articulaciones sinoviales en todo el cuerpo. Un síntoma temprano de la enfermedad es dolor en las articulaciones, que progresa en una deformación de las articulaciones o daños en órganos del cuerpo tal como en los vasos sanguíneos, el corazón, los pulmones, la piel y los músculos.

Tal y como se usa en este documento, "angiogénesis" se refiere en general al proceso fundamental a través del cual se forman nuevos vasos sanguíneos. La angiogénesis puede tener lugar como un proceso fisiológico normal durante los períodos de crecimiento tisular, tal como un aumento en el músculo, la cicatrización de heridas y el embarazo, pero también puede estar asociada a un estado de enfermedad en el que el crecimiento de los vasos sanguíneos no es beneficioso para la salud del paciente, tal como el cáncer y la retinopatía diabética.

El término "cáncer", tal y como se usa en este documento, se refiere a una afección médica mediada por un grupo de células neoplásicas o malignas, proliferación o metástasis, incluyendo cánceres sólidos y cánceres no sólidos. Los ejemplos de cáncer incluyen, pero no se limitan a, cáncer de pulmón, cáncer de riñón, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer de cerebro, cáncer de próstata, cáncer hepatocelular, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, cáncer del tracto urinario, cáncer de tiroides, melanoma, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de colon, leucemia, linfomas y mielomas.

El término "caquexia" se refiere a un estado de mala salud y malnutrición general. Por lo general se asocia y está inducida por un cáncer maligno y se caracteriza por una pérdida grave del apetito, pérdida vertiginosa de masa corporal, especialmente de la masa corporal magra y pérdida de la masa muscular.

Anticuerpos anti-IL6 de afinidad elevada

La presente descripción se basa en la identificación de una serie de anticuerpos anti-IL6 de alta afinidad, incluyendo 1-4-62, Ag1-4-6 (también conocido como FB704) y HAg1T-3-10. Se encontró que estos anticuerpos anti-IL6 se unen a IL6 humana con alta afinidad de unión (por ejemplo, que tiene un valor de KD menor de 10^{-8} M, preferiblemente menor de 10^{-9} M) y alta especificidad, por ejemplo, la unión a otras citocinas de la familia IL6 tales como las mostradas en la Figura 3, con una afinidad de unión mucho más baja que en comparación con IL6 humana. Además, se encontró que estos anticuerpos reducen significativamente la proliferación celular inducida por IL6 y la fosforilación de STAT3, la angiogénesis y la producción de hemoglobina. Además, estos anticuerpos anti-IL6 inhiben con éxito la caquexia inducida por el cáncer (por ejemplo, inducida por el cáncer de próstata), el crecimiento del cáncer de páncreas y la metástasis del cáncer, tal como metástasis del cáncer de próstata, mejoran de forma significativa los efectos anticancerígenos de otros agentes quimioterapéuticos tales como oxaliplatino, gemcitabina y docetaxel y reducen la producción de citocinas inflamatorias (por ejemplo, MCP-1 y sICAM) y/o de VEGF a través de las células HUVEC y PBMC y/o fibroblastos sinoviales, por ejemplo, los obtenidos a partir de pacientes con AR.

De acuerdo con ello, en este documento se describen anticuerpos de alta afinidad capaces de unirse (por ejemplo, unirse específicamente) a IL6 humana, incluyendo 1-4-62, Ag1-4-6 y HAg1T-3-10 y sus variantes funcionales. Las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena pesada (V_H) y la región variable de la cadena ligera (V_L) de cada uno de 1-4-62, Ag1-4-6 y HAg1T-3-10 se muestran en la Tabla 1 a continuación. Una variante funcional de cualquiera de estos tres anticuerpos puede comprender una cadena V_H que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 85% (por ejemplo, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) idéntica a la de la cadena V_H de 1-4-62, Ag1-4-6 o HAg1T-3-10 (SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18), una cadena V_L que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 85% (por ejemplo, 90%, 92%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99%) idéntica a la de la cadena V_L de 1-4-62, Ag1-4-6 o HAg1T-3-10 (SEQ ID NO: 19 o SEQ ID NO: 20) o ambas. Estas variantes son capaces de unirse a IL6 humana. En algunos ejemplos, las variantes poseen una afinidad de unión a antígeno similar, en relación con los anticuerpos de referencia descritos anteriormente (por ejemplo, que tienen una K_d menor de 1×10^{-8} , preferiblemente menor de 1×10^{-9} o 1×10^{-10} M).

La afinidad de la unión se define por los términos k_a (constante de la tasa de asociación), k_d (constante de la tasa de disociación) o KD (equilibrio de disociación). Típicamente, la unión específica cuando se utiliza con respecto a un anticuerpo, se refiere a un anticuerpo que se une específicamente ("reconoce") a su o sus dianas con un valor de afinidad (KD) menor de 10^{-8} M, por ejemplo, menor de 10^{-9} M o 10^{-10} M. Un valor de KD inferior representa una mayor afinidad de la unión (es decir, una unión más fuerte) de modo que un valor de KD de 10^{-9} indica una mayor afinidad de la unión que un valor de KD de 10^{-8} .

El "porcentaje de identidad" de dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Karlin y Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-68, 1990, modificado como en Karlin y Altschul *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-77, 1993. Ese algoritmo se incorpora en los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al. *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990. Las búsquedas de proteínas con BLAST se pueden realizar con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3, para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a las moléculas de proteínas de interés. Si existen huecos entre dos secuencias, se puede utilizar Gapped BLAST tal y como se describe en Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-3402, 1997. Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, se pueden utilizar los parámetros por defecto de los programas respectivos (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

Los anticuerpos que se unen a los mismos epítopos que 1-4-62, Ag1-4-6 y HAg1T-3-10 están también dentro del alcance de la presente descripción.

En algunas realizaciones, el anticuerpo anti-IL6 comprende una región variable de la cadena pesada (V_H) que comprende una HC CDR3 de MHIDDSNGYXSDAF (SEQ ID NO: 21), en la que X es un residuo de aminoácido aromático, tal como F, Y, H o W. En algunos ejemplos, la HC CDR3 es SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 16. La cadena V_H de un anticuerpo de este tipo puede comprender además una HC CDR1 de SEQ ID NO: 2, una HC CDR2 de SEQ ID NO: 2 o ambas.

Alternativamente o además, el anticuerpo anti-IL6 comprende una región variable de la cadena ligera (V_L) que comprende una LC CDR3 de SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15. La cadena V_L de un anticuerpo de este tipo puede comprender además una LC CDR1 de SEQ ID NO: 9, una LC CDR2 de SEQ ID NO: 11 o ambas.

En algunas realizaciones, los anticuerpos anti-IL6 descritos en este documento comprenden las mismas CDRs de la cadena pesada y ligera que los anticuerpos 1-4-62, Ag1-4-6 y HAg1T-3-10, tal y como se muestra en la Tabla 1 a continuación. En algunos ejemplos, estos anticuerpos comprenden las mismas cadenas V_H y V_L que 1-4-62, Ag1-4-6 y HAg1T-3-10. Las cadenas V_H y V_L se pueden fusionar con C_H1 y CL de la cadena pesada, respectivamente, para formar fragmentos Fab, Fab' o F(ab')₂. Alternativamente, las cadenas V_H y V_L se pueden fusionar con la región constante de la cadena pesada (por ejemplo, la cadena constante de IgG humana) y la región constante de la cadena ligera (una cadena kappa) para formar anticuerpos de longitud completa. En otros ejemplos, las cadenas V_H y V_L se pueden fusionar, ya sea directamente o mediante un enlazador, para formar un anticuerpo de cadena sencilla.

En otras realizaciones, las variantes funcionales descritas en este documento pueden contener una o varias mutaciones (por ejemplo, sustituciones conservadoras) en las FRs de la V_H , la V_L o ambas, en comparación con las de los anticuerpos 1-4-62, Ag1-4-6 y HAg1T-3-10. Preferentemente, tales mutaciones no se producen en los residuos que se han previsto que van a interactuar con una o varias de las CDRs. Como se conoce en la técnica, las mutaciones dentro de las regiones FRs son poco probable que afecten a la actividad de unión al antígeno del anticuerpo. En algunos ejemplos, cambios en una o varias de las regiones CDRs de los anticuerpos 1-4-62, Ag1-4-6 y HAg1T-3-10 son insustanciales, es decir, son sustancialmente idénticas a una secuencia de referencia.

El término "insustancial" o "sustancialmente idénticas" significa que las secuencias de aminoácidos relevantes (por ejemplo, en FRs, CDRs, dominio V_H o V_L) de una variante difieren insustancialmente (por ejemplo, incluyendo sustituciones conservadoras de aminoácidos) en comparación con un anticuerpo de referencia, de tal manera que la variante tiene actividades de unión (por ejemplo, afinidad, especificidad o ambas) y bioactividades sustancialmente similares, en relación con el anticuerpo de referencia. Una variante de este tipo puede incluir cambios de aminoácidos menores, por ejemplo, 1 o 2 sustituciones en una secuencia de 5 aminoácidos de una región determinada. En general, se pueden hacer más sustituciones en las regiones FRs, en contraste con las regiones CDRs, siempre que no afecten adversamente a la función de unión del anticuerpo (tal como una reducción de la afinidad de la unión en más de un 50%, en comparación con el anticuerpo original). En alguna realización, la identidad de secuencia puede ser de aproximadamente 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o superior, entre el anticuerpo original y el modificado. En algunas realizaciones, el anticuerpo modificado tiene la misma especificidad de unión y tiene al menos 50% de la afinidad del anticuerpo original. En algunos ejemplos, la variante incluye sustituciones de hasta 5 aminoácidos, tales como sustituciones conservadoras (por ejemplo, 1, 2, 3, 4 o 5) en una o varias regiones CDRs de la V_H , la V_L o ambas de los anticuerpos 1-4-62, Ag1-4-6 y HAg1T-3-10.

Las sustituciones conservadoras producirán moléculas que tienen características funcionales y químicas similares a las de la molécula a partir de la cual se realizan tales modificaciones. Por ejemplo, una "sustitución de aminoácidos conservadora" puede implicar una sustitución de un residuo de aminoácido natural por otro residuo, de tal manera que hay poco efecto o ninguno sobre la polaridad o la carga del residuo de aminoácido en esa posición. Las sustituciones de aminoácidos deseadas (ya sean conservadoras o no conservadoras) pueden ser determinadas por los expertos en la técnica. Por ejemplo, las sustituciones de aminoácidos se pueden utilizar para identificar residuos importantes de la secuencia de la molécula o para aumentar o disminuir la afinidad de las moléculas descritas en este documento. Las variantes que comprenden una o varias sustituciones de aminoácidos conservadoras se pueden preparar de acuerdo con métodos para alterar la secuencia de polipéptidos, conocidos por los expertos en la técnica, tales como los que se encuentran en las referencias que resumen tales métodos, p. ej., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., compiladores, segunda edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989, o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., compiladores, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York. Las sustituciones conservadoras de aminoácidos incluyen sustituciones realizadas entre aminoácidos dentro de los siguientes grupos: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; y (g) E, D.

La presente descripción también proporciona variantes de anticuerpos con mejores propiedades biológicas del anticuerpo, tales como mayor afinidad de la unión. Variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se pueden preparar introduciendo cambios de nucleótidos apropiados en el ácido nucleico del anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones y/o inserciones y/o sustituciones de residuos dentro de las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Cualquier combinación de una deleción, inserción y sustitución se realiza para lograr la estructura artificial final, siempre que la estructura artificial final posea las características deseadas. Las moléculas de ácido nucleico que codifican variantes de la secuencia de aminoácidos del anticuerpo se pueden preparar mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica. Estos métodos incluyen, pero no se limitan a, mutagénesis mediada por oligonucleótidos (o dirigida al sitio), mutagénesis por PCR y mutagénesis de casete de una variante preparada anteriormente o una versión no variante (natural) del anticuerpo. En una realización, el valor de la constante de disociación en equilibrio (KD) de los anticuerpos anti-IL6 de la invención es menor de 10^{-8} M, particularmente menor de 10^{-9} M o 10^{-10} M. La afinidad de la unión se puede determinar usando métodos conocidos en la técnica, tales como ELISA o análisis de interacción bioespecífica, u otros métodos conocidos en la técnica.

Los anticuerpos anti-IL6 a modo de ejemplo tal y como se describen en este documento incluyen, pero no se limitan a:

(i) un anticuerpo que comprende (a) una V_H que comprende una HC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 2, una HC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 4 y una HC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 6 o SEQ ID NO: 16; o (b) una V_L que comprende una LC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 9, una LC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 11 y una LC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 13 o SEQ ID NO: 15;

(ii) un anticuerpo que comprende una V_H que comprende una HC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 2, una HC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 4 y una HC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 6;

(iii) un anticuerpo que comprende una V_L que comprende una LC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 9, una LC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 11 y una LC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 13;

5 (iv) un anticuerpo que comprende (a) una V_H que comprende una HC CDR1 que comprende SEQ ID NO: 2, una HC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 4 y una HC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 6 y (b) una V_L que comprende una LC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 9, una LC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 11 y una LC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 13;

10 (v) un anticuerpo que comprende una V_L que comprende una LC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 9, una LC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 11 y una LC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 15;

15 (vi) un anticuerpo que comprende (a) una V_H que comprende una HC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 2, una HC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 4 y una HC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 6 y (b) una V_L que comprende una LC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 9, una LC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 11 y una LC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 15;

20 (vii) un anticuerpo que comprende una V_H que comprende una HC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 2, una HC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 4 y una HC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 16;

25 (viii) un anticuerpo que comprende una V_H que comprende (a) una HC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 2, una HC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 4 y una HC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 16 y (b) una V_L que comprende una LC CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 9, una LC CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 11 y una LC CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos indicada en SEQ ID NO: 15.

30 Cualquiera de los anticuerpos anti-IL6 descritos en este documento se pueden examinar para determinar sus propiedades, como la actividad de unión al antígeno, la especificidad de la unión al antígeno y las funciones biológicas, siguiendo métodos de rutina, por ejemplo, los descritos en los ejemplos a continuación.

Cualquiera de los anticuerpos anti-IL6 descritos en este documento se pueden modificar para que contengan restos adicionales no proteínicos que son conocidos en la técnica y están fácilmente a disposición, por ejemplo, mediante PEGilación, hiperglicosilación y similares. Las modificaciones que pueden mejorar la semivida en suero son de interés.

35 También se describen en este documento ácidos nucleicos que codifican cualquiera de los anticuerpos anti-IL6 descritos en este documento, vectores tales como vectores de expresión que comprenden estos ácidos nucleicos y células hospedadoras que comprenden los vectores. En un ejemplo, tanto las secuencias que codifican la cadena pesada como la ligera (por ejemplo, secuencias que codifican una V_H y una V_L , una V_H-C_H1 y una V_L-C_L , o una cadena pesada de longitud completa y una cadena ligera de longitud completa) se incluyen en un vector de expresión. En otro ejemplo, cada una de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo se clona en un vector individual. En el último caso, los vectores de expresión que codifican las cadenas pesadas y ligeras se pueden cotransfectar en una célula hospedadora para expresar ambas cadenas, las cuales se pueden ensamblar para formar anticuerpos intactos, ya sea *in vivo* o *in vitro*. Alternativamente, el vector de expresión que codifica la cadena pesada y que codifica la cadena ligera se puede introducir en diferentes células hospedadoras para expresar cada una de las cadenas pesada y ligera, las cuales se pueden purificar y ensamblar a continuación para formar anticuerpos intactos *in vitro*.

45 Numerosos métodos conocidos por los expertos en la técnica están disponibles para la obtención de anticuerpos o fragmentos de los mismos que se unen a antígeno. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden producir usando métodos de ADN recombinante. Los anticuerpos monoclonales también se pueden producir mediante la generación de hibridomas. Los hibridomas formados de esta manera se escrutan después utilizando métodos convencionales, tales como ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para identificar uno o varios hibridomas que producen un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno especificado. Además, los sistemas de presentación en fagos se pueden utilizar para la detección de anticuerpos de cadena sencilla.

55 Alternativamente, cualquiera de los anticuerpos anti-IL6 se puede preparar a través de una metodología convencional, por ejemplo, tecnología de recombinación. Por ejemplo, las secuencias de polipéptidos proporcionadas en este documento (véase, por ejemplo, la Tabla 1) para los anticuerpos ejemplares descritos en este documento, se pueden utilizar para obtener secuencias de ácido nucleico adecuadas que los codifican y las secuencias de ácido nucleico se pueden clonar en vectores de expresión adecuados mediante tecnología recombinante convencional, para

la producción de los anticuerpos en células hospedadoras adecuadas (por ejemplo, células bacterianas, células de levadura o células de mamífero, tales como células CHO) por métodos de rutina. Los anticuerpos preparados de este modo se pueden aislar a partir de las células o el material sobrenadante del cultivo, y sus características de unión y bioactividades se pueden examinar también mediante tecnología de rutina.

5 En un ejemplo, los sistemas de presentación en fagos se utilizan para seleccionar anticuerpos de cadena sencilla contra IL6. Una vez aislados, los polinucleótidos que codifican scFvs específicos de IL6 se pueden clonar en vectores de expresión diseñados para expresar inmunoglobulinas de longitud completa y fragmentos de las mismas que tienen la especificidad deseada. Brevemente, los polinucleótidos de V_H y V_L del anticuerpo de cadena sencilla se clonan en un vector soporte de inmunoglobulina (es decir, IgG), se expresan y se dimerizan con el fin de "convertir" la cadena sencilla en un anticuerpo completo. El soporte de inmunoglobulina se puede seleccionar a partir de cualquiera de las cinco clases principales de inmunoglobulinas (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) según sea necesario. Los métodos para la conversión de los scFvs en moléculas de inmunoglobulina intactas son bien conocidos, por ejemplo, como se describen en los documentos WO 94/11523, WO 97/9351 o EP 0481790.

10 Los vectores recombinantes para la expresión de los anticuerpos descritos en este documento normalmente contienen un ácido nucleico que codifica las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos ligadas funcionalmente a un promotor o bien constitutivo o inducible. Los vectores pueden ser adecuados para una replicación e integración en procariontes, eucariotas o ambos. Los vectores típicos contienen terminadores de la transcripción y la traducción, secuencias de iniciación y promotores útiles para la regulación de la expresión del ácido nucleico que codifica el anticuerpo. Los vectores contienen opcionalmente casetes de expresión genéricas que contienen al menos una secuencia terminadora independiente, secuencias que permiten la replicación del casete tanto en eucariotas como procariontes, es decir, vectores transportadores y marcadores para la selección, tanto para sistemas procariontes como eucariotas.

15 Los anticuerpos anti-IL6 recombinantes tal y como se describen en este documento, se pueden producir en sistemas de expresión procariontes o eucariotas, tales como bacterias, levaduras, hongos filamentosos, insectos y células de mamífero. No es necesario que los anticuerpos recombinantes de la invención estén glicosilados o se expresen en células eucariotas; sin embargo, generalmente se prefiere la expresión en células de mamífero. Ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero útiles, son la línea de riñón embrionario humano (células 293), células de riñón de cría de hámster (células BHK), células de ovario de hámster chino/- o + DHFR (células CHO, CHO-S, CHO-DG44, Flp-in CHO), células de riñón de mono verde africano (células Vero) y células de hígado humano (células Hep G2). Las células hospedadoras se transforman o se transfectan con los vectores (por ejemplo, mediante transfección química o métodos de electroporación) y se cultivan en medios nutrientes convencionales (o modificados según sea apropiado) para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. La proteína del anticuerpo tal como se produce se puede aislar o purificar adicionalmente para obtener preparaciones que son sustancialmente homogéneas para otros ensayos y aplicaciones. Los métodos de purificación de proteínas convencionales conocidos en la técnica se pueden utilizar. Por ejemplo, los procedimientos de purificación adecuados pueden incluir un fraccionamiento sobre columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico, precipitación con etanol, cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecil sulfato sódico (SDS-PAGE), precipitación con sulfato de amonio y filtración en gel.

20 Cuando se desea un anticuerpo de longitud completa, las secuencias que codifican cualquiera de las cadenas V_H y V_L anti-IL6 descritas en este documento, se pueden ligar a las secuencias que codifican la región Fc de una inmunoglobulina humana y el gen resultante que codifica las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo de longitud completa, se puede expresar y ensamblar en una célula hospedadora adecuada, por ejemplo, una célula vegetal, una célula de mamífero, una célula de levadura o una célula de insecto.

25 Los fragmentos que se unen a antígeno se pueden preparar a través de métodos de rutina. Por ejemplo, los fragmentos $F(ab')_2$ se pueden producir mediante la digestión con pepsina de una molécula de anticuerpo de longitud completa y los fragmentos Fab se pueden generar reduciendo los puentes disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. Alternativamente, tales fragmentos se pueden preparar a través de tecnología recombinante mediante la expresión de los fragmentos de la cadena pesada y ligera en células hospedadoras adecuadas (por ejemplo, células de *E. coli*, levadura, mamífero, planta o insecto) y ensamblarlos para formar los fragmentos que se unen a antígeno deseados, ya sea *in vivo* o *in vitro*.

30 Un anticuerpo de cadena sencilla se puede preparar a través de tecnología recombinante mediante la unión de una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de la cadena pesada y una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de la cadena ligera. Preferiblemente, se incorpora un enlazador flexible entre las dos regiones variables.

55 Usos de los anticuerpos anti-IL6

Se encontró que los anticuerpos anti-IL6 tal y como se describen en este documento, se unen a IL6 y actúan como antagonistas de IL6 y regulan la vía de señalización dependiente de IL6. En particular, se encontró que esos anticuerpos inhibían significativamente la proliferación celular dependiente de IL6 (por ejemplo, el crecimiento de células de cáncer de páncreas) y la transducción de la señalización de STAT fosforilada, disminuían la formación angiogéni-

ca inducida por IL6 *in vivo* e inhibían la metástasis tumoral humana (por ejemplo, la metástasis del cáncer de próstata). Además, estos anticuerpos mostraban una eficacia sinérgica cuando se utilizaban conjuntamente con un agente quimioterapéutico, tal como oxaliplatino, gemcitabina y docetaxel, en modelos animales de tumor pancreático humano.

- 5 Por lo tanto, los anticuerpos anti-IL6 descritos en este documento se pueden usar en el tratamiento de una enfermedad o una afección asociada con la IL6, incluyendo, pero no limitadas a, trastorno inflamatorio, enfermedades autoinmunes (por ejemplo artritis reumatoide (AR), enfermedad de Crohn, enfermedad de Castleman, esclerosis múltiple, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica y psoriasis), angiogénesis, cáncer, tal como un tumor sólido (por ejemplo, mieloma múltiple, leucemia, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer oral y cáncer de próstata), metástasis tumoral y caquexia relacionada por el cáncer.

10 Para poner en práctica los métodos de tratamiento descritos en este documento, cualquiera de los anticuerpos anti-IL6 (por ejemplo, un anticuerpo que tiene las mismas CDRs o las mismas cadenas V_H y V_L que los anticuerpos 1-4-62, Ag1-4-6 o HAg1T-3-10) o uno o varios ácidos nucleicos (por ejemplo, un vector de expresión) que codifican un anticuerpo de ese tipo, se pueden formular en una composición farmacéutica con uno o varios vehículos farmacéuticamente aceptables. "Farmacéuticamente aceptable", tal y como se emplea en este documento, significa que el vehículo es compatible con el ingrediente activo contenido en la composición, preferiblemente es capaz de estabilizar el ingrediente activo y no es perjudicial para el sujeto que va a ser tratado. El vehículo puede servir como un diluyente, portador, excipiente o medio para el ingrediente activo. Algunos ejemplos de vehículos adecuados incluyen tampones fisiológicamente compatibles, tales como solución de Hank, solución de Ringer, tampón de solución salina fisiológica, lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, almidones, goma arábica, fosfato de calcio, alginatos, tragacanto, gelatina, silicato de calcio, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, celulosa, agua estéril, jarabe y metilcelulosa. La composición farmacéutica puede incluir adicionalmente agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y agentes de suspensión; agentes conservantes tales como benzoatos de metilo y propilhidroxi; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Véanse, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, edición 16, Mack Publishing Co., Easton, Pa (1980); y "The Pharmacological Basis of Therapeutics" de Goodman y Gilman, décima edición, Gilman, J. Hardman y L. Limbird, compiladores, McGraw-Hill Press, 155-173, 2001.

15 La composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, pastillas, sobres, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles y polvos envasados. La composición farmacéutica de la invención se puede administrar a través de cualquier ruta fisiológicamente aceptable. Estas rutas pueden incluir, pero no se limitan de ninguna manera a las mismas, la administración parenteral, la administración sistémica, la administración oral, la administración nasal, la administración rectal, la inyección intraperitoneal, la inyección intravascular, la inyección subcutánea, la administración transcutánea, la administración por inhalación y la inyección intramuscular. El término "parenteral" tal y como se usa en este documento, incluye la inyección subcutánea, intracutánea, intravenosa, intramuscular, intraarticular, intraarterial, intrasinoval, intraesternal, intratecal, intralesional e intracraneal o técnicas de infusión.

20 Las composiciones farmacéuticas, formuladas para usos terapéuticos, se pueden preparar para el almacenamiento mezclando un agente que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16^a edición, Osol, A. compilador (1980)), en forma de formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como albúmina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN[®], PLURONICS[®] o polietilenglicol (PEG).

25 En algunas realizaciones, el método descrito en este documento tiene por objeto el tratamiento del cáncer, tal como el cáncer de próstata. Un sujeto humano que requiere ese tratamiento puede ser un paciente que padece cáncer o que se sospecha que tiene cáncer. En algunos ejemplos, la cantidad del anticuerpo anti-IL6 descrito en este documento es eficaz para inhibir la proliferación celular inducida por IL6 en al menos un 20%, 30%, 50%, 80%, 100%, 200%, 400% o 500%, en comparación con un control en blanco. En otras realizaciones, la cantidad del anticuerpo anti-IL6 descrito en este documento es eficaz para inhibir la fosforilación de STAT3 en al menos un 20%, 30%, 50%, 80%, 100%, 200%, 400% o 500%. En algunos ejemplos, la cantidad del anticuerpo anti-IL6 descrito en este documento es eficaz para inhibir la angiogénesis inducida por IL6, la caquexia inducida por el cáncer (por ejemplo, caquexia inducida por cáncer de próstata), la metástasis del cáncer (metástasis de cáncer de próstata) o una combina-

ción de las mismas.

En otra realización, el método descrito en este documento es para el tratamiento de una enfermedad autoinmune, tal como la artritis reumatoide. En otro ejemplo, el sujeto es un paciente humano con artritis reumatoide que padece o se sospecha que tiene la enfermedad. En algún ejemplo, la cantidad del anticuerpo anti-IL6 descrito en este documento es suficiente para reducir la producción de citocinas inflamatorias tales como MCP-1 y/o sICAM, por ejemplo, en al menos un 20%, 30%, 50%, 80%, 100%, 200%, 400% o 500%.

Para el tratamiento de una enfermedad diana tal como el cáncer o la artritis reumatoide, una cantidad eficaz de la composición farmacéutica que se ha indicado anteriormente, se puede administrar a un sujeto (por ejemplo, un ser humano) que requiere el tratamiento a través de una vía adecuada. Un sujeto humano que requiere el tratamiento puede ser un paciente humano que tiene, tiene riesgo o se sospecha que tiene un trastorno asociado con IL6. Este paciente puede ser identificado mediante un examen médico de rutina.

Cualquiera de los anticuerpos anti-IL6 tal y como se describen en este documento, se puede usar en combinación con otro agente terapéutico. La expresión "en combinación" en este contexto significa que la composición de anticuerpo y el agente terapéutico se administran simultánea o secuencialmente. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir al menos un anticuerpo anti-IL6 formulado conjuntamente y/o administrado conjuntamente con al menos un agente terapéutico adicional. En una realización, el agente adicional es un agente quimioterapéutico contra el cáncer, por ejemplo, oxaliplatino, gemcitabina, docetaxel. En otra realización, el agente adicional pueden ser fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARDs), por ejemplo, metotrexato, azatioprina, cloroquina, hidroxiclороquina, ciclosporina A, sulfasalazina, para el tratamiento de la AR. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosificaciones menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias. Por otra parte, los agentes terapéuticos adicionales descritos en este documento, pueden actuar sobre vías, además de la vía IL6/IL6R/gp130 o vías distintas de la misma, y por lo tanto se espera que mejoren y/o sean sinérgicos con los efectos de los anticuerpos anti-IL6.

Cuando la composición del anticuerpo descrito en este documento se utiliza conjuntamente con un segundo agente terapéutico, una dosificación subterapéutica de, o bien la composición o el segundo agente, o una dosificación subterapéutica de ambos, se puede utilizar en el tratamiento de un sujeto que tiene o tiene riesgo de desarrollar una enfermedad o un trastorno asociado con la señalización celular mediada por IL6. Una "dosis subterapéutica" tal como se utiliza en este documento, se refiere a una dosificación que es menor que la dosificación que produciría un resultado terapéutico en el sujeto si se administra en ausencia del otro agente o agentes. Por lo tanto, la dosis subterapéutica de un agente es una que no produciría el resultado terapéutico deseado en el sujeto en ausencia de la administración del anticuerpo anti-IL6 descrito en este documento. Las dosis terapéuticas de muchos agentes que están en uso clínico son bien conocidas en el campo de la medicina y las dosis terapéuticas adicionales las pueden determinar los expertos sin una experimentación indebida. Las dosificaciones terapéuticas se han descrito extensamente en referencias tales como Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed., 1990; así como muchas otras referencias médicas relacionadas con la profesión médica, a modo de guía para el tratamiento de enfermedades y trastornos.

Los métodos convencionales, conocidos por los que tienen una experiencia ordinaria en la técnica de la medicina, se pueden usar para administrar la composición farmacéutica al sujeto, dependiendo del tipo de enfermedades que se van a tratar o del sitio de la enfermedad.

Las composiciones inyectables pueden contener diversos vehículos tales como aceites vegetales, dimetilactamida, dimetilformamida, lactato de etilo, carbonato de etilo, miristato de isopropilo, etanol y polioles (glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido y similares). Para una inyección intravenosa, los anticuerpos solubles en agua se pueden administrar mediante el método de goteo, mediante el cual se infunde una formulación farmacéutica que contiene el anticuerpo y excipientes fisiológicamente aceptables. Los excipientes fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, 5% de dextrosa, 0,9% de solución salina, solución de Ringer u otros excipientes adecuados. Las preparaciones intramusculares, por ejemplo, una formulación estéril de una forma salina soluble adecuada del anticuerpo, se pueden disolver y administrar en un excipiente farmacéutico tal como agua para inyección, 0,9% de solución salina o 5% de solución de glucosa.

Cuando uno o varios ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo anti-IL6 como ha descrito en este documento, se usan como agente terapéutico, el o los ácidos nucleicos o uno o varios vectores que expresan el anticuerpo, se pueden administrar a un sujeto por métodos, tales como los descrito en Akhtar et al., 1992, Trends Cell Bio. 2, 139. Por ejemplo, se pueden introducir en las células usando liposomas, hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables o microesferas bioadhesivas. Alternativamente, el ácido nucleico o el vector se pueden administrar localmente mediante una inyección directa o mediante el uso de una bomba de infusión. Otros enfoques incluyen el empleo de diferentes sistemas de transporte y de soporte, por ejemplo, mediante el uso de conjugados y polímeros biodegradables.

Para facilitar la entrega, cualquiera de los anticuerpos anti-IL6 o los ácidos nucleicos que los codifican se pueden conjugar con un agente de tipo chaperona. Tal y como se usa en este documento, "conjugado" significa que dos entidades están asociadas, preferentemente con suficiente afinidad para que tenga lugar el beneficio terapéutico de

la asociación entre las dos entidades. Conjugado incluye un enlace covalente o no covalente, así como otras formas de asociación, tales como el atrapamiento de una entidad sobre o dentro de la otra, o cualquiera o ambas entidades sobre o dentro de una tercera entidad (por ejemplo, una micela).

5 El agente de tipo chaperona puede ser una sustancia natural, tal como una proteína (por ejemplo, albúmina de suero humano, lipoproteína de baja densidad o globulina), un hidrato de carbono (por ejemplo, dextrano, pululano, quitina, quitosano, inulina, ciclodextrina o ácido hialurónico) o un lípido. También puede ser una molécula recombinante o sintética, tal como un polímero sintético, por ejemplo, un poliaminoácido sintético. Los ejemplos de poliaminoácidos incluyen polilisina (PLL), poli(ácido L-aspártico), poli(ácido L-glutámico), copolímero de estireno-ácido maleico anhídrido, copolímero de poli(L-lactida-co-glicolada), copolímero de éter divinílico y anhídrido maleico, copolímero de N-(2-hidroxipropil) metacrilamida (HMPA), polietilenglicol (PEG), poli(alcohol vinílico) (PVA), poliuretano, poli(ácido 2-etilacrilico), polímeros de N-isopropilacrilamida y polifosfazina.

10 En un ejemplo, el agente de tipo chaperona es una micela, liposoma, nanopartícula o microesfera, en la que el oligonucleótido/ARN de interferencia está encapsulado. Los métodos para preparar una micela, liposoma, nanopartícula o microesfera de este tipo son bien conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, los documentos de Patentes de EE.UU. 5.108.921; 5.354.844; 5.416.016; y 5.527.5285.

15 En otro ejemplo, el agente de tipo chaperona sirve como sustrato para la fijación de uno o varios agentes fusogénicos o de condensación.

20 Un agente fusogénico es sensible al pH local. Por ejemplo, después de enfrentarse con el pH dentro de un endosoma, este puede causar un cambio físico en su entorno inmediato, por ejemplo, un cambio en las propiedades osmóticas lo que rompe la membrana o aumenta la permeabilidad de la membrana del endosoma, facilitando de este modo la liberación del oligonucleótido antisentido en el citoplasma de la célula hospedadora. Un agente fusogénico preferido cambia la carga, por ejemplo, se protona a un pH más bajo que un intervalo fisiológico (por ejemplo, a un pH de 4,5-6,5). Los agentes fusogénicos pueden ser moléculas que contienen un grupo amino capaz de experimentar un cambio de carga (por ejemplo, una protonación) cuando se exponen a un intervalo de pH específico. Tales agentes fusogénicos incluyen polímeros que tienen cadenas de poliamino (por ejemplo, polietiliminina) y agentes que rompen la membrana (por ejemplo, melitina). Otros ejemplos incluyen polihistidina, poliimidazol, polipiridina, polipropiliminina y una sustancia de policetal (p. ej., un poliactal catiónico).

25 Un agente de condensación interacciona con el oligonucleótido antisentido, haciendo que se condense (por ejemplo, se reduce el tamaño del oligonucleótido), por lo que lo protege contra la degradación. Preferiblemente, el agente de condensación incluye un resto (por ejemplo, un resto cargado) que interacciona con el oligonucleótido a través de, por ejemplo, interacciones iónicas. Ejemplos de agentes de condensación incluyen polilisina, espermina, espermidina, poliamina o una sal cuaternaria de las mismas, pseudopéptido-poliamina, poliamina peptidomimética, dendrímero de poliamina, arginina, amidina, protamina, lípido catiónico, porfirina catiónica y péptido helicoidal alfa.

30 Los anticuerpos anti-IL6 descritos en este documento también se pueden emplear para detectar la presencia de IL6 en muestras biológicas. Los métodos de detección basados en anticuerpos son bien conocidos en la técnica, e incluyen, por ejemplo, ELISA, inmunotransferencias, radioinmunoensayos, inmunofluorescencia, inmunoprecipitación y otras técnicas relacionadas. Los anticuerpos pueden estar incluidos en un kit de diagnóstico que incorpora al menos uno entre otros componentes para detectar la proteína. El kit también puede contener envases, instrucciones u otro material para ayudar en la detección de la proteína y el uso del kit.

35 Los anticuerpos se pueden modificar con marcadores detectables, incluyendo grupos de ligandos (por ejemplo, biotina), radioisótopos, fluoróforos o enzimas. Las enzimas se detectan por su actividad. Por ejemplo, la peroxidasa de rábano picante se detecta por su capacidad para convertir el sustrato tetrametilbencidina (TMB) en un pigmento azul, que es cuantificable con un espectrofotómetro. Los anticuerpos también se pueden ligar funcionalmente (por ejemplo, mediante fusión genética, acoplamiento químico, asociación no covalente o de otro modo) a al menos otra molécula, tal como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico), agentes citotóxicos o citostáticos, toxinas, radioisótopos y similares.

Kits

40 La presente descripción también proporciona kits para uso en el tratamiento de enfermedades asociadas con la IL6. Tales kits pueden incluir uno o varios recipientes que comprenden un anticuerpo anti-IL6 (por ejemplo, 1-4-62, Ag1-4-6 y HAG1T-3-10) o el ácido nucleico que lo codifica.

45 En algunas realizaciones, el kit puede comprender las instrucciones para el uso de acuerdo con cualquiera de los métodos descritos en este documento. Las instrucciones incluidas pueden comprender una descripción de la administración del anticuerpo anti-IL6 para tratar, retrasar la aparición o aliviar una enfermedad asociada con IL6, tal como el cáncer (por ejemplo, cáncer de próstata) o una enfermedad autoinmune (por ejemplo, AR) de acuerdo con cualquier de los métodos descritos en este documento. El kit puede comprender además una descripción de la selección de un individuo adecuado para el tratamiento basándose en la identificación de si ese individuo tiene la enfermedad. En todavía otras realizaciones, las instrucciones comprenden una descripción de la administración de un

anticuerpo anti-IL6 a un individuo que tiene riesgo de contraer la enfermedad.

Las instrucciones relativas a la utilización de un anticuerpo anti-IL6 generalmente incluyen una información en cuanto a la dosificación, pauta de dosificación y vía de administración para el tratamiento pretendido. Los recipientes pueden ser dosis unitarias, envases a granel (por ejemplo, paquetes de múltiples dosis) o dosis de subunidades. Las instrucciones suministradas en los kits de la invención son normalmente instrucciones escritas en una etiqueta o un prospecto (por ejemplo, una hoja de papel incluida en el kit), pero unas instrucciones de lectura mecánica (por ejemplo, instrucciones incluidas en un disco de almacenamiento magnético u óptico) son también aceptables.

La etiqueta o el prospecto indican que la composición se utiliza para tratar, retardar la aparición y/o aliviar la fibrosis hepática o la cirrosis. Las instrucciones se pueden proporcionar para la puesta en práctica de cualquiera de los métodos descritos en este documento.

Los kits de esta invención están en un envase adecuado. Los envases adecuados incluyen, pero no se limitan a, viales, botellas, botes, envases flexibles (por ejemplo, Mylar sellado o bolsas de plástico) y similares. También se contemplan envases para uso en combinación con un dispositivo específico, como un inhalador, un dispositivo de administración nasal (por ejemplo, un atomizador) o un dispositivo de infusión tal como una minibomba. Un kit puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable con una aguja de inyección hipodérmica). El recipiente también puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es un anticuerpo anti-IL6.

Cualquiera de los kits descritos en este documento puede incluir además un agente terapéutico adicional, tal como un fármaco anticancerígeno (por ejemplo, oxaliplatino, gemcitabina o docetaxel) o un DMARD (por ejemplo, metotrexato, azatioprina, cloroquina, hidroxicloroquina, ciclosporina A o sulfasalazina).

Los kits pueden proporcionar opcionalmente componentes adicionales tales como tampones y una información interpretativa. Normalmente, el kit comprende un recipiente y una etiqueta o prospectos, sobre el recipiente o asociado con el mismo. En algunas realizaciones, la invención proporciona artículos manufacturados que comprenden contenidos de los kits descritos anteriormente.

Sin una explicación adicional, se cree que un experto en la técnica, basándose en la descripción anterior, puede utilizar la presente invención en su extensión más amplia. Las siguientes realizaciones específicas, por lo tanto, se deben interpretar como meramente ilustrativas y no limitativas del resto de la descripción en modo alguno. Todas las publicaciones citadas en este documento se incorporan como referencia para los fines o la materia a la que se hace referencia en este documento.

Ejemplo 1: Identificación de anticuerpos de alta afinidad que se unen a IL6 humana

Un banco de scFvs intactos humanos presentados en fagos se construyó del modo siguiente para la identificación de anticuerpos humanos de alta afinidad capaces de unirse a IL6 humana.

Los ARNm se aislaron a partir de linfocitos de sangre periférica de 151 donantes sanos y los ADNc se sintetizaron a partir de los mismos mediante la transcriptasa inversa M-MuLV (Fermentas) usando cebadores de oligo dT. Los genes de V_H y V_L se amplificaron, se ensamblaron y se ligaron en un vector fagémido mediante protocolos convencionales con algunas modificaciones. Los productos ligados se introdujeron en células TG1 de *E. coli* mediante electroporación. Posteriormente, se recuperaron las células de *E. coli* y se incubaron en el medio 2YT que contenía 100 mg/ml de ampicilina y 2% de glucosa. Se añadieron al cultivo partículas de fago asistente M13KO7 para generar partículas de fago-scFv, produciendo de este modo un banco de scFvs. La diversidad del banco se determinó mediante la secuenciación de más de 1000 clones.

El banco de scFv se sometió a cuatro rondas de bioselección del modo siguiente. Los pocillos se recubrieron con IL6 recombinante en tampón NaHCO_3 0,1 M a 4°C durante la noche y después se aclararon dos veces con 300 μl de solución salina tamponada con fosfato (PBS). Los pocillos se bloquearon con 1% de albúmina de suero bovino (BSA) en PBS durante 1 h a 37°C; se añadieron 100 μl de las partículas de fago (2×10^{11} pfu) en PBS que contenía 1% de BSA y se sacudió durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Los pocillos se lavaron después 6 veces con 300 μl de 0,5% (p/v) de Tween 20/PBS. Los fagos unidos se eluyeron y se amplificaron mediante una infección en *E. coli* TG1. Las células infectadas se recuperaron mediante M13KO7. Las partículas de fago resultantes se concentraron mediante precipitación con PEG y se utilizaron para la siguiente ronda de bioselección.

En las rondas cuarta y quinta de la bioselección, los clones de los fagos se examinaron mediante una selección con ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) para estudiar sus especificidades de unión a antígeno. Las placas de ELISA se recubrieron con IL6 humana recombinante o BSA a 2 $\mu\text{g/ml}$ en tampón NaHCO_3 0,1 M a 4°C durante la noche. Después de lavar con PBS, los pocillos se bloquearon con 1% (p/v) de BSA en PBS durante 1 h a TA. Los clones de los fagos y los fragmentos de scFv se añadieron a las placas, que se incubaron durante 1 h a TA. Las placas se lavaron con PBS que contenía 0,1% (v/v) de Tween 20 y después se sondearon con IgG de cabra

anti-humana marcada con HRP (KPL) diluida 1:10.000 en 1% de BSA-PBS durante 40 min a TA. Las placas se lavaron de nuevo y se añadió una solución de sustrato 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) para que se desarrolle color. A continuación se añadió la solución de parada (H₂SO₄ 1 M) y se cuantificó la absorción a 450 nm usando un fotómetro de placas automático (Bio-Rad).

- 5 Después de cuatro rondas de bioselección, se identificaron más de ocho cientos clones de fagos que eran capaces de unirse a la rhlL6 mediante el ensayo ELISA descrito anteriormente. Se seleccionaron 29 clones de fagos para analizar la secuencia para determinar las secuencias de V_H V_L que codificaban anticuerpos anti-IL6. Se identificó una serie de clones únicos; cuya actividad de unión y especificidad se determinaron mediante un ensayo ELISA comparativo.
- 10 Un clon del fago parental identificado a partir de los procedimientos de bioselección descritos anteriormente, el clon 1-4-62, se seleccionó para una maduración por afinidad para producir anticuerpos anti-IL6 de alta afinidad a través de la construcción mediante una mutagénesis dirigida al sitio, de bancos aleatorizados de anticuerpos en fagos de CDRs de V_L/V_H, conteniendo cada uno más de 0,9 x 10⁹ variantes de anticuerpos. Los bancos se construyeron utilizando cebadores directos de V_L y V_H que contenían secuencias al azar en las regiones de CDRs basadas en las
- 15 secuencias de V_L y V_H del clon 1-4-62, siguiendo los protocolos convencionales a continuación. Los bancos aleatorizados de CDRs se sometieron a los procedimientos de bioselección, en condiciones muy rigurosas, como se describe en este documento, y al menos dos clones de alta afinidad, Ag1-4-6 (FB704) y Hag1T-3-10 fueron identificados por tener actividades de unión más elevadas en relación con el clon parental.

20 Las regiones determinantes de complementariedad 1-3 (CDR 1-3) y las regiones estructurales 1-4 (FW1-4) para ambos dominios V_H y V_L para los tres anticuerpos anti-IL6, 1-4-62, Ag1-4-6 y Hag1T-3-10, se proporcionan en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1. Secuencias de aminoácidos de los dominios V_H y V_L para los anticuerpos anti-IL6

Dominio V_H				
	FW1	CDR1	FW2	CDR2
1-4-62	EVQLVESGPALVKPTQT LTLTCTFSGFSL (SEQ ID NO: 1)	TGGMSVS (SEQ ID NO: 2)	WIRQPPGKALEWL A (SEQ ID NO: 3)	RIDWDDDKFYTPS LKT (SEQ ID NO: 4)
Ag1-4-6	EVQLVESGPALVKPTQT LTLTCTFSGFSL (SEQ ID NO: 1)	TGGMSVS (SEQ ID NO: 2)	WIRQPPGKALEWL A (SEQ ID NO: 3)	RIDWDDDKFYTPS LKT (SEQ ID NO: 4)
HAg1T-3-10	EVQLVESGPALVKPTQT LTLTCTFSGFSL (SEQ ID NO: 1)	TGGMSVS (SEQ ID NO: 2)	WIRQPPGKALEWL A (SEQ ID NO: 3)	RIDWDDDKFYTPS LKT (SEQ ID NO: 4)
	FW3	CDR3	FW4	
1-4-62	RLTISRDTSKNQVVLIMIT NMDPVDATYYGAR (SEQ ID NO: 5)	MHIDDSNGYSDAF HI (SEQ ID NO: 6)	WGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 7)	
Ag1-4-6	RLTISRDTSKNQVVLIMIT NMDPVDATYYGAR (SEQ ID NO: 5)	MHIDDSNGYSDAF HI (SEQ ID NO: 6)	WGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 7)	
HAg1T-3-10	RLTISRDTSKNQVVLIMIT NMDPVDATYYGAR (SEQ ID NO: 5)	MHIDDSNGYSDAF HI (SEQ ID NO: 16)	WGQGTMTVSS (SEQ ID NO: 7)	
Dominio V_L				
	FW1	CDR1	FW2	CDR2
1-4-62	EIVLTQSPATLSVSPGER VTLS (SEQ ID NO: 8)	RDSQSVSSTSLA (SEQ ID NO: 9)	WYQQKSGQAPRLL IY (SEQ ID NO: 10)	DTSNRAT (SEQ ID NO: 11)
Ag1-4-6	EIVLTQSPATLSVSPGER VTLS (SEQ ID NO: 8)	RDSQSVSSTSLA (SEQ ID NO: 9)	WYQQKSGQAPRLL IY (SEQ ID NO: 10)	DTSNRAT (SEQ ID NO: 11)

Dominio V _L				
	FW1	CDR1	FW2	CDR2
HAg1T-3-10	EIVLTQSPATLSVSPGER VTLSG (SEQ ID NO: 8)	RDSQSVSSTSLA (SEQ ID NO: 9)	WYQQKSGQAPRL LY (SEQ ID NO: 10)	DTSNRAT (SEQ ID NO: 11)
	FW3	CDR3	FW4	
1-4-62	GIPARFSGGGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 12)	LVRNNWPPRFT (SEQ ID NO: 13)	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)	
Ag1-4-6	GIPARFSGGGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 12)	SFVSRPYPRFT (SEQ ID NO: 15)	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)	
HAg1T-3-10	GIPARFSGGGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYC (SEQ ID NO: 12)	SFVSRPYPRFT (SEQ ID NO: 15)	FGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 14)	

Ejemplo 2: Caracterización de los anticuerpos de alta afinidad que se unen a IL6 humana

Materiales y métodos

(i) Líneas celulares y anticuerpos

- 5 Las células de mieloma humano, la línea celular U266 (BCRC 60437), se obtuvieron a partir de “Bioresource Collection and Research Center” (BCRC) en Taiwán y se cultivaron en medio RPMI 1640 (Biowet) complementado con 10% de suero bovino fetal.

El hibridoma de linfocitos B dependiente de IL6, B9, se cultivó en RPMI 1640 complementado con 5% de suero bovino fetal, más 50 pg/ml de IL6 humana recombinante.

- 10 Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs) fueron adquiridas en Lonza y se cultivaron en placa de Petri recubierta con gelatina en medio EGMTM-2 singleQuots® (Lonza).

Las células productoras de IgG, la línea celular FreeStyle® CHO (Invitrogen), se cultivaron en medio de expresión de FreeStyle® CHO (Invitrogen) con L-glutamina 8 mM.

La línea celular Flp-in CHO (Invitrogen) se cultivó en F12 de Ham (Invitrogen) con 10% de suero bovino fetal.

- 15 Un anticuerpo anti-IL6 de control, BE8, se adquirió en Diaclone. Actemra, un fármaco a base de anticuerpos (anticuerpos anti-IL6), aprobado por la “Food and Drug Administration” de Estados Unidos (FDA) para el tratamiento de la artritis reumatoide, se adquirió en la Universitätsklinikum de Heidelberg, Alemania. El nucleótido de IgG1 humana se adquirió en Sigma.

(ii) Producción de anticuerpos de IgG1 anti-IL6 totalmente humanos

- 20 Cuatro vectores expresados (pA01-kappa, pA02-gamma, p2CMV intermedio y pcDNAFRT modificado) se construyeron para la producción de IgG humana en células de mamífero. El gen completo de la cadena ligera (que contenía una región constante Kappa) y el gen completo de la cadena pesada (que contenía una región constante gamma) que codificaban anticuerpos candidatos anti-IL6, se clonaron desde pcANTAB5E en pA01-Kappa y pA02-Gamma por separado, para la expresión transitoria del anticuerpo. Estos vectores de expresión se introdujeron en células
- 25 FreeStyle® CHO-S mediante el reactivo GenJet® Plus (SignalGen).

- Los genes completos de la cadena ligera y la cadena pesada se clonaron primero en el vector p2CMV intermedio y después se clonaron en un vector de expresión único pcDNAFRT modificado para la expresión estable del anticuerpo. El vector pcDNAFRT se transfeció en células CHO mediante el reactivo GenJet® Plus y los clones positivos se seleccionaron con higromicina B (Invitrogen) para una expresión durante un período de tiempo más largo. El material sobrenadante del cultivo se recogió y se purificó con MabSelect SuRe y columnas de proteína A (GE Healthcare).
- 30

(iii) Análisis de la unión y la competencia

Se realizaron un ELISA y una transferencia Western para examinar la actividad de la unión de los anticuerpos IgG humanos anti-IL6. Brevemente, las placas se recubrieron con IL6 recombinante humana (R&D Systems) a 2 µg/ml. Después de lavar con PBS, los pocillos se bloquearon con 1% (p/v) de BSA en PBS durante 1 h a TA. Los anticuerpos anti-IL6 purificados en diluciones en serie (partiendo de una concentración de 2 µg/ml) se colocaron en los pocillos y se incubaron a TA durante 1 h. La placa se lavó con PBS que contenía 0,1% (p/v) de Tween 20 y después se aplicó una sonda de IgG de cabra anti-humana marcada con HRP (KPL), que se diluyó 1:10.000 en 1% de BSA-PBS, durante 40 min a TA. La placa se lavó de nuevo y se añadió una solución de sustrato TMB para que se desarrollara color. Después, se añadió una solución de parada (H₂SO₄ 1 M) y se cuantificó la absorción a 450 nm usando un fotómetro de placas automático (Bio-Rad).

La proteína IL6 recombinante se hirvió en 5X tampón de muestra reductor (Tris-HCl 0,15 M, pH 6,8, 50% de glicerol, 10% de SDS, 2-mercaptoetanol 0,71 M, 0,095% de azul de bromofenol) durante 10 min y se sometió a SDS-PAGE (Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron después a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) y se sometieron a inmunotransferencia con los anticuerpos anti-IL6 completamente humanos descritos en este documento. Después de incubar con anticuerpo de cabra anti-conejo marcado con HRP (Thermo) o anticuerpo de cabra anti-ratón marcado con HRP (KPL), las membranas se revelaron mediante un aumento de la quimioluminiscencia (GE Healthcare).

Las placas se recubrieron con receptor-α de IL6 humana recombinante (R&D Systems) a 2 µg/ml en tampón NaHCO₃ 0,1 M a 4°C durante la noche. Después de lavar con PBS, los pocillos se bloquearon con 1% (p/v) de BSA en PBS durante 1 h a TA. Los anticuerpos anti-IL6 purificados en diluciones dobles seriadas con una concentración inicial de 2 µg/ml, se preincubaron con rhIL6 (0,5 µg/ml) a TA durante 1 h. Las mezclas se la colocaron después en la placa y se incubaron a TA durante 1 h. La placa se lavó con PBS que contenía 0,1% (v/v) de Tween 20 y después se aplicó una sonda de IgG2a de ratón anti-IL6 humana (Abcam) diluida 1:2000 en 1% de BSA-PBS durante 1 h a TA. La placa se lavó y luego se aplicó una sonda de IgG de cabra anti-ratón marcada con HRP (Thermo) diluida 1:10.000 en 1% de BSA-PBS durante 40 min a TA. La placa se lavó de nuevo y se añadió una solución de sustrato TMB para que se desarrollara el color. La solución de parada (H₂SO₄ 1 M) se añadió a continuación y se cuantificó la absorción a 450 nm usando un fotómetro de placas automático.

(iv) Ensayo de la transducción de la señalización celular

Las células U266 (1 x 10⁶/ml) se lavaron dos veces con RPMI 1640 exento de suero y se cultivaron durante 2 h en ausencia de suero bovino fetal y factores de crecimiento. Las células se estimularon con rhIL6 (5 ng/ml) durante 30 min a 37°C y a continuación se trataron con o sin anticuerpos anti-IL6. Las células se lavaron con PBS enfriado con hielo y después se lisaron en tampón RIPA (Thermo) complementado con inhibidor de proteasa y fosfatasa (Roche). El análisis por transferencia Western se realizó usando anticuerpos anti-pSTAT3 y anti-STAT3 (Cell Signaling Technology). Después de incubar con anticuerpo de cabra anti-conejo marcado con HRP (Thermo) o de cabra anti-ratón marcado con HRP (Thermo), las membranas se revelaron mediante un aumento de la quimioluminiscencia (GE Healthcare).

(v) Ensayo de la proliferación celular

Las células B9 murinas (5 x 10⁴/ml) se sembraron en placas de 96 pocillos y se incubaron con rhIL6 (10 pg/ml). El receptor de IL6 de células B9 murinas se podía estimular con IL6 humana. Los anticuerpos anti-IL6 con varias concentraciones o anticuerpos de IgG de control, se colocaron en los pocillos. Las células se cultivaron a 37°C durante 72 h. La viabilidad celular se detectó mediante un ensayo de tetrazolio soluble en agua (WST-1) (Roche) según las instrucciones del fabricante. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

(vi) Análisis Biacore

La afinidad de la unión de IgG se midió utilizando un kit de captura de anticuerpos humanos (GE Healthcare) en un sistema BIAcore T200 (GE Healthcare). La IgG de ratón anti-humana se inmovilizó sobre un chip sensor CM5 a través de acoplamiento con amina. Aproximadamente 700 UR de IgG anti-IL6 purificada en tampón HBS-EP+ se capturaron sobre la superficie inmovilizada. Se inyectó la IL6 humana recombinante (R&D Systems) con concentraciones que oscilaban desde 25,6 nM a 0,4 nM en tampón HBS-EP+ durante 2 minutos, usando un caudal de 30 µl/min. La disociación del antígeno unido en el flujo del tampón HBS-EP+ siguió durante 7 minutos. Las superficies con IgG se regeneraron después de cada ciclo empleando una solución de regeneración (MgCl₂ 3 M). La constante de disociación (KD) se calculó como kd/ka.

(vii) Análisis de la especificidad

Las placas se recubrieron con IL-3 humana recombinante, IL4, IL5, IL6, IL11, IL17A, CNTF, OSM, IGF-1 (R&D Systems), IL2, FGF (Prospec), VEGF, TNF-α, EGF (Peprotech) a 2 µg/ml en tampón NaHCO₃ 0,1 M a 4°C durante la noche. Después de lavar con PBS, los pocillos se bloquearon con 1% (p/v) de BSA en PBS a TA durante 1 h. Los anticuerpos anti-IL6 purificados diluidos cuatro veces en serie, con una concentración inicial de 2 µg/ml, se colocaron en los pocillos y se incubaron a TA durante 1 h. La placa se lavó en PBS que contenía 0,1% (p/v) de Tween 20 y después se aplicó una sonda de IgG de cabra anti-humana marcada con HRP (KPL) diluida 1:10.000 en 1% de BSA-PBS durante 40 min a TA. La placa se lavó de nuevo y se añadió una solución de sustrato TMB para que se

desarrollara el color. La solución de parada (H_2SO_4 1 M) se añadió entonces y se cuantificó la absorción a 450 nm usando VERSA max (Molecular Devices).

Resultados

(a) Actividad de la unión de anticuerpos IgG anti-IL6

- 5 Para explorar la especificidad de la unión de los anticuerpos anti-IL6, los genes de V_H y V_L que codificaban los clones de scFv seleccionados, se fusionaron con genes de la región constante kappa y gamma para producir anticuerpos IgG1 humanos completos, como se ha descrito en este documento. Ensayos ELISA y de transferencia Western mostraron que los anticuerpos anti-IL6 podían unirse a la proteína IL6 humana recombinante y mostraban una actividad neutralizante de una manera dependiente de la dosis.
- 10 El análisis BIAcore mostraba que el promedio de las constantes de la tasa de asociación (k_a) de los clones Ag1-4-6 y HAg1T-3-10 mejoraba de $4,38 \times 10^{-5}$ a $2,24 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, en comparación con el clon parental 1-4-62. Las constantes de la tasa de disociación (k_d) mejoraron desde $1,66 \times 10^{-3}$ a $6 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$. Las constantes de equilibrio de la disociación (KD) mejoraron desde 3,85 hasta 0,27 nM. Véase la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Constantes de la tasa de asociación (k_a) y constantes de disociación (k_d) de los anticuerpos anti-IL6

Anticuerpo	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	KD (nM)
1-4-62	4,38E+05	1,66E-03	3,85
Ag1-4-6	1,61E+06	1,21E-03	0,75
HAg1T-3-10	2,24E+06	6,00E-04	0,27

15

(b) Especificidad de la unión de los anticuerpos anti-IL6

- Un ensayo ELISA como se ha descrito en este documento, se realizó para confirmar la especificidad de la unión de los anticuerpos anti-IL6 de alta afinidad descritos en este documento. Brevemente, las placas se recubrieron con diferentes citocinas como se indica en la Figura 3A (citocinas de la familia de IL6) y la Figura 3B (citocinas que no son de la familia de IL6) y se examinaron las actividades de unión del clon del anticuerpo FB704 (es decir, Ag1-4-6) con esas citocinas. FB704 mostraba una actividad de unión elevada con la proteína IL6 humana pero no con otras citocinas (Figuras 3A y 3B), lo que indica la especificidad de su unión a IL6 humana.
- 20

(c) Inhibición de la vía de señalización dependiente de IL6 y la proliferación celular mediante anticuerpos anti-IL6

- Se utilizaron células U266 de mieloma múltiple humano para examinar el efecto de los anticuerpos anti-IL6 sobre la cascada de señalización inducida con IL6. Las células U266 se cultivaron en presencia o ausencia de anticuerpos, junto con rhIL6. Después de 30 minutos, se recogieron los lisados de células completas y se realizó un análisis de transferencia Western para examinar la proteína STAT3 fosforilada (P-STAT3), que es un importante factor de transcripción implicado en la vía de señalización de IL6. La expresión de la proteína P-STAT3 se inhibía con los anticuerpos anti-IL6 de alta afinidad, Ag1-4-6 y HAg1T-3-10, a un nivel superior al de Actemra, un anticuerpo humanizado anti-receptor de IL6 se utilizó como control. (Figuras 1A y 1B). Los niveles de inhibición de la fosforilación de STAT3 a través de los anticuerpos, se muestran en la Tabla 3 a continuación:
- 25
- 30

Tabla 3. Niveles de inhibición de la fosforilación de STAT3 mediante anticuerpos anti-IL6

Porcentaje de inhibición de control con diferentes concentraciones de Ac	0,05 $\mu\text{g/ml}$	0,5 $\mu\text{g/ml}$
1-4-62	0	8
Ag1-4-6	0	60
HAg1T-3-10	49	93
Actemra	0	17

- Además, para examinar la actividad de los anticuerpos sobre la proliferación celular, se cultivaron células de hibridoma murino B9 dependientes de IL6 en presencia de anticuerpos anti-IL6 o anti-IL6R, así como un anticuerpo de control del isotipo a diversas concentraciones. El impacto sobre la proliferación celular se evaluó mediante un ensayo WST-1 (Roche) después de 72 horas. Como se muestra en la Figura 1C, los anticuerpos anti-IL6 totalmente humanos 1-4-62, Ag1-4-6 y HAg1T-3-10 inhibían la proliferación de las células B9 de una manera dependiente de la dosis y los valores de CI_{50} de 1-4-62, Ag1-4-6 y HAg1T-3-10 eran 0,618, 0,0468 y 0,00456 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente.
- 35

Ejemplo 3: Eficacia de los anticuerpos anti-IL6 de alta afinidad en el tratamiento del cáncer

Materiales y métodos

(i) Animales

5 Ratones NOD/SCID machos (7-8 semanas de edad) fueron adquiridos en BioLASCO Taiwan Co., Ltd (Taipéi, Taiwán) para todos los experimentos. Los ratones se mantuvieron en jaulas estériles ventiladas individualmente (IVC) a 20°C y se aclimataron a las instalaciones de alojamiento al menos 7 días antes de que se iniciaran los experimentos.

(ii) Ensayo con Matrigel de la angiogénesis

10 El Matrigel líquido (BD Biosciences) se mantuvo a 4°C. La proteína recombinante hIL6 (R&D Systems) se añadió al Matrigel hasta una concentración final de 100 ng/0,5 ml. Los ratones fueron anestesiados con Avertin (0,2 ml/10 g, inyección i.p.) y se inyectó en dos sitios del lado dorsal con 0,5 ml de Matrigel. A continuación, se trató a los ratones con anticuerpos de IgG anti-IL6 o un anticuerpo de IgG de control a través de una inyección intravenosa. El día 6, los ratones fueron sacrificados mediante asfixia con CO₂. Se retiraron los implantes de Matrigel, se pesaron y se fotografiaron. Para medir los niveles de hemoglobina, el implante de Matrigel se lisó con un tampón de lisis (1% de SDS, 0,5% de Triton en PBS) durante la noche a 4°C. El contenido en hemoglobina de los implantes se cuantificó usando el reactivo de Drabkin (Sigma). Las concentraciones de hemoglobina en los implantes se determinaron usando una curva estándar de hemoglobina bovina (Sigma). Los contenidos en hemoglobina se indicaron como microgramos de hemoglobina por gramo de Matrigel. Las medias + SD se calcularon utilizando la prueba t de Student no pareada; p <0,05 se consideró como estadísticamente significativo.

(iii) Ensayo de metástasis tumoral PC3 en la próstata utilizando un modelo de implantación intraesplénica

20 Los ratones se anestesiaron con Avertin (0,2 ml/10 g) y se les afeitó el flanco izquierdo. A continuación se colocaron en posición decúbito lateral derecho y se frotaron con alcohol al 75% en el flanco izquierdo. En la piel de la pared abdominal se realizó una incisión longitudinal (paralela a la columna vertebral) de 1 cm. El bazo se exteriorizó y se estabilizó con suavidad. Una aguja de calibre 30 en una jeringa de insulina se insertó 3-4 mm en el parénquima del bazo. Se inyectaron lentamente 50 µl de una suspensión de células PC-3. Una roncha pálida visible indicaba una inyección exitosa. A continuación, la aguja se retiró y se colocó una pequeña bola de algodón para cubrir el sitio de la inyección durante 30 segundos para evitar el sangrado y el derrame de la suspensión celular. El bazo se colocó de nuevo en el peritoneo. La pared abdominal se cerró con una sutura con nailon 6-0, y la piel se cerró con una sutura con nailon 4-0.

30 Después de la implantación, los ratones fueron asignados aleatoriamente a diferentes grupos de tratamiento (grupo de Docetaxel, grupo de Docetaxel más anticuerpos anti-IL6 y grupo de control con PBS) y se trataron con dosis múltiples de anticuerpo anti-IL6 (20 mg/kg cada vez, dos veces a la semana), Docetaxel (3 mg/kg cada vez, una vez a la semana) a través de la vena de la cola o mediante inyección i.p. Los pesos corporales de los ratones se midieron dos veces a la semana.

35 Todos los ratones fueron sacrificados mediante asfixia con CO₂ y se determinaron los pesos corporales. Los tumores primarios en el bazo y el hígado se extirparon, se fotografiaron y se pesaron. El índice de órganos se expresó como miligramo de órgano por gramo de ratón. Las medias + SD se calcularon utilizando la prueba t de Student. Como ensayo de supervivencia se utilizó el análisis de Kaplan-Meier. Se preparó una sección embebida en parafina o congelada de las masas tumorales y se tiñó con anti-CD31 y Ki-67 más una tinción con hematoxilina para el análisis.

(iv) Modelo con xenoinjerto de tumor pancreático humano

40 Células tumorales pancreáticas humanas BxPC-3 y MiaPaCa se resuspendieron en PBS y se inyectaron por vía subcutánea (s.c.) (5 x 10⁶ células, volumen total 0,15 ml) en el flanco derecho de los ratones. Después de 10 días, los ratones fueron asignados aleatoriamente a diferentes grupos de tratamiento (grupos de anticuerpo FB704, oxaliplatino, FB704 más oxaliplatino, gemcitabina y control con PBS) y se trataron con dosis múltiples de FB704 (20 mg/kg cada vez, dos veces a la semana) u oxaliplatino (3 mg/kg cada vez, una vez a la semana) o gemcitabina (80 mg/kg cada vez, dos veces a la semana) a través de la vena de la cola o mediante inyección i.p. Los pesos corporales de los ratones y los tamaños de los tumores se midieron dos veces a la semana. Los tamaños de los tumores se midieron usando un calibrador y el volumen del tumor se calculó por la longitud x anchura² x 0,52. Después del experimento, todos los ratones se sacrificaron, se recogieron muestras de sangre de los ratones y las masas tumorales se retiraron y ponderaron. Las diferencias en los valores medios de volumen del tumor y peso del tumor se evaluaron mediante la prueba t de Student. Secciones embebidas en parafina o congeladas de masas tumorales se prepararon y se tiñeron mediante anti-CD31, Ki67 o TUNEL más tinción con H&E para el análisis.

Resultados

(i) FB704 inhibe la angiogénesis *in vivo* en un ensayo con Matrigel

La capacidad anti-angiogénica de FB704 se examinó en un modelo de Matrigel *in vivo* como se ha descrito en este

documento. Seis días después del tratamiento, los ratones fueron sacrificados y se midieron las concentraciones de hemoglobina. Había una diferencia observable en el color y la densidad de los vasos en los implantes de Matrigel extirpados de los grupos tratados con FB704 (Figura 4A), lo que indicaba una actividad anti-angiogénica del anticuerpo. El tratamiento con FB704 también reducía significativamente las concentraciones de hemoglobina en comparación con hIL6. (Figura 4B).

(ii) FB704 inhibe la caquexia inducida con células PC-3 de cáncer de próstata humano y la metástasis

Para verificar la eficacia de FB704 sobre la caquexia inducida con cáncer y la metástasis, a los ratones se les implantaron células PC-3 de cáncer de próstata humano ($1,0 \times 10^6$ por ratón) mediante inyección intraesplénica. El día 1, los ratones fueron asignados al azar en 4 grupos ($n = 12-15$). Se administró una dosis alta (20 mg/kg) y baja (5 mg/kg) de FB704, control positivo Actemra (20 mg/kg) y PBS a través de inyección i.v. (intravenosa) dos veces a la semana. El día 31 después de la implantación de las células PC-3, los pesos corporales totales de los ratones tratados con PBS se reducían aproximadamente un 19%. Por el contrario, los pesos corporales totales de los grupos tratados con FB704 y Actemra en dosis altas se mantenían estables, lo que es significativamente diferente en comparación con los grupos de control (Figura 5A; $P < 0,01$).

Además, después de un período de latencia de días, los ratones portadores de tumores PC3 desarrollaron una parálisis de la pata trasera o síntomas adicionales de dispersión tumoral diseminada. Inyecciones repetidas entre los vasos de FB704 ($P = 0,0001$) y Actemra ($P = 0,024$) prolongaban significativamente la supervivencia exenta de síntomas de los ratones portadores de tumores PC3, en donde FB704 mostraba una eficacia significativamente mejor que Actemra ($P = 0,03$) (Figura 5B). Una autopsia macroscópica del grupo tratado con PBS, mostraba un alargamiento grave e infiltración de células tumorales en el hígado. Por el contrario, el grupo tratado con FB704 mostraba una infiltración moderada de células tumorales y más de un 50% de hepatocitos normales en los lóbulos izquierdo y medio del hígado (Figura 5C).

La angiogénesis también desempeña un papel importante en la metástasis tumoral. Se realizó una inmunohistoquímica para verificar la densidad de los vasos en secciones tumorales. La tinción de CD31 (el marcador de la angiogénesis) mostraba que la angiogénesis en el grupo tratado con FB704 se reducía significativamente en comparación con el grupo de control tratado con PBS (Figura 5D y 5E).

Además, un tratamiento combinado de FB704 y el quimiofármaco docetaxel proporcionaban mejores tasas de supervivencia global (Figura 5F).

(iii) FB704 potencia la actividad antitumoral de oxaliplatino o gemcitabina en el modelo de xenoinjerto de carcinoma de páncreas

FB704 potenciaba la actividad antitumoral de oxaliplatino o gemcitabina en un modelo de cáncer pancreático humano. El tratamiento de ratones portadores de un tumor BxPC-3 con 20 mg/kg de FB704 dos veces a la semana, más oxaliplatino (3 mg/kg) una vez a la semana y gemcitabina (80 mg/kg) dos veces a la semana, dio como resultado una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa, del 49% y 60%, respectivamente ($P < 0,01$) (Figura 6A y 6G). El peso corporal del ratón había aumentado normalmente (Figura 6B). Los pesos de las masas tumorales se redujeron significativamente después de los tratamientos (Figura 6C y 6D).

Un anticuerpo específico de Ki-67, que es un marcador de la proliferación celular, se utilizó para examinar las tasas de proliferación de células tumorales en los tejidos tumorales de cada grupo. Los porcentajes de células positivas para Ki-67 en los grupos tratados con PBS, oxaliplatino, FB704 y FB704 más oxaliplatino eran de 26%, 14%, 16% y 7,5%, respectivamente (Figuras 6E y 6F), lo que indica que los tratamientos combinados de FB704 y oxaliplatino o gemcitabina proporcionaban una inhibición mejorada de la proliferación de células tumorales pancreáticas *in vivo*.

FB704 también mostraba beneficios sinérgicos con la gemcitabina en un modelo de cáncer de páncreas. El tratamiento de ratones portadores de tumores BxPC-3 con 20 mg/kg de FB704 y 80 mg/kg de gemcitabina dos veces a la semana, daba como resultado una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa ($P < 0,01$) (Figura 6G).

Ejemplo 4: Eficacia de los anticuerpos anti-IL6 de alta afinidad en el tratamiento de la artritis reumatoide

En un paciente con AR, una producción elevada de quimiocinas tales como MCP-1 se ha observado en las articulaciones, lo que sugiere la implicación de quimiocinas en la patogénesis de la AR. La molécula de adhesión, sICAM-1 también desempeña un papel importante en la infiltración de células inflamatorias en el tejido lesionado. Las células HUVEC expresan de manera natural sICAM-1 en la superficie celular. Un tratamiento con IL6 más sIL6R inducía la expresión de sICAM-1.

(i) *Los anticuerpos anti-IL6 inhibían la producción de MCP-1 y sICAM-1 en las células HUVEC*

Para examinar la eficacia de los anticuerpos anti-IL6 descritos en este documento en el tratamiento de la artritis reumatoide (AR), se midió la secreción de proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y sICAM-1 en las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVECs) después de un tratamiento con anticuerpos, del modo siguiente.

Las células HUVEC se sembraron en una placa de 48 pocillos con una densidad de 2×10^5 células/ml. Las células se trataron con una combinación de IL6 humana recombinante, receptor α de IL6 (R&D Systems) con o sin anticuerpos anti-IL6, a diversas concentraciones o el anticuerpo IgG de control a 37°C durante 24 h. Se recogió el material sobrenadante de cultivos exentos de células y se analizó la presencia de MCP-1 y sICAM-1 mediante ELISA (Ray-Biotech)

Este ensayo *in vitro* indicaba que IL6 más sIL6R α inducían la expresión de MCP-1 y sICAM-1 en las HUVECs. Los anticuerpos Ag1-4-6 y HAgt1T-3-10 inhibían MCP-1 (Figura 2A) y sICAM-1 (Figura 2B) inducidas con IL6 más sIL6R α , de una manera dependiente de la dosis. La eficacia de la inhibición era mayor que la de Actemra.

(ii) Los anticuerpos anti-IL6 inhibían la producción de MCP-1 en células U937 y células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC)

MCP-1 es una pequeña citocina que pertenece a la familia de las quimiocinas CC, que reclutan monocitos, linfocitos T de memoria y células dendríticas a los sitios de una inflamación. Entre las células inmunes, se sabe que las células monocíticas son las principales productoras de MCP-1. MCP-1 tiene un papel importante en la inflamación y la artritis. Además, se observó que IL6 induce MCP-1 en monocitos humanos. Por lo tanto, los anticuerpos anti-IL6 descritos en este documento se sometieron a ensayo para determinar su eficacia para inhibir la expresión de MCP-1 en las células U937 de la línea celular promonocítica, estimuladas con IL6.

Células U937 (2×10^6 células/pocillo) se cultivaron con IL6 (100 ng/ml) durante 24 h en placas de cultivo de fondo plano de 48 pocillos (Corning, Corning, NY) que contenían RPMI 1640 en presencia de los anticuerpos anti-IL6 a diferentes concentraciones. Los niveles de MCP-1 en el material sobrenadante se midieron con los kits de ELISA para MCP-1 (e Bioscience). Todos los experimentos *in vitro* se realizaron por triplicado.

La producción de MCP-1 a partir de células U937 se observó después de una estimulación con IL6 y de una manera dependiente de la dosis y los anticuerpos anti-IL6 inhibían la producción de MCP-1 en las células U937 inducidas con IL6 (Figura 7A).

Además, las PBMCs se aislaron a partir de cinco donantes sanos. Las células (5×10^5 células/250 μ l/pocillo) se cultivaron con IL6 (100 ng/ml) durante 24 h en placas de cultivo de 96 pocillos con fondo en U (Corning, Corning, NY) que contenían RPMI1640 en presencia de anticuerpos anti-IL6 a diferentes concentraciones. Los niveles de MCP-1 en el material sobrenadante se midieron mediante kits de ELISA para MCP-1 (e Bioscience).

Se observó una producción de MCP-1 en las células PBMCs después de la estimulación con IL6. La presencia de los anticuerpos Ag1-4-6 y HAgt1T-3-10 inhibía la producción de MCP-1 de una manera dependiente de la dosis, mientras que una IgG1 de control del isotipo no mostraba ese efecto inhibitor (Figura 7B).

(iii) Los anticuerpos anti-IL6 inhibían la producción de MCP-1 y VEGF en fibroblastos sinoviales procedentes de pacientes con artritis reumatoide

Los tejidos sinoviales frescos se desmenuzaron y se digirieron en una solución de colagenasa y ADNasa. Los fibroblastos aislados se filtraron a través de filtros de nailon de 70 mm. Las células se cultivaron en placas de cultivo celular de plástico en 95% de aire/5% de CO₂ en medio RPMI 1640 (Life Technologies) que estaba complementado con HEPES 20 mM y 10% de FBS termoinactivado, glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomina (pH ajustado a 7,6). Más del 95% de las células eran fibroblastos, tal como se caracterizó mediante una tinción inmunofluorescente utilizando un anticuerpo específico para el marcador proteico de fibroblastos, vimentina. Los fibroblastos procedentes de los países cuatro a nueve se utilizaron para los experimentos.

Unos sinoviocitos similares a fibroblastos obtenidos a partir de pacientes humanos con AR, como se han descrito anteriormente (células RA-FLS) se cultivaron en placas de cultivo de fondo plano de 6 pocillos (Corning, Corning, NY; 2×10^5 células/2 ml/pocillo) durante 2 días y se estimularon tanto con IL6 como con sIL6R. Los anticuerpos se añadieron a los pocillos a diversas concentraciones y se incubaron con las células durante 24 h. Los niveles de MCP-1 se midieron después mediante kits de ELISA para MCP-1 (e Bioscience).

Las células RA-FLS expresan MCP-1 de forma natural a niveles bajos y el pretratamiento con IL6 y sIL6R podía estimular un alto nivel de producción de MCP-1. Los anticuerpos anti-IL6 descritos en este documento mostraban una inhibición significativa de la producción de MCP-1 en células RA-FLS disponibles comercialmente (Figura 8A) y células RA-FLS obtenidas a partir de pacientes con AR como se ha descrito anteriormente (Figura 8B).

El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) tiene un papel importante en la patogénesis de la AR. Los niveles de VEGF son significativamente más altos en los fluidos sinoviales de pacientes con AR. También induce una permeabilidad vascular y media en la inflamación. Para examinar el efecto de los anticuerpos anti-IL6 sobre la producción de VEGF en las células RA-FLS, esas células se trataron con los anticuerpos anti-IL6 descritos en este documento en presencia de IL6 (100 ng/ml), sIL6R (100 ng/ml) e IL1 β (5 ng/ml) del modo siguiente.

Las células RA-FLS (2×10^4 células/500 μ l/pocillo) se cultivaron en placas de cultivo con 48 pocillos de fondo plano (Corning, Corning, NY) durante 24 horas y después se estimularon tanto con IL6 como sIL6R e IL-1 β . Los anticuer-

pos se añadieron a los pocillos a diversas concentraciones y se incubaron con las células durante 48 horas. El material sobrenadante se recogió y los niveles de VEGF se midieron mediante un kit de ELISA para VEGF humano (Pre-proTech).

- 5 El VEGF en el material sobrenadante del cultivo de las células RA-FLS estimuladas con la combinación de IL6, IL6R e IL1 β era 3-5 veces mayor que en el material sobrenadante procedente de células no estimuladas con las citocinas. Los anticuerpos anti-IL6 reducían significativamente la producción de VEGF en las células RA-FLS comercialmente disponibles (Figura 9A) y en las células RA-FLS preparadas a partir de pacientes con AR como se ha descrito en este documento (Figura 9B).

Otras realizaciones

- 10 Todas las características descritas en esta memoria descriptiva se pueden combinar en cualquier combinación.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Fountain Biopharma Inc.

<120> ANTICUERPOS CONTRA INTERLEUCINA-6 Y SU USO

<130> B1691EP

- 15 <150> US 61/716,802
< 151> 2012-10-22

<160> 21

<170> PatentIn versión 3.5

- 20 <210> 1
< 211> 30
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Polipéptido sintético

- 25 <400> 1
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

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

- 30 <210> 2
< 211> 7
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Polipéptido sintético

- <400> 2
Thr Gly Gly Met Ser Val Ser
1 5

- 35 <210> 3
< 211> 14
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

ES 2 662 020 T3

<220>
< 223> Polipéptido sintético

<400> 3
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu Ala
1 5 10

5 <210> 4
< 211> 16
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

10 <220>
< 223> Polipéptido sintético

<400> 4
Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Phe Tyr Thr Pro Ser Leu Lys Thr
1 5 10 15

15 <210> 5
< 211> 32
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Polipéptido sintético

<400> 5
Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val Val Leu Ile
1 5 10 15

20 Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 6
< 211> 16
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

25 <220>
< 223> Polipéptido sintético

<400> 6
Met His Ile Asp Asp Ser Asn Gly Tyr Tyr Ser Asp Ala Phe His Ile
1 5 10 15

30 <210> 7
< 211> 11
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

<220>
< 223> Polipéptido sintético

35 <400> 7
Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 8
< 211> 23

ES 2 662 020 T3

< 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 <220>
 < 223> Polipéptido sintético

 5 <400> 8
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

 Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys
 20

 <210> 9
 < 211> 12
 < 212> PRT
 10 < 213> Secuencia artificial

 <220>
 < 223> Polipéptido sintético

 <400> 9
 Arg Asp Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr Ser Leu Ala
 1 5 10

 15 <210> 10
 < 211> 15
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 <220>
 20 < 223> Polipéptido sintético

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

 <210> 11
 < 211> 7
 25 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 <220>
 < 223> Polipéptido sintético

 <400> 11
 Asp Thr Ser Asn Arg Ala Thr
 30 1 5

 <210> 12
 < 211> 32
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

 35 <220>
 < 223> Polipéptido sintético

ES 2 662 020 T3

<400> 12
 Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Gly Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

5
 <210> 13
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Polipéptido sintético

10
 <400> 13
 Leu Val Arg Asn Asn Trp Pro Pro Arg Phe Thr
 1 5 10

<210> 14
 < 211> 10
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

15
 <220>
 < 223> Polipéptido sintético

<400> 14
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

20
 <210> 15
 < 211> 11
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Polipéptido sintético

25
 <400> 15
 Ser Phe Val Ser Arg Pro Tyr Pro Arg Phe Thr
 1 5 10

30
 <210> 16
 < 211> 16
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

<220>
 < 223> Polipéptido sintético

35
 <400> 16
 Met His Ile Asp Asp Ser Asn Gly Tyr Phe Ser Asp Ala Phe His Ile
 1 5 10 15

<210> 17
 < 211> 126
 < 212> PRT
 < 213> Secuencia artificial

ES 2 662 020 T3

<220>

< 223> Polipéptido sintético

<400> 17

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

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

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

Trp Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Phe Tyr Thr Pro Ser
 50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
 65 70 75 80

Val Leu Ile Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
 85 90 95

Cys Ala Arg Met His Ile Asp Asp Ser Asn Gly Tyr Tyr Ser Asp Ala
 100 105 110

Phe His Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

5

<210> 18

< 211> 126

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

10

<220>

< 223> Polipéptido sintético

<400> 18

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

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

ES 2 662 020 T3

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

Trp Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Phe Tyr Thr Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Thr Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Ile Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Met His Ile Asp Asp Ser Asn Gly Tyr Phe Ser Asp Ala
100 105 110

Phe His Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 19
< 211> 110
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

5

<220>
< 223> Polipéptido sintético

<400> 19
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Asp Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Val Arg Asn Asn Trp Pro
85 90 95

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

10

<210> 20
< 211> 110
< 212> PRT
< 213> Secuencia artificial

15

<220>
< 223> Polipéptido sintético

ES 2 662 020 T3

<400> 20

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

Glu Arg Val Thr Leu Ser Cys Arg Asp Ser Gln Ser Val Ser Ser Thr
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Thr Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

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

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Phe Val Ser Arg Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 21

< 211> 14

< 212> PRT

< 213> Secuencia artificial

5

<220>

< 223> Polipéptido sintético

<220>

< 221> misc_feature

< 222> (10)..(10)

< 223> Xaa es un aminoácido aromático

10

<400> 21

Met His Ile Asp Asp Ser Asn Gly Tyr Xaa Ser Asp Ala Phe
1 5 10

15

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo aislado que se une a interleucina 6 humana (IL6), que comprende:

5 (a) una región variable de la cadena pesada (V_H), que comprende una región determinante de complementariedad 1 de la cadena pesada (HC CDR1) de SEQ ID NO: 2, una región determinante de complementariedad 2 de la cadena pesada (HC CDR2) de SEQ ID NO: 4 y una región determinante de complementariedad 3 de la cadena pesada (HC CDR3) de SEQ ID NO: 6; y una región variable de la cadena ligera (V_L), que comprende una región determinante de complementariedad 1 de la cadena ligera (LC CDR1) de SEQ ID NO: 9, una región determinante de complementariedad 2 de la cadena ligera (LC CDR2) de SEQ ID NO: 11 y una región determinante de complementariedad 3 de la cadena ligera (LC CDR3) de SEQ ID NO: 13;

10 (b) una región variable de la cadena pesada (V_H), que comprende una región determinante de complementariedad 1 de la cadena pesada (HC CDR1) de SEQ ID NO: 2, una región determinante de complementariedad 2 de la cadena pesada (HC CDR2) de SEQ ID NO: 4 y una región determinante de complementariedad 3 de la cadena pesada (HC CDR3) de SEQ ID NO: 6; y una región variable de la cadena ligera (V_L), que comprende una región determinante de complementariedad 1 de la cadena ligera (LC CDR1) de SEQ ID NO: 9, una región determinante de complementariedad 2 de la cadena ligera (LC CDR2) de SEQ ID NO: 11 y una región determinante de complementariedad 3 de la cadena ligera (LC CDR3) de SEQ ID NO: 15; o

20 (c) una región variable de la cadena pesada (V_H), que comprende una región determinante de complementariedad 1 de la cadena pesada (HC CDR1) de SEQ ID NO: 2, una región determinante de complementariedad 2 de la cadena pesada (HC CDR2) de SEQ ID NO: 4 y una región determinante de complementariedad 3 de la cadena pesada (HC CDR3) de SEQ ID NO: 16; y una región variable de la cadena ligera (V_L), que comprende una región determinante de complementariedad 1 de la cadena ligera (LC CDR1) de SEQ ID NO: 9, una región determinante de complementariedad 2 de la cadena ligera (LC CDR2) de SEQ ID NO: 11 y una región determinante de complementariedad 3 de la cadena ligera (LC CDR3) de SEQ ID NO: 15.

2. El anticuerpo aislado según la reivindicación 1, que comprende:

25 (i) una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19;

(ii) una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17 y una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20; o

30 (iii) una V_H que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una V_L que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

3. El anticuerpo aislado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa o un fragmento del mismo que se une a antígeno.

4. El anticuerpo aislado según la reivindicación 3, en donde el fragmento que se une a antígeno es Fab o (Fab')₂.

35 5. El anticuerpo aislado según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de cadena sencilla, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

6. Una composición que comprende un anticuerpo según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

7. La composición según la reivindicación 6, en donde la composición comprende además otro agente anticancerígeno o un fármaco antirreumático modificador de la enfermedad (DMARD).

40 8. La composición según la reivindicación 7, en donde el agente anticancerígeno se selecciona a partir del grupo que consiste en docetaxel, oxaliplatino y gemcitabina, y el DMARD se selecciona a partir del grupo que consiste en metotrexato, azatioprina, cloroquina, hidroxicloroquina, ciclosporina A y sulfasalazina.

9. Un anticuerpo o una composición para uso en un medicamento, en donde el anticuerpo es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-5 y la composición es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 6-8.

45 10. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con IL6, en donde la composición farmacéutica se indica en cualquiera de las reivindicaciones 6-8.

11. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 10, en donde la enfermedad asociada con IL6 es un trastorno inflamatorio, una enfermedad autoinmune, angiogénesis, cáncer, metástasis tumoral o caquexia relacionada con el cáncer.

50 12. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 11, en donde la enfermedad autoinmune se selecciona a partir del grupo que consiste en artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, enfermedad de Castleman, escler

rosis múltiple, espondilitis anquilosante, artritis psoriásica y psoriasis; y el cáncer se selecciona a partir del grupo que consiste en mieloma múltiple, leucemia, cáncer de mama, cáncer de páncreas, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer oral y cáncer de próstata.

5 13. Un vector que comprende un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una región variable de la cadena pesada de un anticuerpo (V_H), una región variable de la cadena ligera de un anticuerpo (V_L) o ambas, en donde la V_H y la V_L se indican en cualquiera de las reivindicaciones 1-5.

14. Una célula hospedadora que comprende el vector según la reivindicación 13.

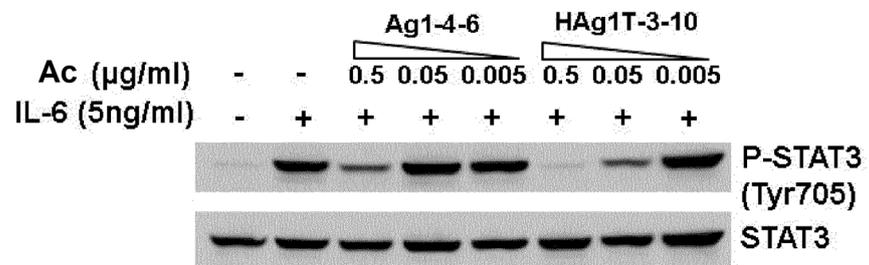
15. Un método para producir un anticuerpo que se une a IL6 humana, que comprende:

10 cultivar una célula hospedadora como se indica en la reivindicación 14 en condiciones que permiten la expresión del anticuerpo; y,

recuperar el anticuerpo.

Figura 1

A



B

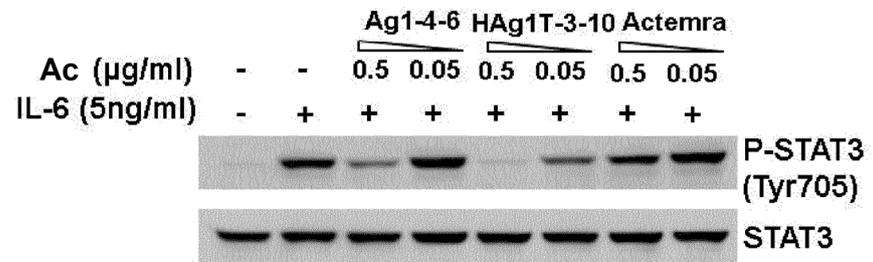
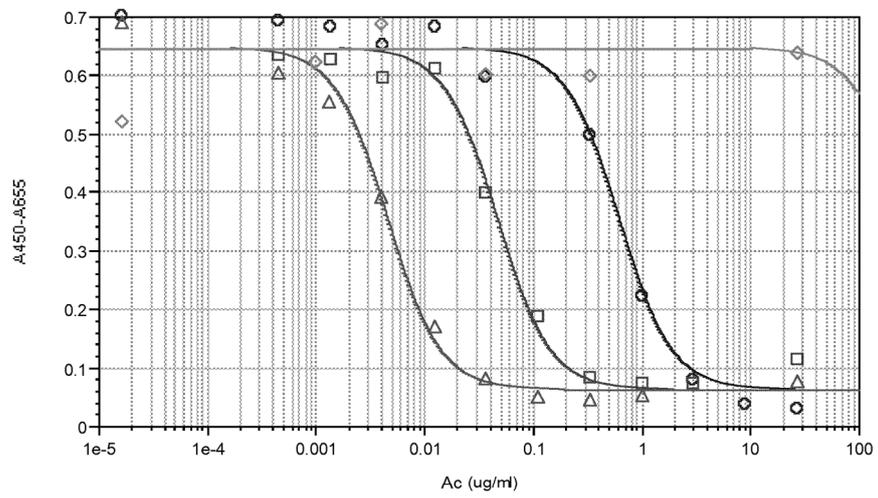


Figura 1 (Continuación)

C



	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$)
○ Gráfico nº 1 1-4-62	0.618
□ Gráfico nº 2 Ag1-4-6	0.0468
△ Gráfico nº 3 HAg1T-3-10	0.00456
◇ Gráfico nº 4 hlgG1	

Figura 2

A

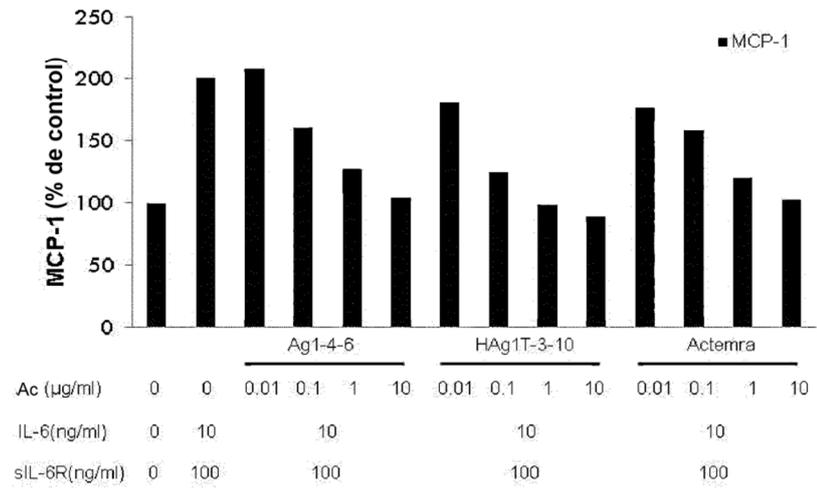


Figura 2 (Continuación)

B

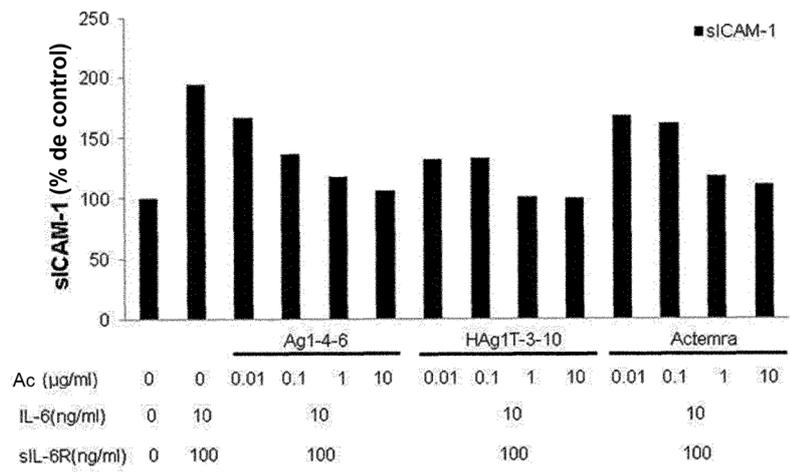


Figura 3

A

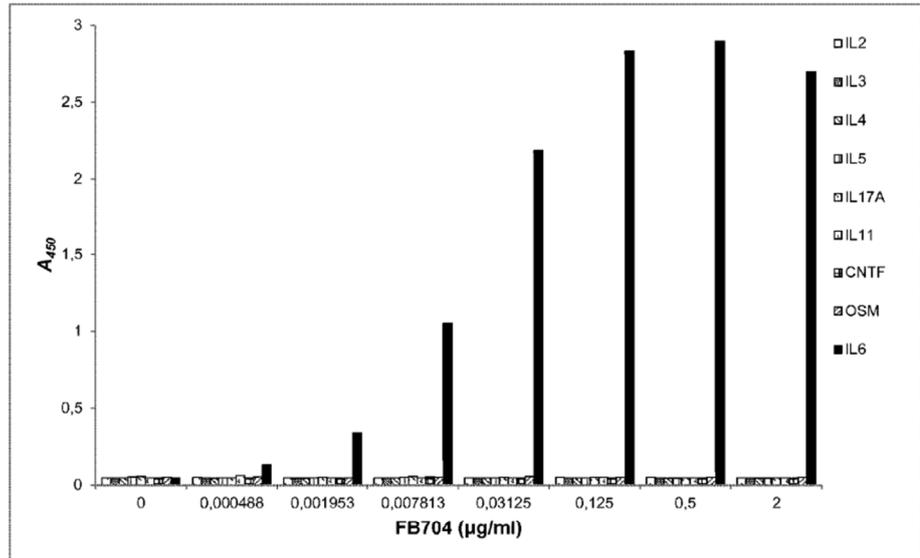


Figura 3 (Continuación)

B

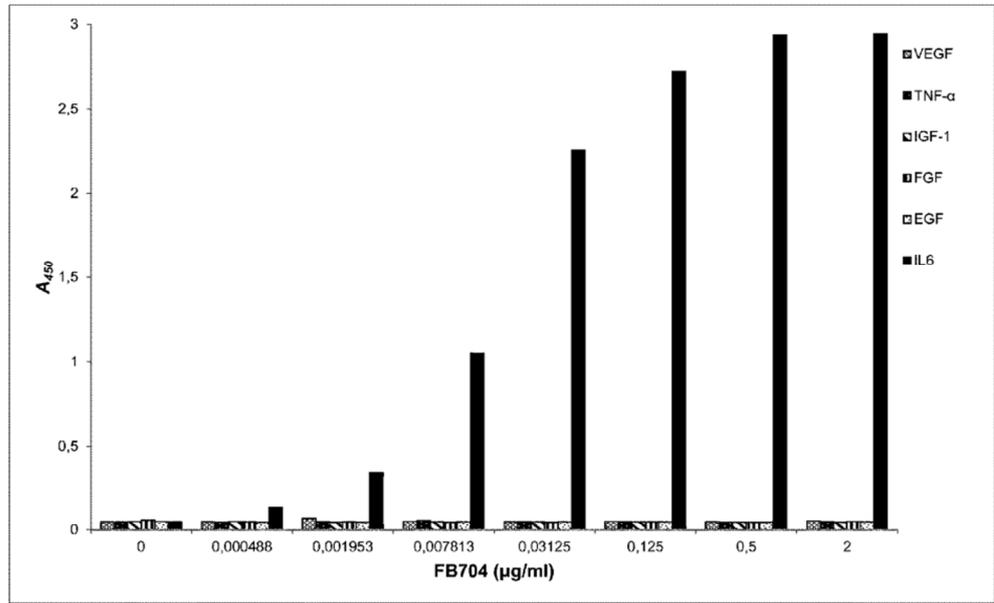


Figura 4

A

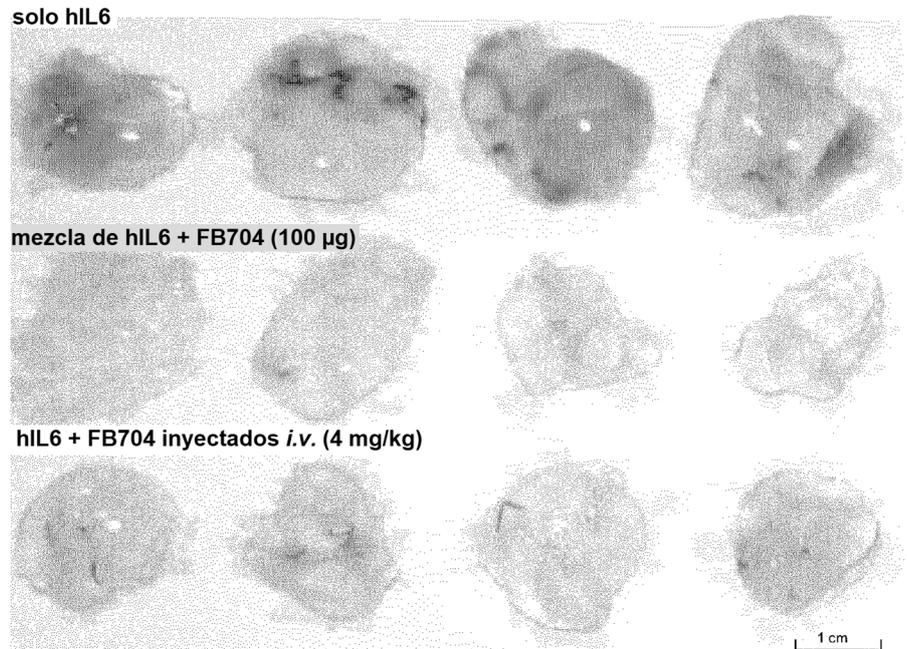


Figura 4 (Continuación)

B

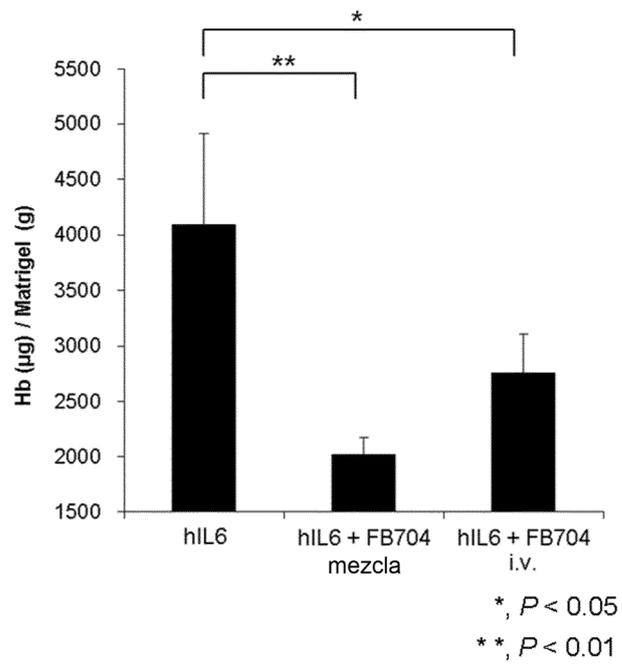


Figura 5

A

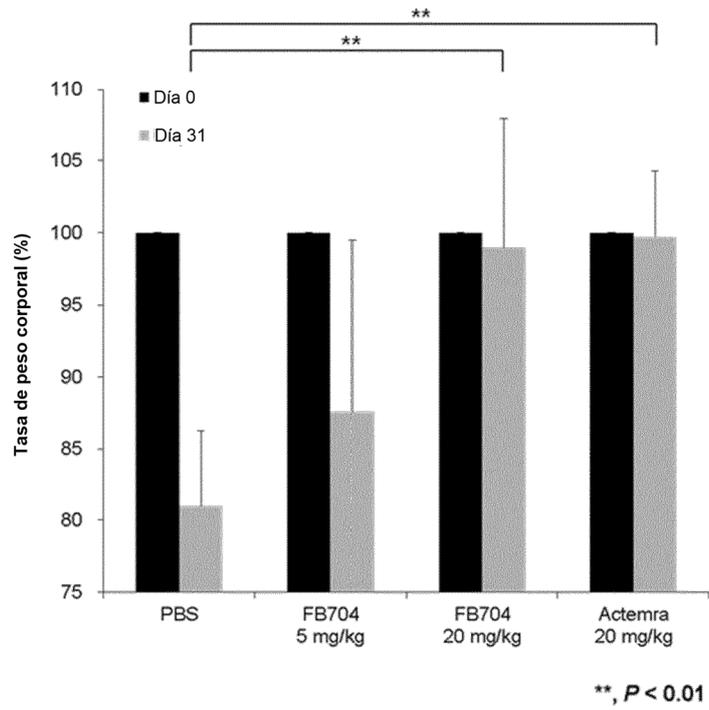
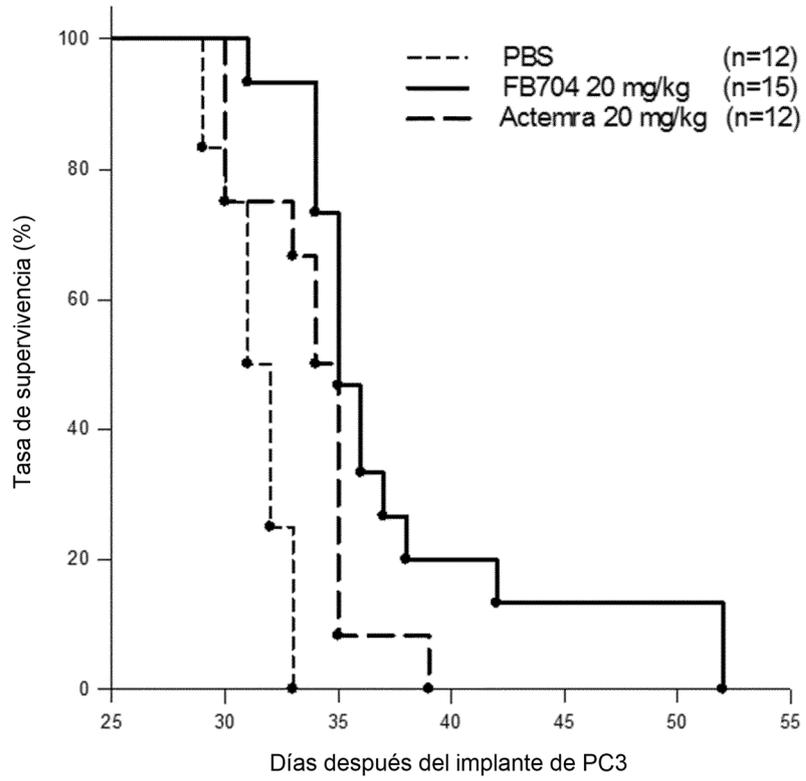


Figura 5 (Continuación)

B

Análisis de la supervivencia de Kaplan-Meier : Gehan-Breslow



C

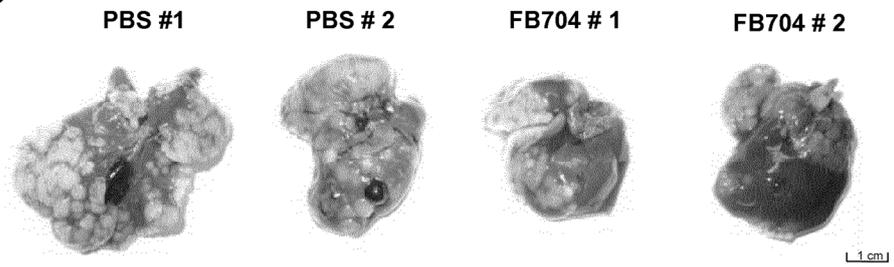


Figura 5 (Continuación)

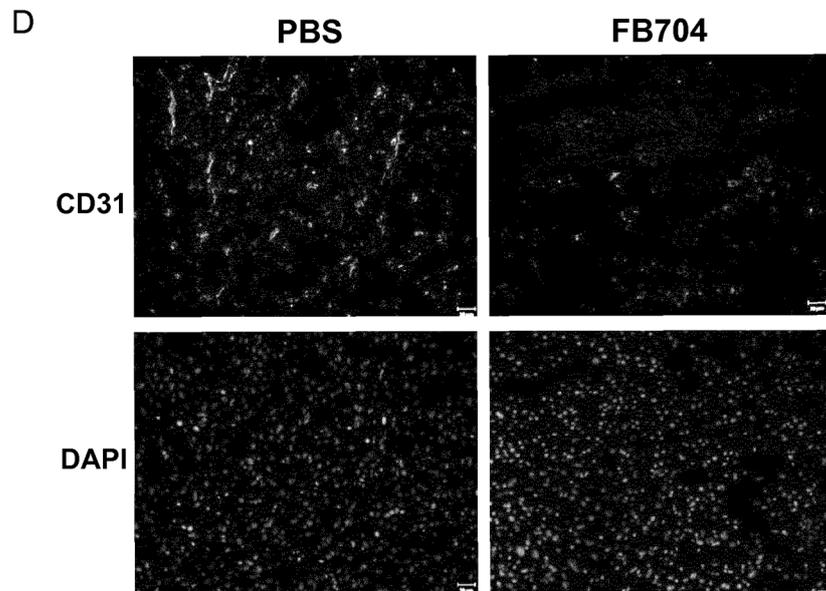


Figura 5 (Continuación)

E

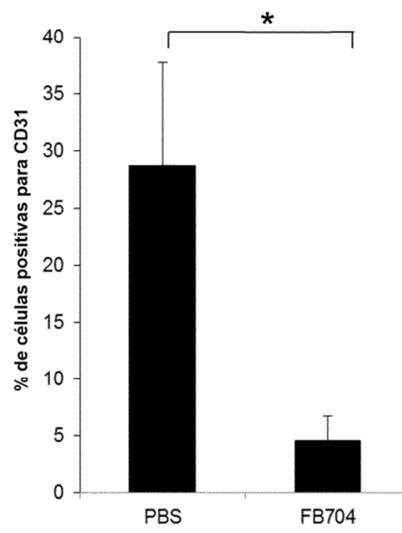


Figura 5 (Continuación)

F

Análisis de la supervivencia de Kaplan-Meier: Gehan-Breslow

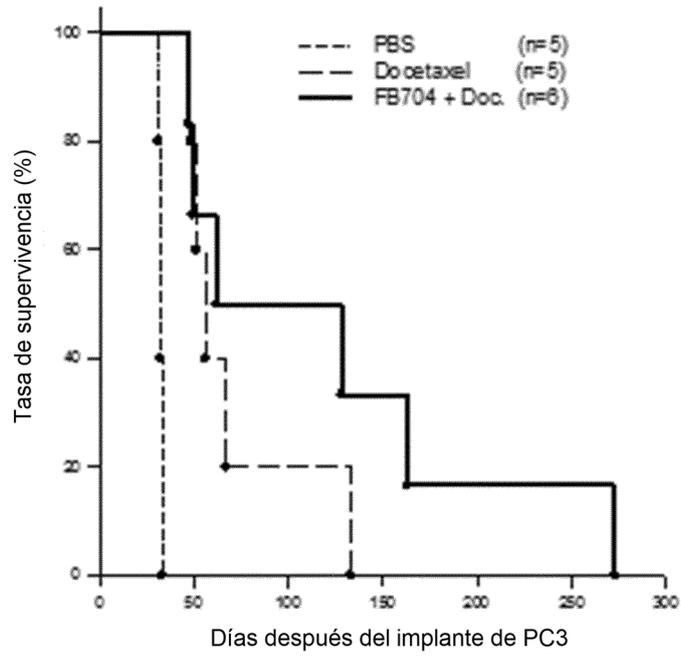


Figura 6

A

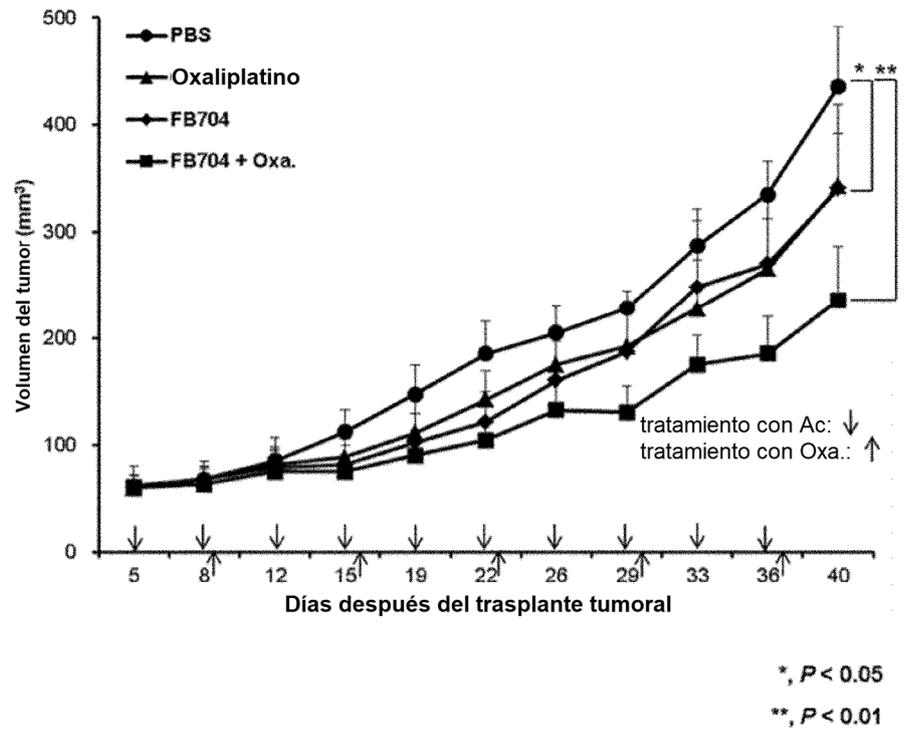


Figura 6 (Continuación)

B

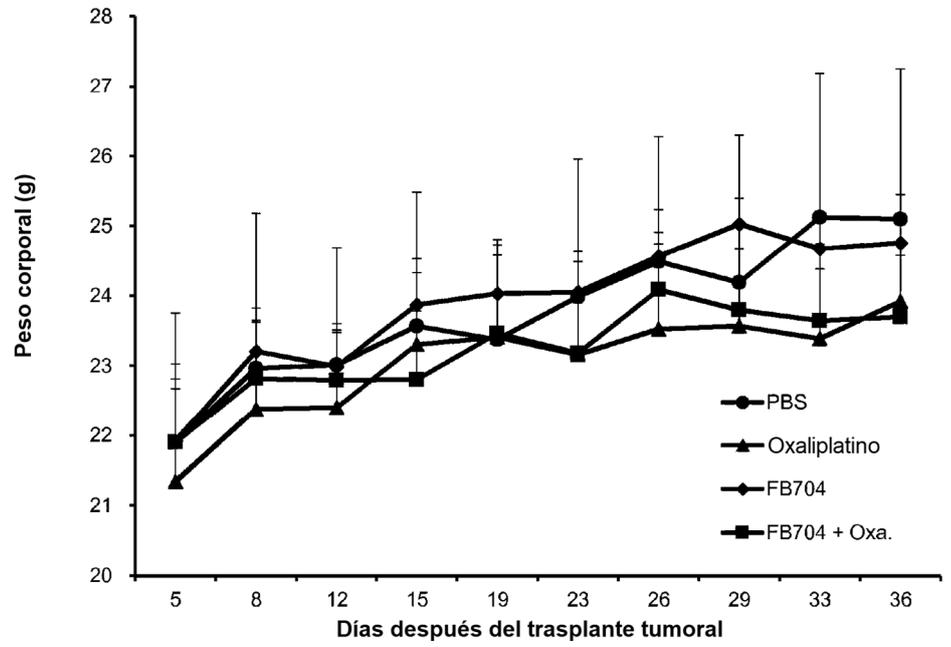


Figura 6 (Continuación)

C

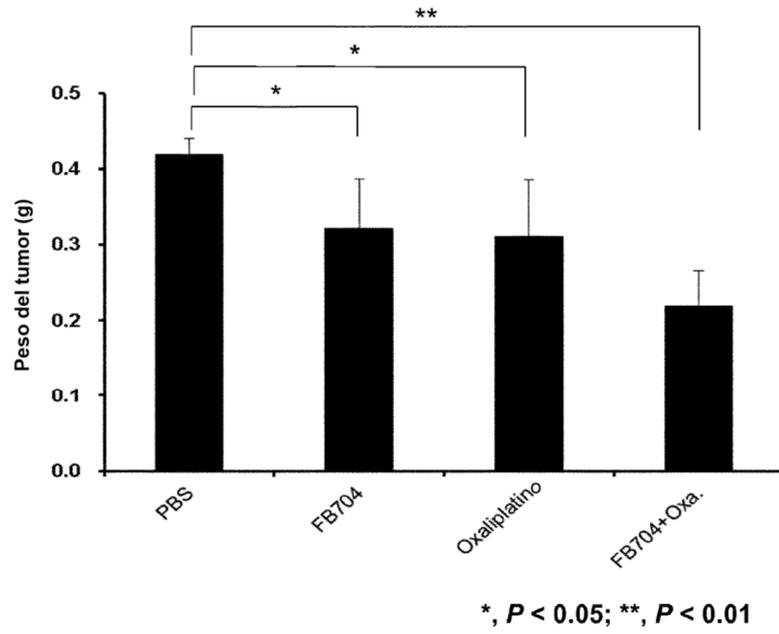


Figura 6 (Continuación)

D

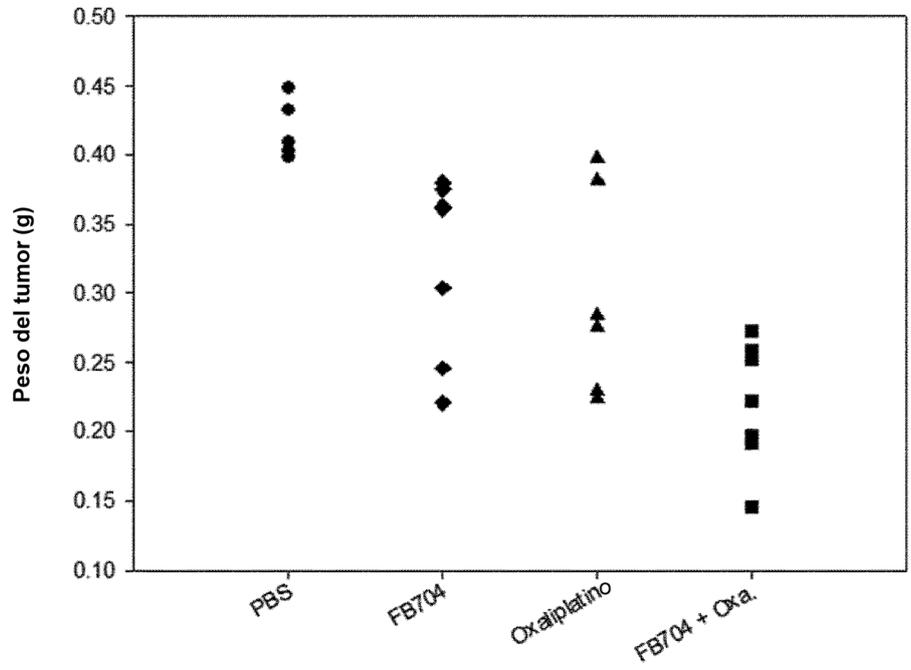


Figura 6 (Continuación)

E

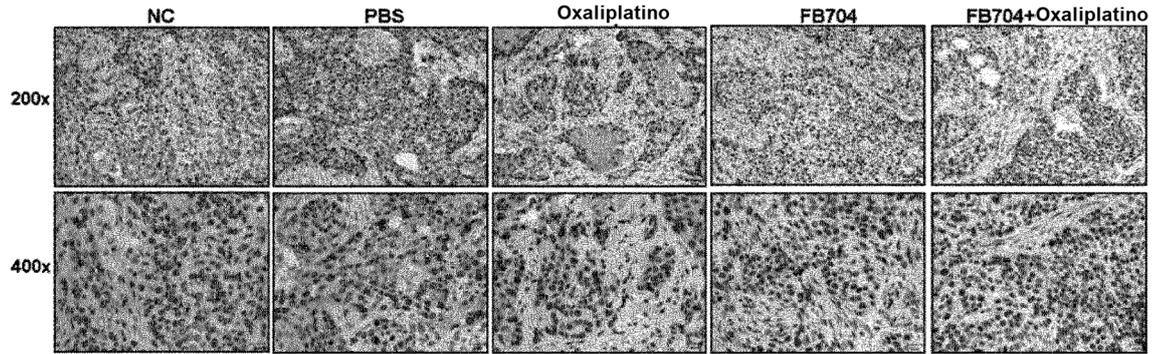
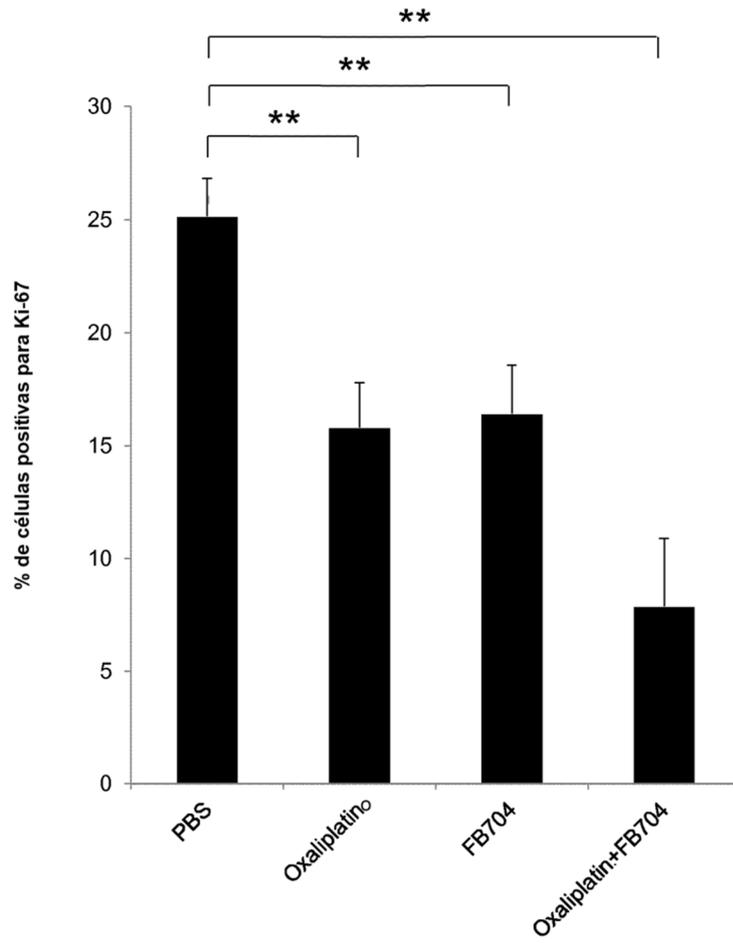


Figura 6 (Continuación)

F



** , $P < 0.01$

Figura 6 (Continuación)

G

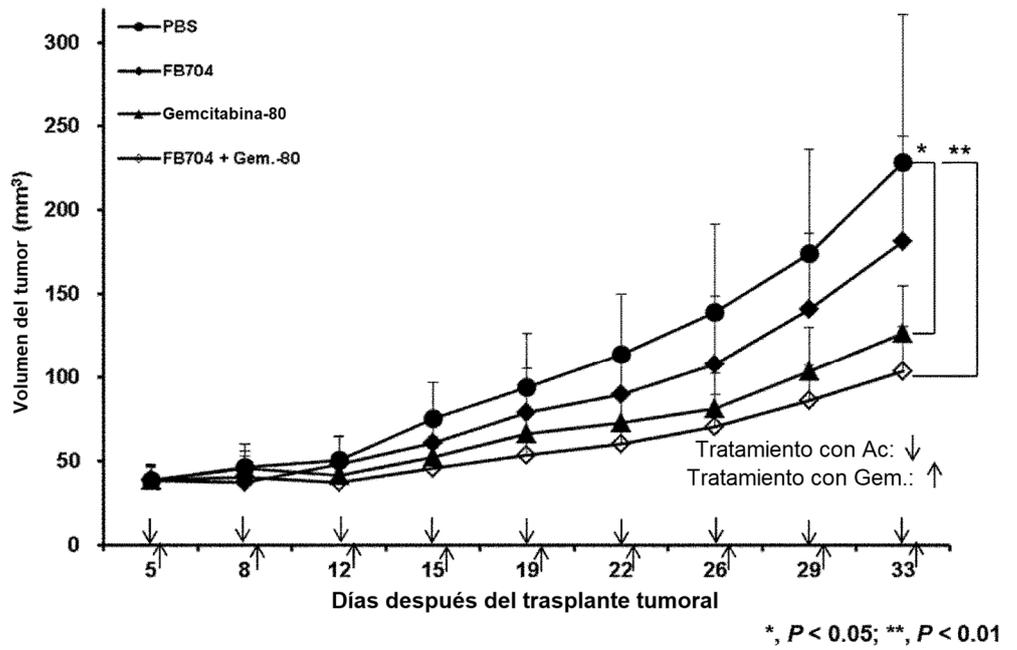


Figura 7

A

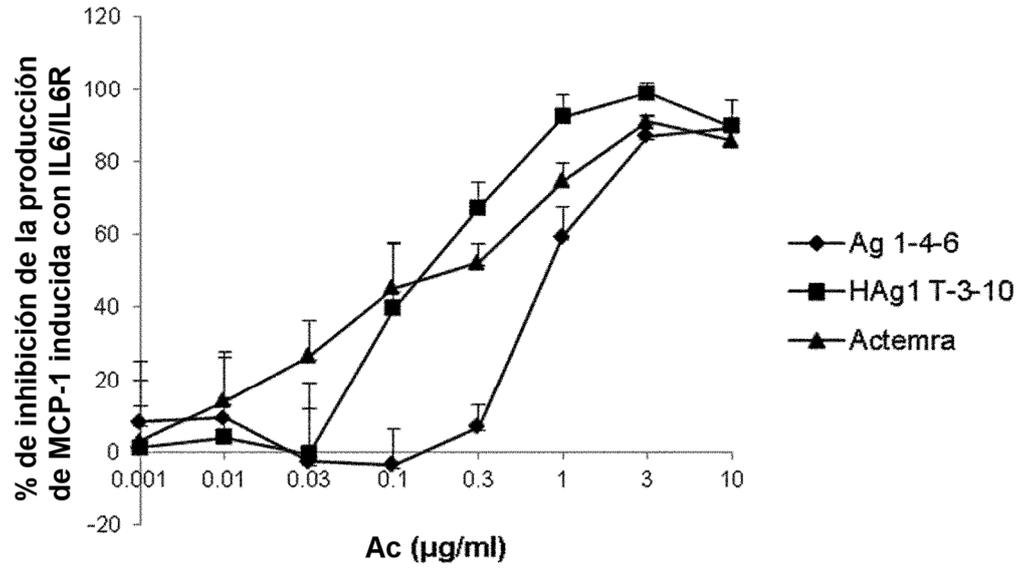
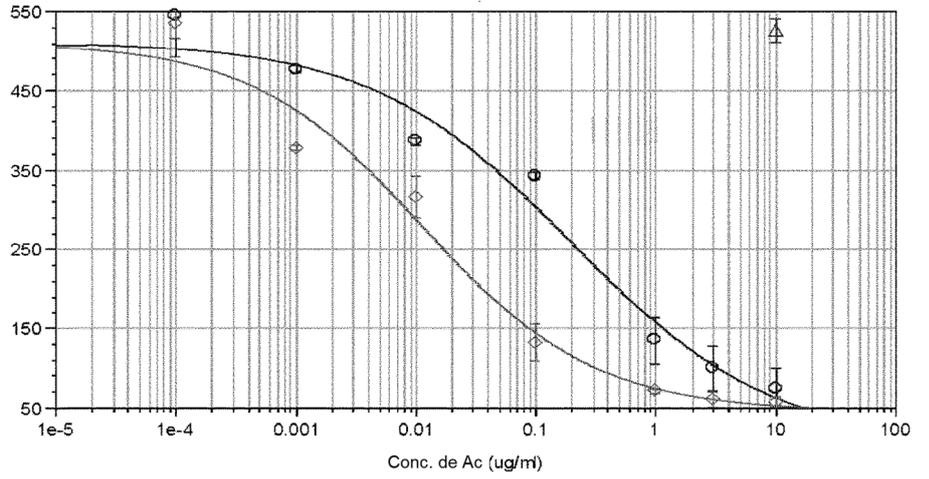


Figura 7 (Continuación)

B



4-P Fit: $y = (A - D) / (1 + (x/C)^B) + D$

	A	B	C	D	R ²
○ Ag 1-4-6 (Ag 1-4-6: Concentración frente a Valor Medio)	511	0.52	0.205	3.35	0.977
◇ HAg1 T-3-10 (HAg1 T-3-10: Concentración frente a Valor M. 510)	510	0.608	0.0117	45	0.978
△ Isotipo de IgG (Isotipo de IgG: Concentración frente a Valor Medio)					

Ponderación: Fijada

Figura 8

A

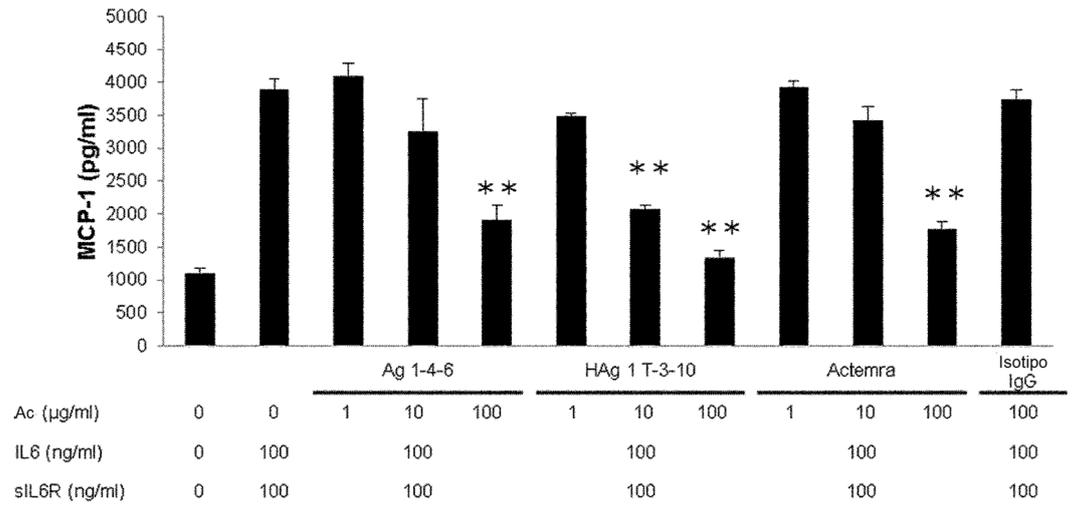


Figura 8 (Continuación)

B

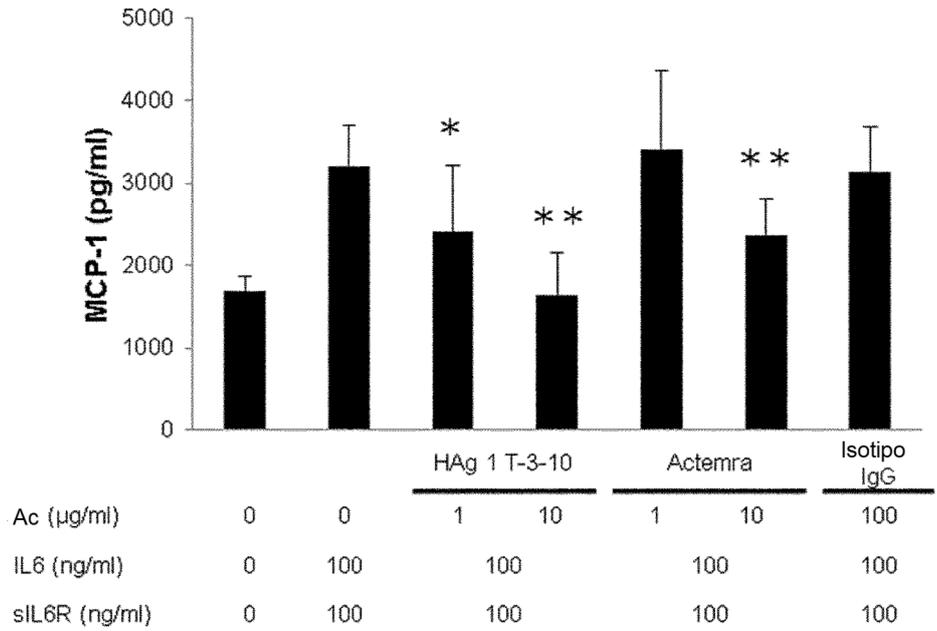


Figura 9

A

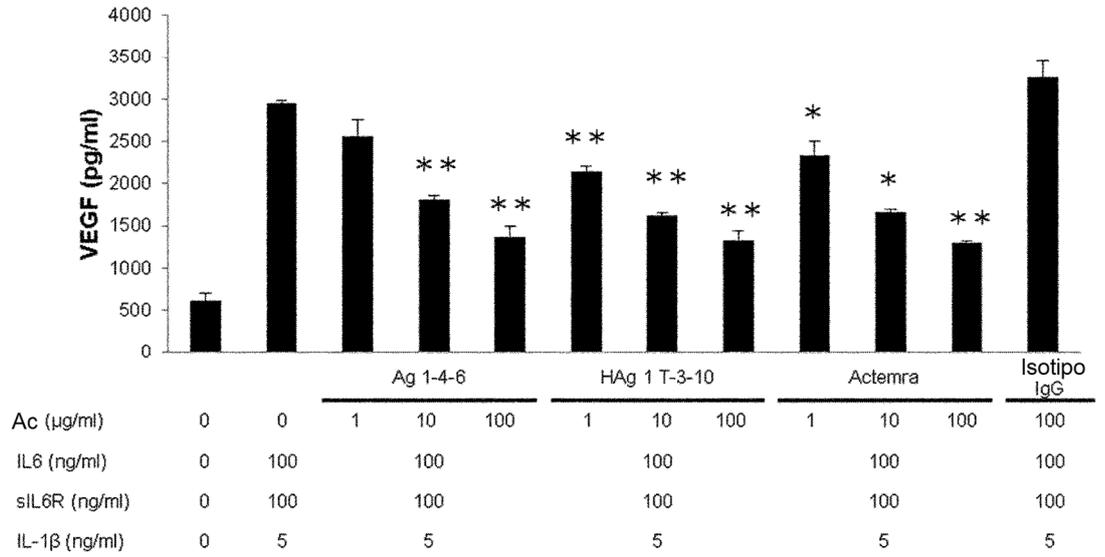
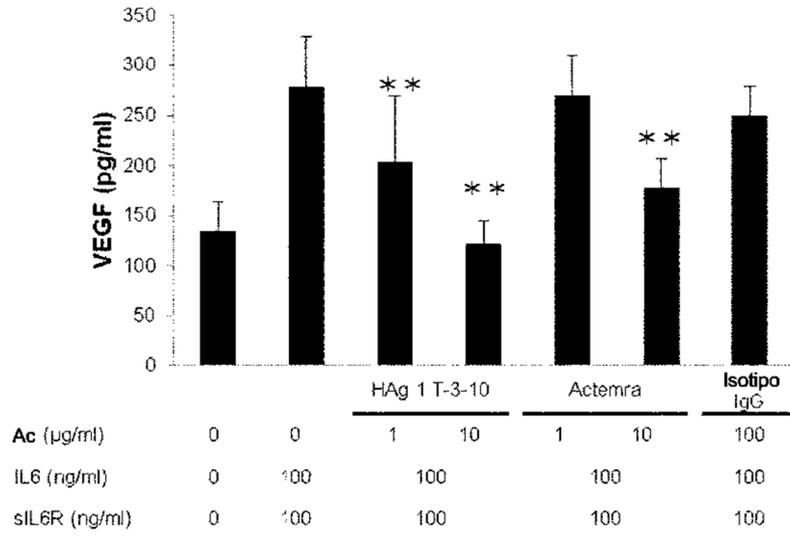


Figura 9 (Continuación)

B



Ac (µg/ml)	0	0	1	10	1	10	100
IL6 (ng/ml)	0	100	100		100		100
sIL6R (ng/ml)	0	100	100		100		100