



No. 11-004914- -00012-0000

Fecha: 2013-05-28 16:32:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-130701- -00000-0000

Fecha: 2013-05-28 16:32:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DIVISIONAL DE PATENTE DE INVENCION

TITULO: ANTICUERPOS CONTRA IL-6.

SOLICITANTE: BRISTOL - MYERS SQUIBB COMPANY Y PFIZER INC.

EXPEDIENTE No. 11-004.914 A

DIRECCIÓN: Route 206 & Province Line Rd. Princeton, NJ 08540 y 235 East
42nd Street, New York, NY 10017.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ: 28 de Mayo de 2013

P2010/000146A



No. 11-004914-00012-0000

Fecha: 2013-05-28 16:32:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 6
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-130701-00000-0000

Fecha: 2013-05-28 16:32:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

Carlos R. Olarte
Juan G. Moure

Alexander Agudelo
Carlos A. Parra
Juan Felipe Acosta
Andrés Rincón
Mónica Guevara
Andrés Alvarado
Ella Ponce
Liliana Galindo
María Clara Calderón
Mauricio Ávila
Laura Escobar
José Jairo Dangond
Gina Cáceres
Isabella Herrera
Zaava Ravid

Medellín

María Clara Múnera

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

E. S. D.

Re: Expediente N° 11-004.914

Solicitud de Patente de Invención titulada: “ANTICUERPOS CONTRA IL-6”

Solicitante: BRISTOL - MYERS SQUIBB COMPANY Y PFIZER INC.

Nuestra Ref.: P2010/000146A

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, identificado tal como aparece al pie de mi firma, en mi carácter de apoderado de la sociedad solicitante, me permito manifestar lo siguiente:

1. Me permito presentar una **SOLICITUD DIVISIONAL A**, para la solicitud de patente en referencia.

Atentamente,

CARLOS R. OLARTE
C.C. 79.782.747 de Bogotá
T.P. 74.295

Anexo: Solicitud Divisional

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO E
PATENTE

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2010/000140A

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: BRISTOL-MYERS SQUIBB
COMPANY y PFIZER INC.

Dirección: Route 206 & Province Line Rd.
Princeton, NJ 08540 y 235 East 42nd Street,
New York, NY 10017

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos
Lugar de Constitución: Estados Unidos

Teléfono: _____ Fax: _____
E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: CARLOS R. OLARTE

Dirección: World Trade Center Torre A,
Calle 100 No. 8ª-37 Piso 10

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799
E-mail: office@moure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747Bta
TP 74.295

INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: VER PAGINA ADJUNTA.

Dirección: VER PAGINA ADJUNTA.

Nacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA.

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2009/046837 Fecha Junio 10, 2009

Publicación Internacional No. WO 2009/155180 Fecha Diciembre 23, 2009

6

Título (54) ANTICUERPOS CONTRA IL-6 Y SUS USOS

Clasificación Internacional (51) C07K 16/24, A61K 39/395

Prioridad
SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

US

(32) Fecha

Junio 18, 2008

Junio 9, 2009

(31) Número de Solicitud

61/073.430

12/480,991

9

Comprobante de pago No. 13-

Fecha

10

ANEXOS☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso. Ver expediente No. 11-004.914.

☒

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante. Ver expediente No. 10-086.505

☐

Declaraciones. Ver expediente No. 11-004.914.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA). Ver expediente No. 11-004.914.

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

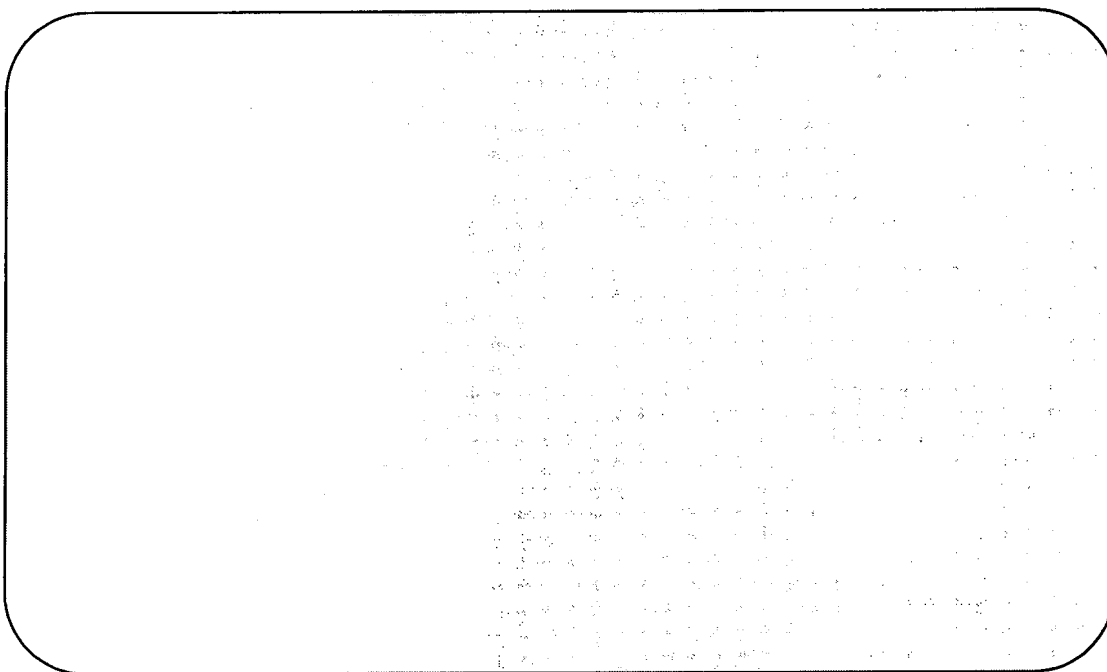
☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btá T.P. 74.295

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

A

LISTA DE INVENTORES

PCT/US2009/046837

1. Arvind RAJPAL,
519 Foerter Street,
San Francisco, CA 94127
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

2. Madhav DEVALARAJA,
11436 Saddlevue Pl.
Gaithersburg, MD 20878
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

3. Kristopher TOY,
521 Cottonwood Drive,
Milpitas, CA 95035
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

4. Lan YANG,
521 Cottonwood Drive,
Milpitas, CA 95035
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

5. Halichun HUANG,
521 Cottonwood Drive,
Milpitas, CA 95035
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

6. Jun Z. ZHANG,
521 Cottonwood Drive,
Milpitas, CA 95035
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

7. Peter BRAMS,
521 Cottonwood Drive,
Milpitas, CA 95035
Estados Unidos
Nacionalidad: Dinamarqués

8. Brigitte DEVAUX,
521 Cottonwood Drive,
Milpitas, CA 95035
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

9. David B. PASSMORE,
521 Cottonwood Drive,
Milpitas, CA 95035
Estados Unidos
Nacionalidad: Estadounidense

6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA	No. 13 - 0040675
		Bogotá D.C., Abril 30 de 2013 - 12:12:26

RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS	NI 830.122.870
--	----------------

*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	532438222	29/04/2013	7.078.000.00

*** Conceptos Pagados ***			
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN CONT. DERE	450.000.00 450.000.00
			\$450.000.00
=====			

SON: **CUATROCIENTOS CINCUENTA MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**

Responsable:  _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____



PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:

2020

Fecha: 2013 / 05 / 28
AAAA MM DD

Recorrido:

Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador:

Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	11-4914-12		
2	13-130701-0		
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

<i>Item</i>	<i>Unidad de Conservación</i>
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
<i>Item</i>	<i>Soporte Documental</i>
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:

Anaxan CB

Penh

(43) International Publication Date
23 December 2009 (23.12.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/155180 A1(51) International Patent Classification:
C07K 16/24 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)

B. [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2009/046837(74) Agent: **BRADY, James, W.**; Dickstein Shapiro LLP, 1825 Eye Street, NW, Washington, DC 20006-5403 (US).(22) International Filing Date:
10 June 2009 (10.06.2009)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/073,430 18 June 2008 (18.06.2008) US
12/480,991 9 June 2009 (09.06.2009) US(71) Applicants (for all designated States except US):
MEDAREX, INC. [—/US]; 707 State Road, Princeton, NJ 08540 (US). **PFIZER INC.** [US/US]; 235 East 42nd Street, New York, NY 10017 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **RAJPAL, Arvind** [US/US]; 519 Foerster Street, San Francisco, CA 94127 (US). **DEVALARAJA, Madhav** [US/US]; 11436 Saddlevue Pl., Gaithersburg, MD 20878 (US). **TOY, Kristopher** [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US). **YANG, Lan** [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US). **HUANG, Halichun** [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US). **ZHANG, Jun, Z.** [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US). **BRAMS, Peter** [DK/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US). **DEVAUX, Brigitte** [US/US]; 521 Cottonwood Drive, Milpitas, CA 95035 (US). **PASSMORE, David,**

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(54) Title: ANTIBODIES TO IL-6 AND THEIR USES

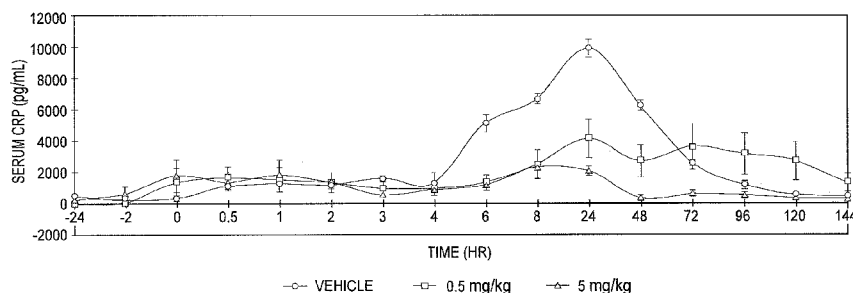


FIG. 2

(57) Abstract: Antibodies and antigen-binding portions thereof that bind to human IL-6 are provided. Also provided are nucleic acids encoding such antibodies and antigen binding portions, methods of making such antibodies and antigen binding portions, compositions comprising such antibodies or antigen binding portions, and uses of such antibodies or antigen binding portions.

ANTIBODIES TO IL-6 AND THEIR USES

CROSS-REFERENCE TO RELATED PATENTS AND PATENT APPLICATIONS

[0001] This application claims the benefit of U.S. Provisional Patent Application Serial No. 61/073430 filed June 18, 2008; which is incorporated by reference herein in its entirety.

JOINT RESEARCH AGREEMENT

[0002] The disclosure and claims herein were made as a result of activities undertaken within the scope of a joint research agreement in effect on or before the date the claimed invention was made between Pfizer Inc. and Medarex, Inc.

BACKGROUND

[0003] This invention relates to antibodies and antigen-binding portions thereof that bind to human IL-6. This invention also relates to nucleic acids encoding such antibodies and antigen binding portions thereof; methods of making such antibodies and antigen binding portions thereof; compositions comprising such antibodies or antigen binding portions thereof; and uses of such antibodies or antigen binding portions thereof.

[0004] Interleukin-6 (IL-6), which is also known as interferon B2 (IFNB2), is a pleiotropic cytokine that belongs to the family of gp130 ligands and is produced by many cell types, including T lymphocytes, fibroblasts and monocytes. IL-6 is produced constitutively at low levels and is readily induced by infectious stimuli or inflammatory cytokines. IL-6 binds to a specific receptor IL-6R (gp80) which heterodimerizes with cell-bound or soluble gp130 to form a functional receptor complex. Binding of IL-6 to its receptor initiates cellular events including activation of the JAK-STAT3 pathway and *ras*-mediated MAP kinase signaling. IL-6 can elicit a diverse array of effects such as proliferation and differentiation of B cells and monocytes, T cell activation, hematopoiesis, osteoclast activation, keratinocyte growth, neuronal growth, hepatocyte activation and acute phase protein induction from hepatocytes.

[0005] IL-6 plays an important role in B cell abnormalities as demonstrated in systemic lupus erythematosus, multiple myeloma and lymphoproliferative disorders. Similarly, IL-6 is also implicated in the pathogenesis of autoimmune and inflammatory

diseases such as rheumatoid arthritis and osteoarthritis. Recently, indirect evidence suggests an association between IL-6 and chronic obstructive pulmonary disease and insulin resistance in type 2 diabetes. IL-6 has both pro-inflammatory and anti-inflammatory effects in the immune system, indicating that this cytokine likely plays a central role in regulating the physiological response to disease. Therefore, targeting IL-6 can potentially provide therapeutic benefit in a variety of disease areas.

[0006] An increase in the production of IL-6 has been observed in a number of diseases including: Alzheimer's disease, autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, inflammation, myocardial infarction, Paget's disease, osteoporosis, liver fibrosis, solid tumors (renal cell carcinoma), prostatic and bladder cancers, neurological cancers, and B-cell malignancies (e.g., Castleman's disease, certain lymphomas, chronic lymphocytic leukemia, and multiple myeloma). Research has indicated that IL-6 is linked to the pathogenesis of many of these diseases, particularly, cancer and rheumatoid arthritis and, therefore, blocking IL-6 should translate into clinical benefits.

SUMMARY

[0007] An isolated antibody or antigen-binding portion thereof that specifically binds IL-6 and may act as an IL-6 receptor antagonist, and compositions comprising the antibody or portion are produced.

[0008] Compositions comprising (i) the heavy and/or light chain, the variable domains thereof, or antigen-binding portions thereof, of the anti-IL-6 antibody, or nucleic acid molecules encoding them; and (ii) a pharmaceutically acceptable carrier are provided. The compositions may further comprise another component, such as a therapeutic agent or a diagnostic agent.

[0009] Diagnostic and therapeutic methods are also provided. Similarly, the anti-IL-6 antibodies and antigen-binding portions thereof are provided for the manufacture of medicaments to treat inflammatory and non-inflammatory disorders.

[0010] Vectors and host cells comprising the nucleic acid molecules, as well as methods of recombinantly producing the polypeptides encoded by the nucleic acid molecules are provided.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

[0011] Figure 1 shows an alignment of the germline amino acid sequences of the heavy and light chain variable regions compared to the respective anti-IL-6 antibodies 9C8, 9C8 N68T T83S and 22B5 heavy and light chain variable regions (only mismatches are shown for the 9C8, 9C8 N68T T83S, and 22B5 antibody). The CDRs are underlined and mismatched gap(s) are indicated by a pound sign (#).

[0012] Figure 2 shows the total serum C-reactive protein (CRP) for the vehicle and the 9C8 N68T T83S IgG₂ antibody as determined by Electrochemiluminescence Immuno-Assay. Each point represents an average value of serum CRP from 3 cynomolgus monkeys ($\pm$ SE) dosed with vehicle or anti-IL-6 antibody 9C8 N68T T83S IgG₂ at 0.5 mg/kg and 5.0 mg/kg. Serum CRP was measured by Meso Scale Discovery (MSD). LPS was administered at the 0 hour time point.

DETAILED DESCRIPTION

Definitions and General Techniques

[0013] The term "antibody" is synonymous with immunoglobulin and is to be understood as commonly known in the art. In particular, the term antibody is not limited by any particular method of producing the antibody. For example, the term antibody includes, *inter alia*, recombinant antibodies, monoclonal antibodies, and polyclonal antibodies.

[0014] The basic antibody structural unit is a tetramer. Each tetramer is composed of two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one "light" (about 25 kDa) and one "heavy" chain (about 50-70 kDa). The amino-terminal portion of each chain includes a variable region of about 100 to 120 or more amino acids primarily responsible for antigen recognition. The carboxy-terminal portion of each chain defines a constant region primarily responsible for effector function. Human light chains are classified as kappa and lambda light chains. Heavy chains are classified as mu, delta, gamma, alpha, or epsilon, and define the antibody's isotype as IgM, IgD, IgG, IgA, and IgE, respectively. Within light and heavy chains, the variable and constant regions are joined by a "J" region of about 12 or more

amino acids, with the heavy chain also including a "D" region of about 3 or more amino acids.

[0015] The variable regions of each heavy/light chain pair (V_H and V_L), respectively, form the antigen binding site. Thus, an intact IgG antibody, for example, has two binding sites. Except in bifunctional or bispecific antibodies, the two binding sites are the same.

[0016] The variable regions of the heavy and light chains exhibit the same general structure of relatively conserved framework regions (FR) joined by three hyper variable regions, also called complementary determining regions or CDRs. The term "variable" refers to the fact that certain portions of the variable domains differ extensively in sequence among antibodies and are used in the binding and specificity of each particular antibody for its particular antigen. The variability, however, is not evenly distributed throughout the variable domains of antibodies, but is concentrated in the CDRs, which are separated by the more highly conserved FRs. The CDRs from the two chains of each pair are aligned by the FRs, enabling binding to a specific epitope. From N-terminal to C-terminal, both light and heavy chains comprise the domains FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 and FR4. The assignment of amino acids to each domain is in accordance with the definitions of Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), or Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al. *Nature* 342:878-883 (1989), the disclosures of which are herein incorporated by reference.

[0017] As used herein, an antibody that is referred to by number is the same as a monoclonal antibody that is obtained from the hybridoma of the same number. For example, anti-IL-6 monoclonal antibody 9C8 is the same antibody as one obtained from hybridoma 9C8, or a subclone thereof.

[0018] The term "analog" or "polypeptide analog" means a polypeptide that comprises a segment that has substantial identity to some reference amino acid sequence and has substantially the same function or activity as the reference amino acid sequence. Typically, polypeptide analogs comprise one or more conservative amino acid substitution (or insertion or deletion) with respect to the reference sequence. Analogs can be at least 20 or 25 amino acids long, or can be at least 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 or 200 amino acids long or longer, and can often be as long as the full-length polypeptide. Some embodiments include polypeptide analogs with 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 or 17 substitutions from the reference amino acid sequence. In some instances, the reference amino acid sequence is a germline sequence. Analogs of antibodies or immunoglobulin molecules can be readily prepared by those of ordinary skill in the art.

[0019] As discussed herein, amino acid substitutions to an IL-6 antibody or antigen-binding portion thereof are those which typically: (1) reduce susceptibility to proteolysis, (2) reduce susceptibility to oxidation, (3) alter binding affinity for forming protein complexes, (4) delete or create a site for glycosylation, or (4) confer or modify other physicochemical or functional properties of such analogs, but still retain specific binding to IL-6.

[0020] Analogs can include various substitutions to the normally-occurring peptide sequence. For example, single or multiple amino acid substitutions, preferably conservative amino acid substitutions, may be made in the normally-occurring sequence. A conservative amino acid substitution typically does not substantially change the structural characteristics of the parent sequence.

[0021] The term "antigen-binding portion" of an antibody refers to a fragment of an antibody that retains the ability to specifically bind to an antigen (e.g., IL-6). It has been shown that the antigen-binding function of an antibody can be performed by fragments of a full-length antibody. Examples of binding fragments encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody include: (i) a Fab fragment, a monovalent fragment consisting of the V_L , V_H , C_L and C_{H1} domains; (ii) a $F(ab')_2$ fragment, a bivalent fragment comprising two Fab fragments linked by a disulfide bridge at the hinge region; (iii) a Fd fragment consisting of the V_H and C_{H1} domains; (iv) a Fv fragment consisting of the V_L and V_H domains of a single arm of an antibody; (v) a domain antibody, (dAb) (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), which consists of a V_H domain; and (vi) an isolated complementary determining region (CDR). Furthermore, although the two domains of the Fv fragment, V_L and V_H , are coded for by separate genes, they can be joined, using recombinant methods, by a synthetic linker that enables them to be made as a single protein chain in which the V_L and V_H regions pair to form monovalent molecules (known as single chain Fv (scFv)). Such single chain antibodies are also intended to be encompassed within the term "antigen-binding portion" of an antibody. Other forms of single chain antibodies, such as diabodies are also encompassed. Diabodies are bivalent, bispecific antibodies in which V_H and V_L domains are expressed on a single polypeptide chain, but using a linker that is too short to allow for pairing between the two domains on the same chain, thereby forcing the domains to pair with complementary domains of another chain and creating two antigen binding sites. In addition, one or more CDRs from an antibody may be incorporated into a larger polypeptide chain, which can be covalently or non-covalently linked to another. In embodiments having one or more binding sites, the binding sites may be identical to one another or may be different.

[0022] Still further, an antibody or antigen-binding portion thereof may be part of larger immunoadhesion molecules, formed by covalent or noncovalent association of the antibody or antibody portion with one or more other proteins or peptides. Examples of such immunoadhesion molecules include use of the streptavidin core region to make a tetrameric scFv molecule and use of a cysteine residue, a marker peptide and a C-terminal polyhistidine tag to make bivalent and biotinylated scFv molecules. Other examples include where one or more CDRs from an antibody are incorporated into a molecule either covalently or noncovalently to make it an immunoadhesin that specifically binds to an antigen of interest, such as IL-6. In such embodiments, the CDR(s) may be incorporated as part of a larger polypeptide chain, may be covalently linked to another polypeptide chain, or may be incorporated noncovalently. Antibody portions, such as Fab and F(ab')₂ fragments, can be prepared from whole antibodies using any suitable technique, such as papain or pepsin digestion, respectively, of whole antibodies. Moreover, antibodies, antibody portions and immunoadhesion molecules can be obtained using various recombinant DNA techniques.

[0023] The term "chimeric antibody" means an antibody that comprises regions from two or more different antibodies, including antibodies from different species. For example, one or more of the CDRs of a chimeric antibody can be derived from a human IL-6 antibody. In one example, the CDRs from a human antibody can be combined with CDRs from a non-human antibody, such as mouse or rat. In another example, all of the CDRs can be derived from human IL-6 antibodies. In another example, the CDRs from more than one human IL-6 antibody can be combined in a chimeric antibody. For instance, a chimeric antibody may comprise a CDR1 from the light chain of a first human IL-6 antibody, a CDR2 from the light chain of a second human IL-6 antibody and a CDR3 from the light chain of a third human IL-6 antibody, and CDRs from the heavy chain may be derived from one or more other IL-6 antibodies. Further, the framework regions may be derived from one of the IL-6 antibodies from which one or more of the CDRs are taken or from one or more different human antibodies. Further, the term "chimeric antibody" is intended to encompass any of the above mentioned combinations where the combinations involved human and non-human antibodies.

[0024] The term "compete" means that a first antibody, or an antigen-binding portion thereof, competes for binding with a second antibody, or an antigen-binding portion thereof, where binding of the first antibody with its cognate epitope is detectably decreased in the presence of the second antibody compared to the binding of the first antibody in the

absence of the second antibody. The alternative, where the binding of the second antibody to its epitope is also detectably decreased in the presence of the first antibody, can, but need not be the case. That is, a first antibody can inhibit the binding of a second antibody to its epitope without that second antibody inhibiting the binding of the first antibody to its respective epitope. However, where each antibody detectably inhibits the binding of the other antibody with its cognate epitope or ligand, whether to the same, greater, or lesser extent, the antibodies are said to "cross-compete" with each other for binding of their respective epitope(s). Regardless of the mechanism by which such competition or cross-competition occurs (e.g., steric hindrance, conformational change, or binding to a common epitope, or portion thereof), the skilled artisan would appreciate, based upon the teachings provided herein, that such competing and/or cross-competing antibodies can be useful for the methods disclosed herein.

[0025] The term "conservative amino acid substitution" means an amino acid residue is substituted by another amino acid residue having a side chain R group with similar chemical properties (e.g., charge or hydrophobicity). In general, a conservative amino acid substitution will not substantially change the functional properties of a protein. In cases where two or more amino acid sequences differ from each other by conservative substitutions, the percent sequence identity may be adjusted upwards to correct for the conservative nature of the substitution. Means for making this adjustment are well-known to those of skill in the art. Examples of groups of amino acids that have side chains with similar chemical properties include 1) aliphatic side chains: glycine, alanine, valine, leucine, and isoleucine; 2) aliphatic-hydroxyl side chains: serine and threonine; 3) amide-containing side chains: asparagine and glutamine; 4) aromatic side chains: phenylalanine, tyrosine, and tryptophan; 5) basic side chains: lysine, arginine, and histidine; 6) acidic side chains: aspartic acid and glutamic acid; and 7) sulfur-containing side chains: cysteine and methionine. Conservative amino acids substitution groups can be, for example, valine-leucine-isoleucine, phenylalanine-tyrosine, lysine-arginine, alanine-valine, glutamate-aspartate, and asparagine-glutamine.

[0026] A conservative replacement is also any change having a positive value in the PAM250 log-likelihood matrix disclosed in Gonnet et al., Science 256:1443-45 (1992), incorporated herein by reference. A "moderately conservative" replacement is any change having a non-negative value in the PAM250 log-likelihood matrix.

[0027] "Contacting" refers to bringing an antibody or antigen binding portion thereof and a target IL-6, or epitope thereof, together in such a manner that the antibody can affect

the biological activity of the IL-6. Such "contacting" can be accomplished *in vitro*, e.g., in a test tube, a petri dish, or the like. In a test tube, contacting may involve only an antibody or antigen binding portion thereof and IL-6 or epitope thereof or it may involve whole cells. Cells may also be maintained or grown in cell culture dishes and contacted with antibodies or antigen binding portions thereof in that environment. In this context, the ability of a particular antibody or antigen binding portion thereof to affect an IL-6 related disorder, i.e., the IC₅₀ of the antibody, can be determined before use of the antibody *in vivo* with more complex living organisms. For cells outside the organism, multiple methods exist, and are well-known to those skilled in the art, to contact IL-6 with the antibodies or antigen-binding portions thereof.

[0028] The term "ELISA" refers to an enzyme-linked immunosorbent assay. This kind of assay is well known to those of skill in the art.

[0029] The term "epitope" includes any protein determinant capable of specific binding to an immunoglobulin or T-cell receptor or otherwise interacting with a molecule. Epitopic determinants generally consist of chemically active surface groupings of molecules such as amino acids or carbohydrate or sugar side chains and generally have specific three dimensional structural characteristics, as well as specific charge characteristics. An epitope may be "linear" or "conformational." In a linear epitope, all of the points of interaction between the protein and the interacting molecule (such as an antibody) occur linearly along the primary amino acid sequence of the protein. In a conformational epitope, the points of interaction occur across amino acid residues on the protein that are separated from one another. Once a desired epitope on an antigen is determined, antibodies to that epitope can be generated. An approach to achieve this is to conduct cross-competition studies to find antibodies that competitively bind with one another, i.e., the antibodies compete for binding to the antigen. A high throughput process for "binning" antibodies based upon their cross-competition is described in International Patent Publication No. WO 03/48731.

[0030] The term "expression control sequence" as used herein means polynucleotide sequences that are necessary to effect the expression and processing of coding sequences to which they are ligated. Expression control sequences include appropriate transcription initiation, termination, promoter and enhancer sequences; efficient RNA processing signals such as splicing and polyadenylation signals; sequences that stabilize cytoplasmic mRNA; sequences that enhance translation efficiency (i.e., Kozak consensus sequence); sequences that enhance protein stability; and when desired, sequences that enhance protein secretion. The nature of such control sequences differs

depending upon the host organism; in prokaryotes, such control sequences generally include promoter, ribosomal binding site, and transcription termination sequence; in eukaryotes, generally, such control sequences include promoters and transcription termination sequence. The term "control sequences" is intended to include, at a minimum, all components whose presence is essential for expression and processing, and can also include additional components whose presence is advantageous, for example, leader sequences and fusion partner sequences.

[0031] The term "germline" refers to the nucleotide sequences of the antibody genes and gene segments as they are passed from parents to offspring via the germ cells. This germline sequence is distinguished from the nucleotide sequences encoding antibodies in mature B cells which have been altered by recombination and hypermutation events during the course of B cell maturation.

[0032] The term "human antibody" means any antibody in which the variable and constant domain sequences are human sequences. The term encompasses antibodies with sequences derived from human genes, including those which have been changed, e.g., to decrease possible immunogenicity, increase affinity, eliminate cysteine residues that might cause undesirable folding, etc. The term also encompasses such antibodies produced recombinantly in non-human cells, which might impart glycosylation not typical of human cells. These antibodies may be prepared in a variety of ways.

[0033] The term "humanized antibody" refers to antibodies of non-human origin, wherein the amino acid residues that are characteristic of antibody sequences of the non-human species are replaced with residues found in the corresponding positions of human antibodies. This "humanization" process can reduce the immunogenicity in humans of the resulting antibody. Antibodies of non-human origin can be humanized using any suitable technique well known in the art. The antibody of interest may be engineered by recombinant DNA techniques to substitute the CH1, CH2, CH3, hinge domains, and/or the framework domain with the corresponding human sequence. The term "humanized antibody" further includes within its meaning, chimeric human antibodies and CDR-grafted antibodies. Chimeric human antibodies include the V_H and V_L of an antibody of a non-human species and the C_H and C_L domains of a human antibody. The CDR-transplanted antibodies result from the replacement of CDRs of the V_H and V_L of a human antibody with those of the V_H and V_L , respectively, of an antibody of an animal other than a human.

[0034] The term "isolated polynucleotide" as used herein means a polynucleotide of genomic, cDNA, or synthetic origin or a combination thereof, which by virtue of its origin the

"isolated polynucleotide" (1) is not associated with all or a portion of polynucleotides with which the "isolated polynucleotide" is found in nature, (2) is operably linked to a polynucleotide to which it is not linked in nature, or (3) does not occur in nature as part of a larger sequence.

[0035] The term "isolated protein", "isolated polypeptide" or "isolated antibody" is a protein, polypeptide or antibody that by virtue of its origin or source of derivation: (1) is not associated with naturally associated components that accompany it in its native state; (2) is free of other proteins from the same species; (3) is expressed by a cell from a different species; or (4) does not occur in nature. Thus, a polypeptide that is, e.g., chemically synthesized or synthesized in a cellular system different from the cell from which it naturally originates will be "isolated" from its naturally associated components. A protein may also be rendered substantially free of naturally associated components by isolation, using any suitable protein purification technique.

[0036] Examples of isolated antibodies include an IL-6 antibody that has been affinity purified using IL-6, and an IL-6 antibody that has been synthesized by a cell line *in vitro*.

[0037] The term " K_D " refers to the binding affinity equilibrium constant of a particular antibody-antigen interaction. An antibody is said to specifically bind an antigen when the K_D is ≤ 1 mM, preferably ≤ 100 nM, and most preferably ≤ 10 nM. A K_D binding affinity constant can be measured by surface plasmon resonance, for example using the BIAcore™ system as discussed in EXAMPLE 7.

[0038] The term " k_{off} " refers to the dissociation rate constant of a particular antibody-antigen interaction. A k_{off} dissociation rate constant can be measured by surface plasmon resonance, for example using the BIAcore™ system as discussed in EXAMPLE 7.

[0039] The term "naturally occurring nucleotides" as used herein includes deoxyribonucleotides and ribonucleotides. The term "modified nucleotides" as used herein includes, for example, nucleotides with modified or substituted sugar groups. The term "oligonucleotide linkages" referred to herein includes oligonucleotide linkages such as, for example, phosphorothioate, phosphorodithioate, phosphoroselenoate, phosphorodiselenoate, phosphoroanilothioate, phosphoraniladate, phosphoroamidate. An oligonucleotide can include a label for detection, if desired.

[0040] "Operably linked" sequences include both expression control sequences that are contiguous with the gene of interest and expression control sequences that act in trans or at a distance to control the gene of interest.

[0041] The term "percent sequence identity" in the context of nucleic acid sequences means the residues in two sequences that are the same when aligned for maximum correspondence. The length of sequence identity comparison may be over at least about nine nucleotides, usually at least about 18 nucleotides, more usually at least about 24 nucleotides, typically at least about 28 nucleotides, more typically at least about 32 nucleotides, and at least about 36, 48 or more nucleotides. There are a number of different algorithms known in the art which can be used to measure nucleotide sequence identity. For instance, polynucleotide sequences can be compared using FASTA, Gap or Bestfit, which are programs in Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, which includes, e.g., the programs FASTA2 and FASTA3, provides alignments and percent sequence identity of the regions of the best overlap between the query and search sequences (Pearson, Methods Enzymol. 183:63-98 (1990); Pearson, Methods Mol. Biol. 132:185-219 (2000); Pearson, Methods Enzymol. 266:227-258 (1996); Pearson, J. Mol. Biol. 276:71-84 (1998); incorporated herein by reference). Default parameters for a particular program or algorithm are typically used. For instance, percent sequence identity between nucleic acid sequences can be determined using FASTA with its default parameters (a word size of 6 and the NOPAM factor for the scoring matrix) or using Gap with its default parameters as provided in GCG Version 6.1, incorporated herein by reference.

[0042] A reference to a nucleotide sequence encompasses its complement unless otherwise specified. Thus, a reference to a nucleic acid having a particular sequence should be understood to encompass its complementary strand, with its complementary sequence.

[0043] The term "percent sequence identity" in the context of amino acid sequences means the residues in two sequences that are the same when aligned for maximum correspondence. The length of sequence identity comparison may be over at least about five amino acids, usually at least about 20 amino acids, more usually at least about 30 amino acids, typically at least about 50 amino acids, more typically at least about 100 amino acids, and even more typically about 150, 200 or more amino acids. There are a number of different algorithms known in the art that can be used to measure amino acid sequence identity. For instance, amino acid sequences can be compared using FASTA, Gap or

Bestfit, which are programs in Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin.

[0044] Sequence identity for polypeptides is typically measured using sequence analysis software. Protein analysis software matches sequences using measures of similarity assigned to various substitutions, deletions and other modifications, including conservative amino acid substitutions. For instance, GCG contains programs such as "Gap" and "Bestfit" which can be used with default parameters as specified by the programs to determine sequence homology or sequence identity between closely related polypeptides, such as homologous polypeptides from different species of organisms or between a wild type protein and an analog thereof. See, e.g., GCG Version 6.1 (University of Wisconsin, WI). Polypeptide sequences also can be compared using FASTA using default or recommended parameters, see GCG Version 6.1. FASTA (e.g., FASTA2 and FASTA3) provides alignments and percent sequence identity of the regions of the best overlap between the query and search sequences (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000)). Another algorithm when comparing a sequence to a database containing a large number of sequences from different organisms is the computer program BLAST, especially blastp or tblastn, using default parameters as supplied with the programs. See, e.g., Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul et al., *Nucleic Acids Res.* 25:3389-402 (1997).

[0045] The term "recombinant host cell" (or simply "host cell"), as used herein, means a cell into which a recombinant expression vector has been introduced. It should be understood that "recombinant host cell" and "host cell" mean not only the particular subject cell but also the progeny of such a cell. Because certain modifications may occur in succeeding generations due to either mutation or environmental influences, such progeny may not, in fact, be identical to the parent cell, but are still included within the scope of the term "host cell" as used herein.

[0046] A protein or polypeptide is "substantially pure," "substantially homogeneous," or "substantially purified" when at least about 60 to 75% of a sample exhibits a single species of polypeptide. The polypeptide or protein may be monomeric or multimeric. A substantially pure polypeptide or protein can typically comprise about 50%, 60%, 70%, 80% or 90% w/w of a protein sample, more usually about 95%, and preferably can be over 99% pure. Protein purity or homogeneity may be indicated by any suitable means, such as polyacrylamide gel electrophoresis of a protein sample followed by visualizing a single

polypeptide band upon staining the gel with a stain. As one skilled in the art will appreciate, higher resolution may be provided by using HPLC or other means for purification.

[0047] The term "substantial similarity" or "substantial sequence similarity," when referring to a nucleic acid or fragment thereof, means that when optimally aligned with appropriate nucleotide insertions or deletions with another nucleic acid (or its complementary strand), there is nucleotide sequence identity in at least about 85%, at least about 90%, and at least about 95%, 96%, 97%, 98% or 99% of the nucleotide bases, as measured by any well-known algorithm of sequence identity, such as FASTA, BLAST or Gap, as discussed above.

[0048] As applied to polypeptides, the term "substantial identity" or "substantial similarity" means that two amino acid sequences, when optimally aligned, such as by the programs GAP or BESTFIT using default gap weights as supplied with the programs, share at least 70%, 75% or 80% sequence identity, preferably at least 90% or 95% sequence identity, and more preferably at least 97%, 98% or 99% sequence identity. In certain embodiments, residue positions that are not identical differ by conservative amino acid substitutions.

[0049] The term "surface plasmon resonance" refers to an optical phenomenon that allows for the analysis of real-time biospecific interactions by detection of alterations in protein concentrations within a biosensor matrix, for example using the BIACORE™ system (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden and Piscataway, N.J.). For further descriptions, see Jonsson U. et al., *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26 (1993); Jonsson U. et al., *Biotechniques* 11:620-627 (1991); Jonsson B. et al., *J. Mol. Recognit.* 8:125-131 (1995); and Johnsson B. et al., *Anal. Biochem.* 198:268-277 (1991).

[0050] "Therapeutically effective amount" refers to that amount of the therapeutic agent being administered which will relieve to some extent one or more of the symptoms of the disorder being treated. In reference to the treatment of rheumatoid arthritis, a therapeutically effective amount refers to that amount which has at least one of the following effects: reducing the structural damage of joints; inhibiting (that is, slowing to some extent, preferably stopping) the accumulation of fluid in the joint area; and relieving to some extent (or, preferably, eliminating) one or more symptoms associated with rheumatoid arthritis.

[0051] "Treat", "treating" and "treatment" refer to a method of alleviating or abrogating a biological disorder and/or its attendant symptoms.

[0052] The term "utilizes" with reference to a particular gene means that the amino acid sequence of a particular region in an antibody was ultimately derived from that gene

during B-cell maturation. For example, the phrase “a heavy chain variable region amino acid sequence that utilizes a human V_H-3 family gene” refers to the situation where the V_H region of the antibody was derived from the V_H-3 family of gene segments during B-cell maturation. In human B-cells, there are more than 30 distinct functional heavy chain variable genes with which to generate antibodies. Use of a particular heavy chain variable gene, therefore, is indicative of a binding motif of the antibody-antigen interaction with respect to the combined properties of binding to the antigen and functional activity. As will be appreciated, gene utilization analysis provides only a limited overview of antibody structure. As human B-cells stochastically generate V-D-J heavy or V-J kappa light chain transcripts, there are a number of secondary processes that occur, including, without limitation, somatic hypermutation, additions, and CDR3 extensions. See, for example, Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997).

[0053] The term “vector”, as used herein, means a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. In some cases, the vector is a plasmid, i.e., a circular double stranded piece of DNA into which additional DNA segments may be ligated. For example, the vector is a viral vector, wherein additional DNA segments may be ligated into the viral genome. In another case, the vectors are capable of autonomous replication in a host cell into which they are introduced (e.g., bacterial vectors having a bacterial origin of replication and episomal mammalian vectors). In another example, the vectors (e.g., non-episomal mammalian vectors) can be integrated into the genome of a host cell upon introduction into the host cell, and thereby are replicated along with the host genome. Moreover, certain vectors are capable of directing the expression of genes to which they are operatively linked. Such vectors are referred to herein as “recombinant expression vectors” (or simply, “expression vectors”).

[0054] The terms “label” or “labeled” refers to incorporation of another molecule in the antibody. For example, the label is a detectable marker, e.g., incorporation of a radiolabeled amino acid or attachment to a polypeptide of biotinyl moieties that can be detected by marked avidin (e.g., streptavidin containing a fluorescent marker or enzymatic activity that can be detected by optical or colorimetric methods). In another embodiment, the label or marker can be therapeutic, e.g., a drug conjugate or toxin. Various methods of labeling polypeptides and glycoproteins are known in the art and may be used. Examples of labels for polypeptides include, but are not limited to, the following: radioisotopes or radionuclides (e.g., ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), fluorescent labels (e.g., FITC, rhodamine, lanthanide phosphors), enzymatic labels (e.g., horseradish peroxidase,

β -galactosidase, luciferase, alkaline phosphatase), chemiluminescent markers, biotinyl groups, predetermined polypeptide epitopes recognized by a secondary reporter (e.g., leucine zipper pair sequences, binding sites for secondary antibodies, metal binding domains, epitope tags), magnetic agents, such as gadolinium chelates, toxins such as pertussis toxin, taxol, cytochalasin B, gramicidin D, ethidium bromide, emetine, mitomycin, etoposide, tenoposide, vincristine, vinblastine, colchicine, doxorubicin, daunorubicin, dihydroxy anthracin dione, mitoxantrone, mithramycin, actinomycin D, 1-dehydrotestosterone, glucocorticoids, procaine, tetracaine, lidocaine, propranolol, and puromycin and analogs or homologs thereof. In some cases, labels are attached by spacer arms of various lengths to reduce potential steric hindrance.

Therapeutic Methods of Use

[0055] Also provided are methods for inhibiting IL-6 activity by administering an IL-6 antibody to a patient in need thereof. Any of the antibodies or antigen-binding portions thereof described herein may be used therapeutically. In a preferred embodiment, the IL-6 antibody is a human, chimeric or humanized antibody. In another preferred embodiment, the IL-6 is human and the patient is a human patient. Alternatively, the patient may be a mammal that expresses an IL-6 that the IL-6 antibody cross-reacts with. The antibody may be administered to a non-human mammal expressing IL-6 purposes or as an animal model of human disease. Such animal models may be used for demonstrating the therapeutic efficacy of the antibodies.

[0056] An IL-6 antibody or antibody portion thereof may be administered to a patient who expresses abnormally high levels of IL-6. The antibody may be administered once, or may be administered multiple times. The antibody may be administered from three times daily to once every six months or longer. The administering may be on a schedule such as three times daily, twice daily, once daily, once every two days, once every three days, once weekly, once every two weeks, once every month, once every two months, once every three months and once every six months. The antibody may also be administered continuously via a minipump. The antibody may be administered via a mucosal, buccal, intranasal, inhalable, intravenous, subcutaneous, intramuscular, parenteral, or intratumor route. The antibody may be administered once, at least twice or for at least the period of time until the condition is treated, palliated or cured. The antibody generally will be administered for as long as the condition is present. The antibody will generally be administered as part of a pharmaceutical composition as described herein. The dosage of antibody will generally be

in the range of 0.1 to 100 mg/kg, 0.5 to 50 mg/kg, 1 to 20 mg/kg, and 1 to 10 mg/kg. The serum concentration of the antibody may be measured by any suitable method.

[0057] Also provided are methods for the treatment of abnormal cell infiltration in a mammal, including a human, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of an IL-6 antibody or antigen binding portion thereof, as described herein, that is effective in treating abnormal cell infiltration.

[0058] The IL-6 antibodies or antigen-binding portions thereof can be used to treat rheumatoid arthritis. They also can be used to treat other diseases in which IL-6 is implicated. Examples of other diseases that can be treated using the IL-6 antibodies or antigen binding portions thereof include osteoarthritis, particularly the pain associated with osteoarthritis, Castleman's disease, juvenile idiopathic arthritis, adult-onset Still's disease, osteoporosis, sepsis, multiple myeloma, renal cell carcinoma, and Crohn's disease.

[0059] Some of the diseases that can be treated with the antibodies or antigen-binding portions thereof are discussed below.

[0060] Rheumatoid arthritis (RA) is considered a chronic autoimmune and inflammatory disease producing inflamed joints, which eventually swell, become painful, and experience degradation of cartilage, bone, and ligaments of the joint. A result of RA is deformity, instability, and stiffness of the joint and scarring within the joint. The joints deteriorate at a highly variable rate. Many factors, including genetic predisposition, may influence the pattern of the disease. People with rheumatoid arthritis may have a mild course, occasional flare-ups with long periods of remission without disease, or a steadily progressive disease, which may be slow or rapid. Rheumatoid arthritis may start suddenly, with many joints becoming inflamed at the same time. More often, it starts subtly, gradually affecting different joints. Usually, the inflammation is symmetric, with joints on both sides of the body affected. Typically, the small joints in the fingers, toes, hands, feet, wrists, elbows, and ankles become inflamed first, followed by the knees and hips.

[0061] Rheumatoid arthritic pain is typically a somatic nociceptive joint pain. Swollen wrists can pinch a nerve and result in numbness or tingling due to carpal tunnel syndrome. Cysts may develop behind affected knees, can rupture, causing pain and swelling in the lower legs.

[0062] Osteoarthritis is characterized by loss of articular cartilage and hypertrophy of bone. Onset of osteoarthritis is usually gradual with pain being a common early symptom. As osteoarthritis progresses, joint motion diminishes, and tenderness and grating sensations can occur. Osteoarthritis commonly affects the hands, feet, spine, and large weight-bearing

joints, such as the hips and knees. The diagnosis of osteoarthritis is typically based on symptoms or by X-ray, which can show narrowing of the joint space, increased density of subchondral bone, formation of osteophytes at the periphery of joints, and formation of pseudocysts in the subchondral marrow. Blood tests are performed to exclude other conditions that can mimic osteoarthritis. In addition, in diagnosing osteoarthritis, arthrocentesis can be performed, whereby a sterile needle is used to remove joint fluid. Joint fluid analysis is useful in excluding gout, infection, and other causes of arthritis. Osteoarthritis is also known as degenerative joint disease, degenerative arthritis, or osteoarthritis.

[0063] Reiter's syndrome (reactive arthritis) is inflammation of the joints and tendon attachments at the joints, often accompanied by inflammation of the eye's conjunctiva and the mucous membranes, such as those of the mouth and genitourinary tract, and by a distinctive rash. Reiter's syndrome is also called reactive arthritis because the joint inflammation appears to be a reaction to an infection originating in the intestine or genital tract. This syndrome is most common in men aged 20 to 40. There are two forms of Reiter's syndrome: one occurs with sexually transmitted diseases such as a chlamydial infection and the other usually follows an intestinal infection such as shigellosis or salmonellosis. (Most people who have these infections do not develop Reiter's syndrome.) People who develop Reiter's syndrome after exposure to these infections appear to have a genetic predisposition to this type of reaction, related in part to the same gene found in people who have ankylosing spondylitis.

[0064] Infectious arthritis is inflammation in a joint resulting from bacterial, fungal, or viral infection of synovial or periarticular tissues. Risk factors for infectious arthritis include advanced age (i.e., greater than 60 years); alcoholism; anemia; arthrocentesis or surgery; chronic medical illness (e.g., lung or liver disease); diabetes; hemophilia; immunodeficiency, including HIV; immunosuppressive therapy, including corticosteroids; IV drug use; malignancy; prosthetic joint implant; renal failure; rheumatoid arthritis; sickle cell disease; skin infections; and systemic lupus erythematosus. Patients with rheumatoid arthritis are at particularly increased risk for bacterial arthritis. Joint infections may be acute, with sudden onset of joint pain and swelling (e.g., within a few hours to a few days), or chronic, with insidious development of milder symptoms. Acute bacterial arthritis is commonly accompanied by moderate to severe joint pain, warmth, tenderness, and restricted motion. Chronic bacterial arthritis is commonly accompanied by gradual swelling, mild warmth, minimal or no redness of the joint area, and aching pain, which may be mild.

[0065] Psoriatic arthritis is an inflammatory arthritis affecting the joints that occurs in a minority of psoriasis patients and increasingly in some acquired immune deficiency syndrome (AIDS) patients. Psoriatic arthritis may be mild or may produce severe joint deformities resembling joint changes observed in rheumatoid arthritis. Joints that may be affected by psoriatic arthritis include distal interphalangeal (DIP) joints of fingers and toes, and commonly the asymmetric involvement of large and small joints such as sacroiliacs and spine. Psoriasis of the skin or nails may precede or follow joint involvement. The time course of psoriatic arthritis is characterized by arthritic exacerbations and remissions that may or may not coincide with skin exacerbations and remissions, and progression to chronic arthritis may occur. Diagnosis includes a diagnosis of psoriasis, a family history of psoriasis, X-ray findings showing DIP joint involvement, asymmetric large joint involvement, a negative blood test for rheumatoid factor to rule out rheumatoid arthritis, and, in some patients, the presence of HLA-B27 antigen, especially when the spine is involved.

[0066] Polyarthritis is any type of arthritis which involves five or more joints. Arthritis of two, three or four joints is called oligoarthritis or pauciarthritis. Polyarthritis is most often caused by an autoimmune disorder such as rheumatoid arthritis, psoriatic arthritis, or lupus erythematosus, but can also be caused by infections. Polyarthritis may be experienced at any age and is not gender specific.

[0067] Juvenile arthritis is arthritis that begins before age 16. There are several different types of juvenile arthritis. The most common type is juvenile rheumatoid arthritis (JRA), also known as juvenile idiopathic arthritis. JRA includes systemic onset JRA, pauciarticular JRA, which involves fewer than five joints, and polyarticular JRA, which affects five or more joints. Diagnosis of JRA involves considering the symptoms, taking x-rays and doing blood analyses. Specific tests that doctor may use to diagnose JRA include complete blood counts, blood cultures for infections, bone marrow examinations, examination of erythrocyte sedimentation rate, rheumatoid factor antibody determination, antinuclear antibody determination, and bone scans.

[0068] Juvenile rheumatoid arthritis is persistent or recurring inflammation of the joints similar to rheumatoid arthritis but beginning before age 16 and is characterized by inflammation of joints or connective tissue. There are several types of juvenile rheumatoid arthritis, which are determined by the symptoms that develop during the first months of the disease and how many joints are affected. These types include pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis, polyarthritis, and systemic disease (Still's disease). In pauciarticular juvenile rheumatoid arthritis, four or fewer joints, usually those of the leg are affected. In

polyarthritis, five or more (sometimes as many as 20 to 40) joints are affected. In systemic disease (Still's disease), any number of joints can be involved.

[0069] Juvenile reactive arthritis is persistent or recurring inflammation of the joints similar to reactive arthritis but beginning before age 16.

[0070] Juvenile psoriatic arthritis is psoriatic arthritis that begins in a patient before the age of 16 years and is characterized by the presence of chronic arthritis and psoriasis; or chronic arthritis and at least two of the following: dactylitis, nail abnormalities (e.g., pitting or onycholysis), and a family history of psoriasis in at least one immediate relative. As in adults with psoriatic arthritis, the arthritis may precede the skin condition. The predominant pattern at onset of juvenile psoriatic arthritis is an asymmetric oligoarthritis of small and large joints often with dactylitis.

[0071] In one aspect, the IL-6 mediated disorder is characterized by fibrosis. The term "fibrosis" as used herein refers to a pathological condition characterized by excessive deposition and metabolism of fibrotic material (e.g., extracellular matrix) in response to tissue damage. In many cases, fibrosis represents a normal repair process (i.e., wound healing) gone awry due to chronic or excessive tissue insult leading to fibroblast or stellate cell activation and proliferation and collagen accumulation. Fibrosis conditions include fibroproliferative disorders that are associated with vascular diseases, such as cardiac disease, cerebral disease, and peripheral vascular disease, as well as all the main tissues and organ systems such as the eye, skin, kidney, lung, gut and liver (Wynn, *Nature Reviews* 4:583-594 (2004); Bataller, R and Brenner, D., *J. Clin. Invest.* 115:209-218 (2005)). Other sources are chemotherapeutic drugs, radiation-induced fibrosis, and injuries and burns. While fibrosis conditions cover a wide group of pathologies, it is believed that for most of these conditions, the general mechanisms leading to fibrotic tissue accumulation have many elements in common. Often the condition is initiated in response to an influx of inflammatory cells and perpetuated by the subsequent cytokine signaling pathways between the infiltrating cells (e.g., macrophages, T cells) and resident cells within the tissue (e.g., stellate, myofibroblast, Kupffer cells). In addition, pericytes are a key fibrogenic cell type involved in the development of scleroderma and PDGF receptor tyrosine kinase inhibitors (RTKI) have been shown to slow the proliferation of pericytes and suppress skin lesions in patients with this progressive disease. In the kidney, leukocyte infiltration plays a major role in mediating tubulointerstitial inflammation and fibrosis in chronic kidney disease.

[0072] As used herein the term "fibrosis" is also used synonymously with "fibroblast accumulation and collagen deposition". Fibroblasts are connective tissue cells, which are

dispersed in connective tissue throughout the body. Fibroblasts secrete a nonrigid extracellular matrix containing type I and/or type III collagen. In response to an injury to a tissue, nearby fibroblasts or stellate cells migrate into the wound, proliferate, and produce large amounts of collagenous extracellular matrix. Collagen is a fibrous protein rich in glycine and proline that is a major component of the extracellular matrix and connective tissue, cartilage, and bone. Collagen molecules are triple-stranded helical structures called α -chains, which are wound around each other in a ropelike helix. Collagen exists in several forms or types; of these, type I, the most common, is found in skin, tendon, and bone; and type III is found in skin, blood vessels, and internal organs. Exemplary fibrosis conditions include, but are not limited to

- (I) Lung diseases associated with fibrosis, e.g., idiopathic pulmonary fibrosis, radiation induced fibrosis, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), scleroderma, bleomycin induced pulmonary fibrosis, chronic asthma, silicosis, asbestos induced pulmonary fibrosis, acute lung injury and acute respiratory distress (including bacterial pneumonia induced, trauma induced, viral pneumonia induced, ventilator induced, non-pulmonary sepsis induced, and aspiration induced) ;
- (II) Chronic nephropathies associated with injury/fibrosis (kidney fibrosis), e.g., lupus, diabetes, scleroderma, glomerular nephritis, focal segmental glomerular sclerosis, IgA nephropathy, hypertension, allograft, Lupus, and Alport;
- (III) Gut fibrosis, e.g., scleroderma, and radiation induced gut fibrosis;
- (IV) Liver fibrosis, e.g., cirrhosis, alcohol induced liver fibrosis, nonalcoholic steatohepatitis (NASH), biliary duct injury, primary biliary cirrhosis, infection or viral induced liver fibrosis (e.g. chronic HCV infection), and autoimmune hepatitis;
- (V) Head and neck fibrosis, e.g., radiation induced;
- (VI) Corneal scarring, e.g., LASIX™, corneal transplant, and trabeculectomy;
- (VII) Hypertrophic scarring and keloids, e.g., burn induced and surgical; and other fibrotic diseases, e.g., sarcoidosis, scleroderma, spinal cord injury/fibrosis, myelofibrosis, vascular restenosis, atherosclerosis, Wegener's granulomatosis, mixed connective tissue disease, and Peyronie's disease.

[0073] The term "fibromyalgia" is also known as fibromyalgia syndrome. The American College of Rheumatology (ACR) 1990 classification criteria for fibromyalgia include a history of chronic, widespread pain for more than three months, and the presence

of pain at 11 (or more) out of 18 tender points upon physical examination, wherein the tender points occur both above and below the waist and on both sides of the body (see e.g., Wolfe et al., *Arthritis Rheum.*, 1990;33:160-172). Fibromyalgia patients generally display pain perception abnormalities in the form of both allodynia (pain in response to a normally non-painful stimulus) and hyperalgesia (an increased sensitivity to a painful stimulus). The effects of fibromyalgia in a human patient may be assessed using the ACR criteria, a Fibromyalgia Index Questionnaire (FIQ) total score, indices of pain severity (e.g., VAS or Likert pain scales) and interference, the number of tender points, or a pain threshold assessment.

[0074] Although chronic, widespread pain is a hallmark symptom of fibromyalgia, patients typically also exhibit other symptoms, including one or more of the following: fatigue, sleep disturbances, migraine or tension headaches, irritable bowel syndrome, changes in urinary frequency, morning stiffness, numbness and tingling, dysmenorrhea, multiple chemical sensitivities, difficulty concentrating, and circulatory problems that affect the small blood vessels of the skin (Raynaud's phenomenon). As with many conditions that cause chronic pain, fibromyalgia patients may also experience fibromyalgia-induced anxiety, depression, or both. Some fibromyalgia patients find that cold, damp weather, emotional stress, overexertion, and other factors exacerbate their symptoms.

[0075] Pain associated with fibromyalgia refers to any pain associated with fibromyalgia syndrome, including the chronic, widespread pain that is a hallmark of fibromyalgia and pain associated with other symptoms of fibromyalgia.

[0076] Ankylosing spondylitis is a rheumatic disease that causes arthritis of the spine and sacroiliac joints. It varies from intermittent episodes of back pain that occur throughout life to a severe chronic disease that attacks the spine, peripheral joints and other body organs. Typically, the first symptoms are frequent pain and stiffness in the lower back and buttocks, which comes on gradually over the course of a few weeks or months. The pain is usually dull and diffuse, rather than localized. Ankylosing spondylitis is typically diagnosed with a thorough physical exam including x-rays, individual medical history, and a family history of ankylosing spondylitis, as well as blood work including a test for HLA-B27.

[0077] Psoriasis is a chronic inflammatory skin disorder that may afflict people of all ages. Clinically, psoriasis most frequently affects the skin of the elbows, knees, scalp, lumbosacral areas, intergluteal cleft, or glans penis. Skin affected by psoriasis typically contains one or more dry lesions comprised of a well-demarcated, pink to salmon-colored plaque covered by loosely adherent scales that are characteristically silver-white in color. In

about 30% of psoriasis patients, the nails are also affected by, for example, pitting or onycholysis. All forms of psoriasis are contemplated, including psoriasis annularis and psoriasis annulata, which are also known as psoriasis circinata; psoriasis arthropica; psoriasis diffusa or diffused psoriasis; exfoliative psoriasis; flexural psoriasis; psoriasis geographica; psoriasis gyrate; psoriasis nummularis; palmar psoriasis; psoriasis punctata; and a rare variant form known as generalized pustular psoriasis of Zambusch or simply just pustular psoriasis. Morphologically, established lesions of psoriasis have well known histologic characteristics such as epidermal thickening and parakeratotic scale. Pathologically, psoriasis is currently believed to be a T-cell mediated autoimmune disorder. Onset of psoriasis is usually gradual and the typical time course is characterized by chronic remissions and recurrences and, occasionally, acute exacerbations. Diagnosis of psoriasis is made by evaluating a patient's clinical signs and symptoms and family history of psoriasis. Diagnosing psoriasis by just visually inspecting the patient's skin lesions is rarely difficult and usually this is all that is required for a complete diagnosis. Occasionally, however, a skin biopsy is subjected to a histologic analysis to look for signs of psoriasis.

[0078] Systemic lupus erythematosus ("SLE"), also called disseminated lupus erythematosus, is a chronic inflammatory connective tissue disorder of unknown cause that can involve joints, kidneys, serous surfaces, and vessel walls and that occurs predominantly in young women but also in children. Ninety percent of SLE cases occur in women. SLE may begin abruptly with fever, simulating acute infection, or may develop insidiously over months or years with episodes of fever and malaise. Vascular headaches, epilepsy, or psychoses may be initial findings. Manifestations referable to any organ system may appear. Articular symptoms, ranging from intermittent arthralgias to acute polyarthritis, occur in approximately 90% of patients and may exist for years before other manifestations appear. In long-standing disease, capsular insertional erosions at the metacarpophalangeal joints with marked secondary joint deformity may occur without x-ray evidence of obvious marginal erosions (Jaccoud's arthritis). However, most lupus polyarthritis is nondestructive and nondeforming.

[0079] Systemic lupus erythematosus is rare under the age of 5, and most children with SLE develop the disease during adolescence. Signs and symptoms of juvenile SLE are similar to those in adults. However, children have a particularly high level of transition from the discoid to the systemic disease.

[0080] Gout (also known as gouty arthritis) is recurrent acute or chronic arthritis of peripheral joints results from a build-up in the body of too much uric acid, which forms

crystals that deposit in joints and cause inflammation. During an acute attack of gout there is swelling, inflammation, and extreme pain in a joint, frequently that of the big toe. Chronic gout can set in after several years of attacks, permanently damaging and deforming joints and destroying cells of the kidney. Most cases occur in men and the first attack rarely occurs before the age of 30.

[0081] Undifferentiated Spondyloarthropathy (USpA) is a term used to describe symptoms and signs of spondylitis in someone who does not meet the criteria for a definitive diagnosis of ankylosing spondylitis or related disease. A number of well-established syndromes are included within the spondyloarthropathy family including ankylosing spondylitis, psoriatic arthritis, the arthritis of inflammatory bowel disease, Reiter's syndrome, chronic reactive arthritis and enthesitis related juvenile arthritis. Over time, some people with USpA will develop a well-defined form of spondylitis such as ankylosing spondylitis.

[0082] Juvenile-onset spondyloarthritis (JSpA), also known as Juvenile Spondyloarthropathy, is the medical term for a group of childhood rheumatic diseases, which cause arthritis before the age of 16 and may span through adult life. The juvenile spondyloarthropathies include undifferentiated spondyloarthropathy, juvenile ankylosing spondylitis, juvenile psoriatic arthritis, the arthritis associated with inflammatory bowel disease (enteropathogenic arthritis), reactive arthritis, (Reiter's syndrome is one type of reactive arthritis), and the SEA syndrome (seronegativity, enthesopathy, arthropathy). JSpA typically causes pain and inflammation in the joints in the lower part of the body, for example, the pelvis, hips, knees and ankles. Other areas of the body can also be affected, such as the spine, eyes, skin and bowels. Fatigue and lethargy can also occur.

[0083] Crohn's disease is a nonspecific chronic transmural inflammatory disease that most commonly affects the distal ileum and colon but may occur in any part of the GI tract. Chronic diarrhea with abdominal pain, fever, anorexia, weight loss, and a right lower quadrant mass or fullness are the most common symptoms of Crohn's disease. Less common symptoms include poor appetite, fever, night sweats, rectal pain, and rectal bleeding. Crohn's disease may affect the colon, the rectum, and the small intestine and, in rare instances, also the stomach, mouth, and esophagus. The most common patterns of Crohn's disease pathology are (1) inflammation characterized by right lower quadrant abdominal pain and tenderness; (2) recurrent partial obstruction caused by intestinal stenosis and leading to severe colic, abdominal distention, constipation, and vomiting; (3) diffuse jejunoileitis, with inflammation and obstruction resulting in malnutrition and chronic debility; and (4) abdominal fistulas and abscesses, usually late developments, often causing

fever, painful abdominal masses, and generalized wasting. Crohn's disease should be suspected in a patient with the inflammatory or obstructive symptoms described above and in a patient without prominent GI symptoms but with perianal fistulas or abscesses or with otherwise unexplained arthritis, erythema nodosum, fever, anemia, or stunted growth (in a child). Laboratory findings are nonspecific and may include anemia, leukocytosis, hypoalbuminemia, and increased levels of acute-phase reactants reflected in elevated ESR, C-reactive protein, or orosomucoids. Elevated alkaline phosphatase and γ -glutamyl transpeptidase accompanying colonic disease often reflect primary sclerosing cholangitis. Diagnosis is usually made by x-ray.

[0084] In advanced cases, the string sign may be seen with marked ileal strictures and separation of bowel loops. In earlier cases, x-ray diagnosis may sometimes be difficult, but air double-contrast barium enema and enteroclysis may show superficial aphthous and linear ulcers. Colonoscopy and biopsy may help confirm the diagnosis of Crohn's colitis and allow direct visualization and biopsy of the terminal ileum. Upper GI endoscopy may identify gastroduodenal involvement in Crohn's disease patients with upper GI symptoms.

[0085] Ulcerative colitis is a chronic, inflammatory, and ulcerative disease arising in the colonic mucosa, characterized most often by bloody diarrhea. Bloody diarrhea of varied intensity and duration is interspersed with asymptomatic intervals are the most common symptoms of ulcerative colitis. Usually an attack begins insidiously, with increased urgency to defecate, mild lower abdominal cramps, and blood and mucus in the stools. However, an attack may be acute and fulminant, with sudden violent diarrhea, high fever, signs of peritonitis, and profound toxemia. Some cases develop following a documented infection (e.g., amebiasis, bacillary dysentery). When ulceration is confined to the rectosigmoid, the stool may be normal or hard and dry, but rectal discharges of mucus loaded with red blood cells and white blood cells accompany or occur between bowel movements. Systemic symptoms are mild or absent. If ulceration extends proximally, stools become looser and the patient may have > 10 bowel movements/day, often with severe cramps and distressing rectal tenesmus, without respite at night. The stools may be watery, may contain mucus, and frequently consist almost entirely of blood and pus. Malaise, fever, anemia, anorexia, weight loss, leukocytosis, and hypoalbuminemia may be present with extensive active ulcerative colitis. The patient's history and stool examination permit a presumptive diagnosis of ulcerative colitis that should always be confirmed by sigmoidoscopy, which provides a direct, immediate indication of disease activity. In early cases, the mucous membrane is finely granular and friable, with loss of the normal vascular pattern and often with scattered

hemorrhagic areas; minimal trauma (friability) causes bleeding in multiple pinpoint spots. The mucosa soon breaks down into a red, spongy surface dotted with many tiny blood- and pus-oozing ulcers. As the mucosa becomes progressively involved, the inflammation and hemorrhage extend into the bowel muscle. Large mucosal ulcers with copious purulent exudate characterize severe disease. Islands of relatively normal or hyperplastic inflammatory mucosa (pseudopolyps) project above areas of ulcerated mucosa. Biopsies may be nonspecific and sometimes cannot exclude acute infectious (self-limited) colitis; however, features that suggest chronicity (e.g., distorted crypt architecture, crypt atrophy, a chronic inflammatory infiltrate) support the diagnosis of ulcerative colitis. Even during asymptomatic intervals, the sigmoidoscopic appearance is rarely normal; some degree of friability or granularity almost always persists. There is loss of the normal vascular pattern, and biopsy shows evidence of chronic inflammation. Plain x-rays of the abdomen sometimes help to judge the severity and proximal extent of the colitis by showing loss of haustration, mucosal edema, and absence of formed stool in the diseased bowel. Later in the course of disease, however, the entire colon should be evaluated to determine the extent of involvement. Total colonoscopy is the most sensitive and widely used method, although barium enema can be informative. Colonoscopy with biopsy is mandatory to evaluate the nature of a stricture. Biopsy may also help distinguish ulcerative colitis from Crohn's disease if the inflammation is highly focal or if a granuloma is seen.

[0086] Irritable bowel syndrome (IBS) is a motility disorder involving the entire GI tract, causing recurring upper and lower GI symptoms, including variable degrees of abdominal pain, constipation and/or diarrhea, and abdominal bloating. The cause of irritable bowel syndrome (IBS) is unknown. No anatomic cause can be found. Emotional factors, diet, drugs, or hormones may precipitate or aggravate heightened GI motility. Features of IBS are pain relieved by defecation, an alternating pattern of bowel habits, abdominal distention, mucus in the stool, and sensation of incomplete evacuation after defecation. In general, the character and location of pain, precipitating factors, and defecatory pattern are distinct for each patient. Patients with IBS may also have extraintestinal symptoms (e.g., fibromyalgia, headaches, dyspareunia, temporomandibular joint syndrome). Two major clinical types of IBS have been described. In constipation-predominant IBS, constipation is common, but bowel habits vary. Most patients have pain over at least one area of the colon, associated with periodic constipation alternating with a more normal stool frequency. Stool often contains clear or white mucus. The pain is either colicky, coming in bouts, or a continuous dull ache; it may be relieved by a bowel movement. Eating commonly triggers

symptoms. Bloating, flatulence, nausea, dyspepsia, and pyrosis can also occur. Diarrhea-predominant IBS is characterized by precipitous diarrhea that occurs immediately on rising or during or immediately after eating. Nocturnal diarrhea is unusual. Pain, bloating, and rectal urgency are common, and incontinence may occur. Diagnosis of IBS is based on characteristic bowel patterns, time and character of pain, and exclusion of other disease processes through physical examination and routine diagnostic tests. Due to a lack of a readily identifiable structural or biochemical abnormality in this syndrome, the medical community has developed a consensus definition and criteria, known as the Rome criteria, to aid in diagnosis of IBS. According to the Rome criteria, IBS is indicated by abdominal pain or discomfort which is (1) relieved by defecation and/or (2) associated with a change in frequency or consistency of stools, plus two or more of the following: altered stool frequency, altered stool formation, altered stool passage, passage of mucus, and bloating or feeling of abdominal distention. Palpation of the abdomen may reveal tenderness, particularly in the left lower quadrant, at times associated with a palpable, tender sigmoid. A routine digital rectal examination should be performed on all patients, and a pelvic examination on women.

[0087] Irritable bowel disease (IBD), also known as inflammatory bowel disease, is characterized by chronic inflammation at various sites in the GI tract. IBD comprises two known clinical subtypes, Crohn's Disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Certain differences in disease patterns justify a distinction between Crohn's disease and ulcerative colitis.

[0088] Pain associated with IBD and IBS may present as either chronic or acute pain. For example a feature of IBS is acute pain relieved by defecation while chronic abdominal pain is typical of Crohn's disease. While pain associated with IBD and IBS may occur extraintestinal or extravisceral generally these ailments produce visceral pain. Visceral pain is pain associated with the viscera, which encompasses the organs of the abdominal cavity. These organs include the sex organs, spleen intestines, colon, rectum and other organs of the digestive system. Visceral pain has five important clinical characteristics: (1) it is not evoked from all viscera (organs such as liver, kidney, most solid viscera, and lung parenchyma are not sensitive to pain); (2) it is not always linked to visceral injury; (3) it is diffuse and poorly localized; (4) it is referred to other locations; and (5) it is accompanied with motor and autonomic reflexes, such as the nausea, vomiting, and lower-back muscle tension that occurs in renal colic.

[0089] Pain is an important physiological protective mechanism designed to warn of danger from potentially injurious stimuli from the external environment. The system operates through a specific set of primary sensory neurones and is activated by noxious stimuli *via* peripheral transducing mechanisms (see Millan, 1999, Prog. Neurobiol., 57, 1-164 for a review). These sensory fibers are known as nociceptors and are characteristically small diameter axons with slow conduction velocities. Nociceptors encode the intensity, duration and quality of noxious stimulus and by virtue of their topographically organized projection to the spinal cord, the location of the stimulus. The nociceptors are found on nociceptive nerve fibers of which there are two main types, A-delta fibers (myelinated) and C fibers (non-myelinated). The activity generated by nociceptor input is transferred, after complex processing in the dorsal horn, either directly, or via brain stem relay nuclei, to the ventrobasal thalamus and then on to the cortex, where the sensation of pain is generated.

[0090] Pain may generally be classified as acute or chronic. Acute pain begins suddenly and is short-lived (usually twelve weeks or less). It is usually associated with a specific cause such as a specific injury and is often sharp and severe. It is the kind of pain that can occur after specific injuries resulting from surgery, dental work, a strain or a sprain. Acute pain does not generally result in any persistent psychological response. In contrast, chronic pain is long-term pain, typically persisting for more than three months and leading to significant psychological and emotional problems. Common examples of chronic pain are neuropathic pain (e.g. painful diabetic neuropathy, postherpetic neuralgia), carpal tunnel syndrome, back pain, headache, cancer pain, arthritic pain and chronic post-surgical pain.

[0091] When a substantial injury occurs to body tissue, *via* disease or trauma, the characteristics of nociceptor activation are altered and there is sensitisation in the periphery, locally around the injury and centrally where the nociceptors terminate. These effects lead to a heightened sensation of pain. In acute pain these mechanisms can be useful, in promoting protective behaviors which may better enable repair processes to take place. The normal expectation would be that sensitivity returns to normal once the injury has healed. However, in many chronic pain states, the hypersensitivity far outlasts the healing process and is often due to nervous system injury. This injury often leads to abnormalities in sensory nerve fibers associated with maladaptation and aberrant activity (Woolf & Salter, 2000, Science, 288, 1765-1768).

[0092] Clinically, pain is present when discomfort and abnormal sensitivity feature among the patient's symptoms. Patients tend to be quite heterogeneous and may present with various pain symptoms. Such symptoms include: 1) spontaneous pain which may be

dull, burning, or stabbing; 2) exaggerated pain responses to noxious stimuli (hyperalgesia); and 3) pain produced by normally innocuous stimuli (allodynia - Meyer et al., 1994, Textbook of Pain, 13-44). Although patients suffering from various forms of acute and chronic pain may have similar symptoms, the underlying mechanisms may be different and may, therefore, require different treatment strategies. Pain can also therefore be divided into a number of different subtypes according to differing pathophysiology, including nociceptive, inflammatory and neuropathic pain.

[0093] Nociceptive pain is induced by tissue injury or by intense stimuli with the potential to cause injury. Pain afferents are activated by transduction of stimuli by nociceptors at the site of injury and activate neurons in the spinal cord at the level of their termination. This is then relayed up the spinal tracts to the brain where pain is perceived (Meyer et al., 1994, Textbook of Pain, 13-44). The activation of nociceptors activates two types of afferent nerve fibers. Myelinated A-delta fibers transmit rapidly and are responsible for sharp and stabbing pain sensations, while unmyelinated C fibers transmit at a slower rate and convey a dull or aching pain. Moderate to severe acute nociceptive pain is a prominent feature of pain from central nervous system trauma, strains/sprains, burns, myocardial infarction and acute pancreatitis, post-operative pain (pain following any type of surgical procedure), posttraumatic pain, renal colic, cancer pain and back pain. Cancer pain may be chronic pain such as tumor related pain (e.g. bone pain, headache, facial pain or visceral pain) or pain associated with cancer therapy (e.g. postchemotherapy syndrome, chronic postsurgical pain syndrome or post radiation syndrome). Cancer pain may also occur in response to chemotherapy, immunotherapy, hormonal therapy or radiotherapy. Back pain may be due to herniated or ruptured intravertebral discs or abnormalities of the lumbar facet joints, sacroiliac joints, paraspinal muscles or the posterior longitudinal ligament. Back pain may resolve naturally but in some patients, where it lasts over 12 weeks, it becomes a chronic condition which can be particularly debilitating.

[0094] Neuropathic pain is currently defined as pain initiated or caused by a primary lesion or dysfunction in the nervous system. Nerve damage can be caused by trauma and disease and thus the term 'neuropathic pain' encompasses many disorders with diverse aetiologies. These include, but are not limited to, peripheral neuropathy, diabetic neuropathy, post herpetic neuralgia, trigeminal neuralgia, back pain, cancer neuropathy, HIV neuropathy, phantom limb pain, carpal tunnel syndrome, central post-stroke pain and pain associated with chronic alcoholism, hypothyroidism, uremia, multiple sclerosis, spinal cord injury, Parkinson's disease, epilepsy and vitamin deficiency. Neuropathic pain is

pathological as it has no protective role. It is often present well after the original cause has dissipated, commonly lasting for years, significantly decreasing a patient's quality of life (Woolf and Mannion, 1999, *Lancet*, 353, 1959-1964). The symptoms of neuropathic pain are difficult to treat, as they are often heterogeneous even between patients with the same disease (Woolf & Decosterd, 1999, *Pain Supp.*, 6, S141-S147; Woolf and Mannion, 1999, *Lancet*, 353, 1959-1964). They include spontaneous pain, which can be continuous, and paroxysmal or abnormal evoked pain, such as hyperalgesia (increased sensitivity to a noxious stimulus) and allodynia (sensitivity to a normally innocuous stimulus).

[0095] The inflammatory process is a complex series of biochemical and cellular events, activated in response to tissue injury or the presence of foreign substances, which results in swelling and pain (Levine and Taiwo, 1994, *Textbook of Pain*, 45-56). Arthritic pain is the most common inflammatory pain. Rheumatoid disease is one of the commonest chronic inflammatory conditions in developed countries and rheumatoid arthritis is a common cause of disability. The exact aetiology of rheumatoid arthritis is unknown, but current hypotheses suggest that both genetic and microbiological factors may be important (Grennan & Jayson, 1994, *Textbook of Pain*, 397-407). It has been estimated that almost 16 million Americans have symptomatic osteoarthritis (OA) or degenerative joint disease, most of whom are over 60 years of age, and this is expected to increase to 40 million as the age of the population increases, making this a public health problem of enormous magnitude (Houge & Mersfelder, 2002, *Ann Pharmacother.*, 36, 679-686; McCarthy et al., 1994, *Textbook of Pain*, 387-395). Most patients with osteoarthritis seek medical attention because of the associated pain. Arthritis has a significant impact on psychosocial and physical function and is known to be the leading cause of disability in later life. Ankylosing spondylitis is also a rheumatic disease that causes arthritis of the spine and sacroiliac joints. It varies from intermittent episodes of back pain that occur throughout life to a severe chronic disease that attacks the spine, peripheral joints and other body organs.

[0096] Another type of inflammatory pain is visceral pain which includes pain associated with inflammatory bowel disease (IBD). Visceral pain is pain associated with the viscera, which encompass the organs of the abdominal cavity. These organs include the sex organs, spleen and part of the digestive system. Pain associated with the viscera can be divided into digestive visceral pain and non-digestive visceral pain. Commonly encountered gastrointestinal (GI) disorders that cause pain include functional bowel disorder (FBD) and inflammatory bowel disease (IBD). These GI disorders include a wide range of disease states that are currently only moderately controlled, including, in respect of FBD, gastro-

esophageal reflux, dyspepsia, irritable bowel syndrome (IBS) and functional abdominal pain syndrome (FAPS), and, in respect of IBD, Crohn's disease, ileitis and ulcerative colitis, all of which regularly produce visceral pain. Other types of visceral pain include the pain associated with dysmenorrhea, cystitis and pancreatitis and pelvic pain.

[0097] It should be noted that some types of pain have multiple aetiologies and thus can be classified in more than one area, e.g. back pain and cancer pain have both nociceptive and neuropathic components.

[0098] Other types of pain include:

- pain resulting from musculo-skeletal disorders, including myalgia, fibromyalgia, spondylitis, sero-negative (non-rheumatoid) arthropathies, non-articular rheumatism, dystrophinopathy, glycogenolysis, polymyositis and pyomyositis;
- heart and vascular pain, including pain caused by angina, myocardial infarction, mitral stenosis, pericarditis, Raynaud's phenomenon, scleroderma and skeletal muscle ischemia;
- head pain, such as migraine (including migraine with aura and migraine without aura), cluster headache, tension-type headache mixed headache and headache associated with vascular disorders; and
- orofacial pain, including dental pain, otic pain, burning mouth syndrome and temporomandibular myofascial pain.

[0099] IL-6 antibodies or antigen-binding portions thereof can be used in combination with one or more other therapeutic agents. For example, an antibody or antigen-binding portions thereof can be used with a COX-2 inhibitor, such as celecoxib, for the treatment of diseases such as rheumatoid arthritis, osteoarthritis and pain. IL-6 antibodies or antigen-binding portions thereof and the other therapeutic agents can be administered to the patient in the same dosage form or in different dosage forms. Moreover, they can be administered at the same time or at different times. Below are some examples of therapeutic agents that can be used in combination with anti-IL-6 antibodies or antigen-binding portions thereof.

Rheumatoid arthritis

[0100] IL-6 antibodies and antigen binding portions thereof may also be used in co-therapies. Suitable antiinflammatory co-therapy compounds include:

cyclosporine, zoledronic acid, efalizumab, alefacept, etodolac, lornoxicam, OM-89, valdecoxib, tocilizumab, abatacept, meloxicam, etanercept, nambumetone, rimexolone, ¹⁵³Sm-EDTMP, prosorba, imidazole salicylate, oprelvekin, hylauronic acid, naproxen, piroxicam, diacerein, lumericoxib, tacrolimus, aceclofenac, actarit, tenoxicam, rosiglitazone, deflazacort, adalimumab, leflunomide, risedronate sodium, misoprostol and diclofenac, SK-1306X, infliximab, anakinra, celecoxib, diclofenac, etoricoxib and felbinac, reumacon, golimumab, denosumab, ofatumumab, 10rT1 antibody, pelubiprofen, licofelone, temsirolimus, eculizumab, iguratimod, and prednisone. Other suitable antiinflammatories include CP-481715, ABN-912, MLN-3897, HuMax-IL-15, RA-1, paclitaxel, Org-37663, Org 39141, AED-9056, AMG-108, fontolizumab, pegsunercept, pralnacasan, apilimod, GW-274150, AT-001, 681323 (GSK) K-832, R-1503, ocrelizumab, DE-096, Cpn10, THC+CBD (GW Pharma), 856553 (GSK), ReN-1869, immunoglobulin, mm-093, amelubant, SCIO-469, ABT-874, LenkoVAX, LY-2127399, TRU-015, KC-706, amoxapinet and dipyridamole, TAK-715, PG 760564, VX-702, prednisolone and dipyridamole, PMX-53, belimumab, prinaberel, CF-101, tgAAV-TNFR:Fc, R-788, prednisolone and SSRI, CP-690550 and PMI-001.

Osteoarthritis

[0101] IL-6 antibodies and antigen binding portions thereof may further be co-administered for the treatment of osteoarthritis with one or more agents useful for treating one or more indicia of osteoarthritis. Examples of agents useful for treating one or more indicia of osteoarthritis to be used in combination with anti-IL-6 antibodies or antigen-binding portions thereof include matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors, aggrecanase inhibitors, inducible nitric oxide (iNOS) inhibitors, inhibitors of insulin-like growth factor (IGF) expression or activity, inhibitors of fibroblast growth factor (FGF) expression or activity, inhibitors of CD 44 expression or activity, inhibitors of interleukin (IL) expression or activity, inhibitors of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) expression or activity, inhibitors of tumor necrosis factor-inducible protein 6 (TSG-6) expression or activity, inhibitors of Bikunin expression or activity, inhibitors of beta-secretase (BACE), inhibitors of PACE-4, inhibitors of nuclear receptor rev-ErbA alpha (NR1D1) expression or activity, inhibitors of endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1 (EDG-1) expression or activity, inhibitors of proteinase-activated receptor (PAR) expression or activity, inhibitors of cartilage-derived retinoic-acid-sensitive protein (CD-RAP) expression or activity, inhibitors of protein kinase C zeta (PKCz), inhibitors of resistin expression or activity, inhibitors of a disintegrin and metalloproteinase 8 (ADAM8), inhibitors of complement component 1 s

subcomponent (C1s) expression or activity, inhibitors of formyl peptide receptor-like 1 (FPRL1) expression or activity.

[0102] Additional examples of agents useful in combination with IL-6 antibodies and antigen binding portions thereof include inhibitors of MMP -2, -3, -9, or -13; inhibitors of aggrecanase -1 or -2; inhibitors of IGF -1 or -2 expression or activity; inhibitors of FGF -2, -18, or -9 expression or activity; and inhibitors of IL -1, -4 or -6 expression or activity.

[0103] Further examples of agents useful in combination with IL-6 antibodies and antigen binding portions thereof include IGF -1 or -2 antibodies; FGF receptor -2 or -3 antagonists, CD 44 antibodies, IL -1, -4 or -6 antibodies, TNF-alpha antibodies; TSG-6 antibodies; bikunin antibodies; NR1D1 antagonists; EDG-1 antagonists; PAR antagonists, CD-RAP antibodies, resistin antibodies, C1s antibodies, and FPRL1 antibodies.

Pain

[0104] IL-6 antibodies or antigen binding portions thereof can be administered in combination with one or more additional pharmacologically active compounds for the treatment of pain. The compounds may be administered at the same time in a single dosage form or separately in dosage forms that can be the same or different. Alternatively, the compounds can be administered sequentially. The pharmaceutically acceptable salts of the pharmacologically active compounds may also be used in the combinations.

[0105] Examples of compounds that can be administered with IL-6 antibodies or antigen binding portions thereof include:

[0106] Cyclooxygenase-2 (COX-2) selective inhibitors such as celecoxib, rofecoxib, parecoxib, valdecoxib, deracoxib, etoricoxib, and lumiracoxib; opioid analgesics such as morphine, hydromorphone, oxymorphone, fentanyl, codeine, dihydrocodeine, oxycodone, hydrocodone, buprenorphine, tramadol, and nalbuphine; nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs) such as aspirin, diclofenac, diflunisal, ibuprofen, fenoprofen, naproxen, nepafenac, and acetaminophen; Phosphodiesterase V inhibitors (PDEV) such as sildenafil; alpha-2-delta ligands such as gabapentin and pregabalin; and local anaesthetics such as benzocaine, lidocaine, ropivacaine, menthol, camphor and methyl salicylate.

[0107] Examples of other types of compounds and classes of compounds that can be used in combination with IL-6 antibodies and antigen binding portions thereof include: barbiturate sedatives; benzodiazepines; Histamine H₁ antagonists having a sedative action; sedatives; skeletal muscle relaxants; N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) receptor antagonists; alpha-adrenergics; tricyclic antidepressants; anticonvulsants such as

carbamazepine; tachykinin (NK) antagonists, particularly NK-3, NK-2 or NK-1 antagonists; muscarinic antagonists; neuroleptics; vanilloid receptor agonists or antagonists; beta-adrenergics; corticosteroids; Serotonin (5-HT) receptor agonists or antagonists such as a 5-HT_{1B/1D}, 5-HT_{2A}, and 5-HT₃ receptor antagonists; cholinergic (nicotinic) analgesics; cannabinoids; metabotropic glutamate subtype 1 receptor (mGluR1) antagonists; serotonin reuptake inhibitors such as sertraline; noradrenaline (norepinephrine) reuptake inhibitors such as reboxetine, in particular (S,S)-reboxetine; dual serotonin-noradrenaline reuptake inhibitors such as duloxetine; inducible nitric oxide synthase (iNOS) inhibitors such as S-[2-[(1-iminoethyl)amino]ethyl]-L-homocysteine, S-[2-[(1-iminoethyl)-amino]ethyl]-4,4-dioxo-L-cysteine, S-[2-[(1-iminoethyl)amino]ethyl]-2-methyl-L-cysteine, (2S,5Z)-2-amino-2-methyl-7-[(1-iminoethyl)amino]-5-heptenoic acid, 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hydroxy-1-(5-thiazolyl)-butyl]thio]-5-chloro-3-pyridinecarbonitrile; 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hydroxy-1-(5-thiazolyl)butyl]thio]-4-chlorobenzonitrile, (2S,4R)-2-amino-4-[[2-chloro-5-(trifluoromethyl)phenyl]thio]-5-thiazolebutanol, 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hydroxy-1-(5-thiazolyl)butyl]thio]-6-(trifluoromethyl)-3-pyridinecarbonitrile, 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hydroxy-1-(5-thiazolyl)butyl]thio]-5-chlorobenzonitrile, N-[4-[2-(3-chlorobenzylamino)ethyl]phenyl]thiophene-2-carboxamide, and guanidinoethyldisulfide; acetylcholinesterase inhibitors; prostaglandin E₂ subtype 4 (EP4) antagonists such as N-[(2-[4-(2-ethyl-4,6-dimethyl-1H-imidazo[4,5-c]pyridin-1-yl)phenyl]ethyl)amino)-carbonyl]-4-methylbenzenesulfonamide or 4-[(1S)-1-([5-chloro-2-(3-fluorophenoxy)pyridin-3-yl]carbonyl)amino]ethyl]benzoic acid; leukotriene B₄ antagonists such as 1-(3-biphenyl-4-ylmethyl-4-hydroxy-chroman-7-yl)-cyclopentanecarboxylic acid; 5-lipoxygenase inhibitors; and sodium channel blockers.

Fibromyalgia syndrome

[0108] Products: analgesics such as acetaminophen, naproxen sodium, ibuprofen, tramadol, trazodone; cyclobenzaprine; aspirin, celecoxib, valdecoxib, indomethacin, and other NSAIDs; antidepressants such as tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors, for example antidepressants such as amitriptyline, imipramine, nortriptyline, doxepin, fluoxetine, sertraline, and paroxetine; muscle relaxants such as cyclobenzaprine; sleeping aids such as zolpidem.

[0109] Classes: norepinephrine-serotonin reuptake inhibitors (NSRIs and SNRIs); norepinephrine reuptake inhibitor (NRIs); selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs);

tricyclic antidepressants; selective cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors; nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs); analgesics.

Ankylosing spondylitis

[0110] Products: analgesics such as acetaminophen, naproxen sodium, ibuprofen, tramadol, aspirin, celecoxib, valdecoxib, indomethacin, and other NSAIDs; disease-modifying antirheumatic drugs (DMARDs) such as sulfasalazine or methotrexate; corticosteroids; and tumor necrosis factor (TNF) blockers such as etanercept and infliximab.

[0111] Classes: analgesics; NSAIDs; COX-2 inhibitors; DMARDs; corticosteroids; TNF blockers.

Psoriasis

[0112] Products: phototherapy, including psoralen ultraviolet A (psoralen UVA or PUVA) therapy, narrow-band ultraviolet B (UVB) therapy, and combination light therapy; topical corticosteroids; vitamin D analogs such as calcipotriene; anthralin; topical retinoids (i.e., vitamin A derivatives) such as acitretin and tazarotene; clobetasol propionate; methotrexate; azathioprine; cyclosporine; hydroxyurea; and immune-modulating drugs such as alefacept, efalizumab, and etanercept.

[0113] Classes: phototherapy; corticosteroids; vitamin D analogs; vitamin A derivatives.

Gout

[0114] Products: NSAIDs such as acetaminophen, naproxen sodium, ibuprofen, tramadol, aspirin, celecoxib, valdecoxib, and indomethacin; and corticosteroids such as prednisone.

[0115] Classes: analgesics; NSAIDs; COX-2 inhibitors; and corticosteroids.

Crohn's Disease

[0116] Products: analgesics such as acetaminophen, naproxen sodium, ibuprofen, tramadol, aspirin, celecoxib, valdecoxib, indomethacin, and other NSAIDs; anti-inflammatory drugs; sulfasalazine, mesalamine, balsalazide, and olsalazine; and corticosteroids such as prednisone and budesonide; immunosuppressant drugs such as azathioprine, mercaptopurine, TNF blockers such as infliximab and adalimumab, methotrexate, and

cyclosporine; antibiotics such as metronidazole and ciprofloxacin; anti-diarrheals such as loperamide; and laxatives.

[0117] Classes: analgesics; NSAIDs; COX-2 inhibitors; anti-inflammatory drugs; TNF blockers; antibiotics; anti-diarrheals; and laxatives.

Ulcerative Colitis

[0118] Classes: analgesics such as acetaminophen, naproxen sodium, ibuprofen, tramadol, aspirin, celecoxib, valdecoxib, indomethacin, and other NSAIDs; anti-inflammatory drugs; sulfasalazine, mesalamine, balsalazide, and olsalazine; corticosteroids; immunosuppressant drugs such as azathioprine, mercaptopurine, TNF blockers such as infliximab and adalimumab, methotrexate, and cyclosporine; anti-diarrheals such as loperamide; and laxatives.

[0119] Classes: NSAIDs; COX-2 inhibitors; anti-inflammatory drugs; TNF blockers; corticosteroids; immunosuppressants; Janus kinase-3 (Jak-3) inhibitors; TNF blockers; anti-diarrheals; and laxatives.

Irritable bowel syndrome

[0120] Products: anti-diarrheals such as loperamide; laxatives; anticholinergic drugs; antidepressants such as tricyclic antidepressants and selective serotonin reuptake inhibitors, for example antidepressants such as amitriptyline, imipramine, nortriptyline, doxepin, fluoxetine, sertraline, and paroxetine; alosetron; and tegaserod.

[0121] Classes: anti-diarrheals; laxatives; anticholinergic drugs; norepinephrine-serotonin reuptake inhibitors (NSRIs and SNRIs); norepinephrine reuptake inhibitor (NRIs); selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs); tricyclic antidepressants.

Pharmaceutical Compositions and Administration

[0122] Also provided are pharmaceutical compositions for the treatment of abnormal cell infiltration in a mammal, including a human, comprising an amount of an IL-6 antibody or antigen binding portion thereof, as described herein, that is effective in treating abnormal cell infiltration, and a pharmaceutically acceptable carrier. The compositions provide a therapeutic benefit to patients with one of more of a variety of inflammatory and autoimmune diseases, such as rheumatoid arthritis, atherosclerosis, granulomatous diseases, multiple sclerosis, asthma and cancer.

[0123] IL-6 antibodies and antigen-binding portions thereof can be incorporated into pharmaceutical compositions suitable for administration to a subject. Typically, the pharmaceutical composition comprises an IL-6 antibody or antigen-binding portion thereof and a pharmaceutically acceptable carrier. As used herein, "pharmaceutically acceptable carrier" means any and all solvents, dispersion media, coatings, antibacterial and antifungal agents, isotonic and absorption delaying agents, and the like that are physiologically compatible. Some examples of pharmaceutically acceptable carriers are water, saline, phosphate buffered saline, dextrose, glycerol, ethanol and the like, as well as combinations thereof. In many cases, it will be preferable to include isotonic agents, for example, sugars, polyalcohols such as mannitol, sorbitol, or sodium chloride in the composition. Additional examples of pharmaceutically acceptable substances are wetting agents or minor amounts of auxiliary substances such as wetting or emulsifying agents, preservatives or buffers, which enhance the shelf life or effectiveness of the antibody.

[0124] The compositions of this invention may be in a variety of forms, for example, liquid, semi-solid and solid dosage forms, such as liquid solutions (e.g., injectable and infusible solutions), dispersions or suspensions, tablets, pills, powders, liposomes and suppositories. The form depends on the intended mode of administration and therapeutic application. Typical compositions are in the form of injectable or infusible solutions, such as compositions similar to those used for passive immunization of humans. In one case the mode of administration is parenteral (e.g., intravenous, subcutaneous, intraperitoneal, intramuscular). In another case, the antibody is administered by intravenous infusion or injection. In another case, the antibody is administered by intramuscular or subcutaneous injection. Formulations for injection may be presented in unit dosage form, e.g., in ampoules or in multi-dose containers, with or without an added preservative. The compositions may take such forms as suspensions, solutions, or emulsions in oily or aqueous vehicles, and may contain formulatory agents such as suspending, stabilizing and/or dispersing agents. Alternatively, the active ingredient may be in powder form for constitution with a suitable vehicle, e.g., sterile pyrogen-free water, before use. Sterile injectable solutions can be prepared by incorporating the IL-6 antibody in the required amount in an appropriate solvent with one or a combination of ingredients enumerated above, as required, followed by filter sterilization. In one case, the antibody is administered in a formulation as a sterile aqueous solution having a pH that ranges from about 5.0 to about 6.5 and comprising from about 1 mg/ml to about 200 mg/ml of antibody, from about 1 millimolar to about 100 millimolar of histidine buffer, from about 0.01 mg/ml to about 10

mg/ml of polysorbate 80 or polysorbate 20, from about 100 millimolar to about 400 millimolar of a non-reducing sugar selected from but not limited to trehalose or sucrose, from about 0.01 millimolar to about 1.0 millimolar of disodium EDTA dihydrate and optionally comprise a pharmaceutically acceptable antioxidant in addition to a chelating agent. Suitable antioxidants include, but are not limited to, methionine, sodium thiosulfate, catalase, and platinum. For example, the composition may contain methionine in a concentration that ranges from 1 mM to about 100 mM, and in particular, is about 27 mM. In some cases, a formulation contains 5 mg/ml of antibody in a buffer of 20mM sodium citrate, pH 5.5, 140 mM NaCl, and 0.2 mg/ml polysorbate 80. It is to be noted that dosage values may vary with the type and severity of the condition to be alleviated. In the case of sterile powders for the preparation of sterile injectable solutions, the suitable methods of preparation include vacuum drying and freeze-drying that yields a powder of the active ingredient plus any additional desired ingredient from a previously sterile-filtered solution thereof. The proper fluidity of a solution can be maintained, for example, by the use of a coating such as lecithin, by the maintenance of the required particle size in the case of dispersion and by the use of surfactants. Prolonged absorption of injectable compositions can be brought about by including in the composition an agent that delays absorption, for example, monostearate salts and gelatin.

[0125] IL-6 antibodies or antigen-binding portions thereof can be administered by a variety of methods, although for many therapeutic applications, the route/mode of administration can be subcutaneous, intramuscular, or intravenous infusion. As will be appreciated by the skilled artisan, the route and/or mode of administration will vary depending upon the desired results.

[0126] In certain cases, the IL-6 antibody compositions may be prepared with a carrier that will protect the antibody against rapid release, such as a controlled release formulation, including implants, transdermal patches, and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Many methods for the preparation of such formulations may be used. See, e.g., *Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems*, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978, which is incorporated herein by reference.

[0127] Additional active compounds also can be incorporated into the compositions. In some cases, an inhibitory IL-6 antibody is co-formulated with and/or co-administered with one or more additional therapeutic agents. These agents include, without limitation,

antibodies that bind other targets, anti-tumor agents, anti-angiogenesis agents, signal transduction inhibitors, anti-proliferative agents, chemotherapeutic agents, or peptide analogues that inhibit IL-6. Such combination therapies may require lower dosages of the inhibitory IL-6 antibody as well as the co-administered agents, thus avoiding possible toxicities or complications associated with the various monotherapies.

[0128] The compositions may include a "therapeutically effective amount" or a "prophylactically effective amount" of an antibody or antigen-binding portion. A "therapeutically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired therapeutic result. A therapeutically effective amount of the antibody or antigen-binding portion may vary according to factors such as the disease state, age, sex, and weight of the individual, and the ability of the antibody or antibody portion to elicit a desired response in the individual. A therapeutically effective amount is also one in which any toxic or detrimental effects of the antibody or antigen-binding portion are outweighed by the therapeutically beneficial effects. A "prophylactically effective amount" refers to an amount effective, at dosages and for periods of time necessary, to achieve the desired prophylactic result. Typically, since a prophylactic dose is used in subjects prior to or at an earlier stage of disease, the prophylactically effective amount may be less than the therapeutically effective amount.

[0129] Dosage regimens can be adjusted to provide the optimum desired response (e.g., a therapeutic or prophylactic response). For example, a single bolus can be administered, several divided doses can be administered over time or the dose can be proportionally reduced or increased as indicated by the exigencies of the therapeutic situation. It is especially advantageous to formulate parenteral compositions in dosage unit form for ease of administration and uniformity of dosage. Dosage unit form as used herein refers to physically discrete units suited as unitary dosages for the mammalian subjects to be treated; each unit containing a predetermined quantity of IL-6 antibody or antigen binding portion thereof calculated to produce the desired therapeutic effect in association with the required pharmaceutical carrier.

[0130] An exemplary, non-limiting range for a therapeutically or prophylactically effective amount of an IL-6 antibody or antibody portion is 0.025 to 50 mg/kg, 0.1 to 50 mg/kg, 0.1-25, 0.1 to 10 or 0.1 to 3 mg/kg. In one case, the IL-6 antibody or antibody portion thereof is administered in a formulation as a sterile aqueous solution having a pH that ranges from about 5.0 to about 6.5 and comprising from about 1 mg/ml to about 200 mg/ml of antibody, from about 1 millimolar to about 100 millimolar of histidine buffer, from about 0.01

mg/ml to about 10 mg/ml of polysorbate 80, from about 100 millimolar to about 400 millimolar of trehalose, and from about 0.01 millimolar to about 1.0 millimolar of disodium EDTA dihydrate. It is to be noted that dosage values may vary with the type and severity of the condition to be alleviated. It is to be further understood that for any particular subject, specific dosage regimens should be adjusted over time according to the individual need and the professional judgment of the person administering or supervising the administration of the compositions, and that dosage ranges set forth herein are exemplary only and are not intended to limit the scope or practice of the claimed compositions.

[0131] Another aspect provided herein are kits comprising an IL-6 antibody or antigen-binding portion or a composition comprising such an antibody or antigen-binding portion. A kit may include, in addition to the antibody or composition, diagnostic or therapeutic agents. A kit can also include instructions for use in a diagnostic or therapeutic method. In one case, the kit includes the antibody or a composition comprising it and a diagnostic agent that can be used in a method described herein. In another case, the kit includes the antibody or a composition comprising it and one or more therapeutic agents that can be used in a method described herein.

Diagnostic Methods of Use

[0132] Another aspect provided herein are diagnostic methods. The anti-IL-6 antibodies or antigen binding portion thereof can be used to detect IL-6 in a biological sample in vitro or in vivo. One aspect provides a method for diagnosing the presence or location of IL-6-expressing cells in a subject in need thereof, comprising the steps of injecting the antibody into the subject, determining the expression of IL-6 in the subject by localizing where the antibody has bound, comparing the expression in the subject with that of a normal reference subject or standard, and diagnosing the presence or location of the cells. The anti-IL-6 antibodies may also be used as a marker for inflammation and/or for the infiltration of immune cells, such as monocytes and T cells, into a tissue.

[0133] The anti-IL-6 antibodies can be used in any suitable immunoassay, including, without limitation, an ELISA, a RIA, flow cytometry, tissue immunohistochemistry, a Western blot or an immunoprecipitation. The anti-IL-6 antibodies or antigen binding portion thereof can be used to detect IL-6 from humans. In another case, the anti-IL-6 antibodies can be used to detect IL-6 from cynomolgus monkeys, rhesus monkeys and rodents, such as mice and rats.

[0134] Methods for detecting IL-6 in a biological sample generally comprise contacting the biological sample with an anti-IL-6 antibody or antigen binding portions thereof and detecting the bound antibody. In one case, the anti-IL-6 antibody or antigen binding portion thereof is directly labeled with a detectable label. In another case, the anti-IL-6 antibody (the first antibody) is unlabeled and a second antibody or other molecule that can bind the anti-IL-6 antibody is labeled. A second antibody is chosen that is able to specifically bind the particular species and class of the first antibody. For example, if the anti-IL-6 antibody is a human IgG, then the secondary antibody could be an anti-human-IgG. Other molecules that can bind to antibodies include, without limitation, Protein A and Protein G, both of which are available commercially, e.g., from Pierce Chemical Co.

[0135] Suitable labels for the antibody or secondary antibody are disclosed herein and include various enzymes, prosthetic groups, fluorescent materials, luminescent materials and radioactive materials. Examples of suitable enzymes include horseradish peroxidase, alkaline phosphatase, β -galactosidase, or acetylcholinesterase; examples of suitable prosthetic group complexes include streptavidin/biotin and avidin/biotin; examples of suitable fluorescent materials include umbelliferone, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, dichlorotriazinylamine fluorescein, dansyl chloride or phycoerythrin; an example of a luminescent material includes luminol; and examples of suitable radioactive material include ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S or ^3H .

[0136] IL-6 can also be assayed in a biological sample by a competition immunoassay utilizing IL-6 standards labeled with a detectable substance and an unlabeled anti-IL-6 antibody. In this assay, the biological sample, the labeled IL-6 standards and the anti-IL-6 antibody are combined and the amount of labeled IL-6 standard bound to the unlabeled antibody is determined. The amount of IL-6 in the biological sample is inversely proportional to the amount of labeled IL-6 standard bound to the anti-IL-6 antibody.

[0137] One can use such immunoassays for a number of purposes. For example, the anti-IL-6 antibodies or antigen binding portions thereof can be used to detect IL-6 in cultured cells. In one case, the anti-IL-6 antibodies or antigen binding portions thereof are used to determine the amount of IL-6 on the surface of cells that have been treated with various compounds. This method can be used to identify compounds that modulate IL-6 protein levels. According to this method, one sample of cells is treated with a test compound for a period of time while another sample is left untreated. If the total IL-6 expression is to be measured, the cells are lysed and the total IL-6 expression is measured

using any suitable immunoassay. The total IL-6 expression in the treated versus the untreated cells is compared to determine the effect of the test compound.

[0138] Immunoassays for measuring total IL-6 expression include flow cytometry and immunohistochemistry. If the cell surface IL-6 expression is to be measured, the cells are not lysed, and the cell surface levels of IL-6 are measured using one of the immunoassays described above. A preferred immunoassay for determining cell surface levels of IL-6 includes the steps of labeling the cell surface proteins with a detectable label, such as biotin or ^{125}I , immunoprecipitating the IL-6 with an anti-IL-6 antibody and then detecting the labeled IL-6.

[0139] Another immunoassay for determining the localization of IL-6, e.g., cell surface levels, is by using immunohistochemistry. An immunoassay to detect cell surface levels of IL-6 includes binding of an anti-IL-6 antibody labeled with an appropriate fluorophore, such as fluorescein or phycoerythrin, and detecting the primary antibody using flow cytometry. In another example, the anti-IL-6 antibody is unlabeled and a second antibody or other molecule that can bind the anti-IL-6 antibody is labeled. Methods such as ELISA, RIA, flow cytometry, Western blot, immunohistochemistry, cell surface labeling of integral membrane proteins and immunoprecipitation are well known in the art. See, e.g., Harlow and Lane. In addition, the immunoassays can be scaled up for high throughput screening in order to test a large number of compounds for either activation or inhibitors of IL-6.

[0140] The anti-IL-6 antibodies or antigen binding portions thereof also can be used to determine the levels of IL-6 in a tissue or in cells derived from the tissue. In some examples, the tissue is a diseased tissue or a tissue biopsy. The tissue or biopsy can be used in an immunoassay to determine, e.g., total IL-6 expression, cell surface levels of IL-6 or localization of IL-6 by the methods discussed above. Such methods can be used to determine whether a tissue expresses high levels of IL-6, which could be indicative that the tissue is a target for treatment with anti-IL-6 antibody.

[0141] IL-6 antibodies and antigen-binding portions thereof also can be used in vivo to identify tissues and organs that express IL-6. In some cases, the anti-IL-6 antibodies are used to identify IL-6-expressing cells. Human anti-IL-6 antibodies may safely be used in vivo without eliciting a substantial immune response to the antibody upon administration, unlike antibodies of non-human origin or with humanized or chimeric antibodies.

[0142] The method comprises the steps of administering a detectably labeled anti-IL-6 antibody or a composition comprising them to a patient in need of such a diagnostic test

and subjecting the patient to imaging analysis to determine the location of the IL-6-expressing tissues. Imaging analysis is well known in the medical art, and includes, without limitation, x-ray analysis, magnetic resonance imaging (MRI) or computed tomography (CT). The antibody can be labeled with any agent suitable for in vivo imaging, for example a contrast agent, such as barium, which can be used for x-ray analysis, or a magnetic contrast agent, such as a gadolinium chelate, which can be used for MRI or CT. Other labeling agents include, without limitation, radioisotopes, such as ^{99}Tc . In another case, the anti-IL-6 antibody will be unlabeled and will be imaged by administering a second antibody or other molecule that is detectable and that can bind the anti-IL-6 antibody. In one example, a biopsy is obtained from the patient to determine whether the tissue of interest expresses IL-6.

[0143] The detectably labeled anti-IL-6 may comprise a fluorophore. In certain cases, the fluorophore is selected from the group consisting of a near-infrared fluorescent dye, dinitrophenyl, fluorescein and derivatives thereof, rhodamine, derivatives of rhodamine, phycoerythrin, phycocyanin, allophycocyanin, o-phthaldehyde and fluorescamine, Texas red, Rhodamine green, Oregon green, Cascade blue, phycoerythrin, CY3, CY5, CY2, CY7, coumarin, infrared 40, MR 200, IRD 40, Alexa Fluor, Cascade Blue, Tetramethylrhodamine, Pacific Blue, SYBR, and BODIPY. In another example, the fluorophore includes one of the following compounds with their emission maxima indicated in nm in parentheses, Cy2.TM. (506), GFP (Red Shifted) (507), YO-PRO®-1 (509), YOYO®-1 (509), Calcein (517), FITC (518), FluorX® (519), Alexa® (520), Rhodamine 110 (520), 5-FAM (522), Oregon Green® 500 (522), Oregon Green® 488 (524), RiboGreen® (525), Rhodamine Green® (527), Rhodamine 123 (529), Magnesium Green® (531), Calcium Green® (533), TO-PRO®-1 (533), TOTO®-1 (533), JOE (548), BODIPY® 530/550 (550), DiI (565), BODIPY® (568), BODIPY® 558/568 (568), BODIPY® 564/570 (570), Cy3® (570), Alexa® 546 (570), TRITC (572), Magnesium Orange® (575), Phycoerythrin R&B (575), Rhodamine Phalloidin (575), Calcium Orange® (576), Pyronin Y (580), Rhodamine B (580), TAMRA (582), Rhodamine Red® (590), Cy3.5® (596), ROX (608), Calcium Crimson.TM. (615), Alexa® 594 (615), Texas Red.RTM. (615), Nile Red (628), YO-PRO®-3 (631), YOYO®-3 (631), R-phycoyanin (642), C-Phycocyanin (648), TO-PRO®-3 (660), TOTO®-3 (660), DiD DiIc(5) (665), Cy5.TM. (670), Thiadicarbocyanine (671) and Cy5.5 (694).

[0144] In yet a further example, the anti-IL-6 antibodies may also be used to determine the reduction in surface cell expression of IL-6 on cells, for example, lymphocytes or monocytes.

[0145] Human anti-IL-6 antibodies or antigen-binding portions thereof minimize the immunogenic and allergic responses intrinsic to non-human or non-human-derivatized monoclonal antibodies (Mabs), and thus increase the efficacy and safety of the administered antibodies or antigen-binding portions thereof.

[0146] Another aspect provides human anti-IL-6 antibodies encoded in part by a human germline sequence. The V_H , V_K , V_λ genes are classified into families on the basis of sequence homology. Two V_H , V_K , or V_λ genes belong to the same family if they share the same nucleotide sequence at more than 80% of the positions. An anti-IL-6 antibody may comprise a human kappa light chain (V_K) or a human lambda light chain (V_λ) or an amino acid sequence derived therefrom. In some cases comprising a lambda light chain, the light chain variable domain (V_L) is encoded in part by a human $V_\lambda 1$, $V_\lambda 2$, $V_\lambda 3$, $V_\lambda 4$, $V_\lambda 5$, $V_\lambda 6$, $V_\lambda 7$, $V_\lambda 8$, $V_\lambda 9$, or $V_\lambda 10$ family gene (Williams S.C. *et al. J. Mol. Bio.* 264:220-232, 1996). In some cases comprising a kappa light chain, the light chain variable domain (V_L) is encoded in part by a human V_{K1} , V_{K2} , V_{K3} , V_{K4} , V_{K5} , V_{K6} , V_{K7} , V_{K8} , V_{K9} , V_{K10} , V_{K11} , V_{K12} , V_{K13} , V_{K14} , V_{K15} , V_{K16} , V_{K17} , V_{K18} , V_{K19} , V_{K20} , V_{K21} , V_{K22} , V_{K23} , V_{K24} , V_{K25} , V_{K26} , V_{K27} , V_{K28} , V_{K29} , V_{K30} , V_{K31} , V_{K32} , V_{K33} , V_{K34} , V_{K35} , V_{K36} , V_{K37} , V_{K38} , V_{K39} , V_{K40} , V_{K41} , V_{K42} , V_{K43} , V_{K44} , V_{K45} , V_{K46} , V_{K47} , V_{K48} , V_{K49} , V_{K50} , V_{K51} , V_{K52} , V_{K53} , V_{K54} , V_{K55} , V_{K56} , V_{K57} , V_{K58} , V_{K59} , V_{K60} , V_{K61} , V_{K62} , V_{K63} , V_{K64} , V_{K65} , V_{K66} , V_{K67} , V_{K68} , V_{K69} , V_{K70} , V_{K71} , V_{K72} , V_{K73} , V_{K74} , V_{K75} , V_{K76} , V_{K77} , V_{K78} , V_{K79} , V_{K80} , V_{K81} , V_{K82} , V_{K83} , V_{K84} , V_{K85} , V_{K86} , V_{K87} , V_{K88} , V_{K89} , V_{K90} , V_{K91} , V_{K92} , V_{K93} , V_{K94} , V_{K95} , V_{K96} , V_{K97} , V_{K98} , V_{K99} , or V_{K100} family gene (Cox J. P. L., *et al. Eur. J. Immunol* 24:827-836, 1994), preferably a V_{K1} , V_{K2} , V_{K3} , or V_{K4} family gene, and preferably a V_{K1} or V_{K6} family gene. In some cases, the light chain germline sequence is selected from human VK sequences including, but not limited to, A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4, and O8. In certain cases, this light chain human germline framework is selected from V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-2, V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4, and V5-6. An anti-IL-6 antibody may comprise a heavy chain variable domain (V_H) encoded by a human V_{H1} , V_{H2} , V_{H3} , V_{H4} , V_{H5} , V_{H6} or V_{H7} family gene. In particular examples, this heavy chain human germline framework is selected from VH1-18, VH1-2, VH1-24, VH1-3, VH1-45, VH1-46, VH1-58, VH1-69, VH1-8, VH2-26, VH2-5, VH2-70, VH3-11, VH3-13, VH3-15, VH3-16, VH3-20, VH3-21, VH3-23, VH3-30, VH3-33, VH3-35, VH3-38, VH3-43, VH3-48, VH3-49, VH3-53, VH3-64, VH3-66, VH3-7, VH3-72, VH3-73, VH3-74, VH3-9, VH4-28, VH4-31, VH4-34, VH4-39, VH4-4, VH4-59, VH4-61, VH5-51, VH6-1, and VH7-81. In particular cases, the light chain variable region and/or heavy chain variable region comprises a framework region or at least a portion of a framework region (e.g., containing 2 or 3 subregions, such as FR2 and FR3). In certain cases, at least FRL1, FRL2, FRL3, or FRL4 is fully human. In other examples, at least FRH1, FRH2, FRH3, or FRH4 is fully human. In some cases, at least FRL1, FRL2, FRL3, or

FRL4 is a germline sequence (e.g., human germline) or comprises human consensus sequences for the particular framework (readily available at the sources of known human Ig sequences described herein). In other examples, at least FRH1, FRH2, FRH3, or FRH4 is a germline sequence (e.g., human germline) or comprises human consensus sequences for the particular framework.

[0147] The V_L of the IL-6 antibody may comprise one or more amino acid substitutions relative to the germline amino acid sequence of the human gene. In some cases, the V_L of the IL-6 antibody comprises 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 amino acid substitutions relative to the germline amino acid sequence. In an example, one or more of those substitutions from germline is in the CDR regions of the light chain. In one example, the amino acid substitutions relative to germline are at one or more of the same positions as the substitutions relative to germline in any one or more of the V_L of antibodies 9C8 IgG1, 9C8 IgG2, 9C8 N68T T83S IgG1, 9C8 N68T T83S IgG2, 9C8 E31G N68T T83S IgG1, 9C8 E31G N68T T83S IgG2, 9C8 I24V N68T T83S IgG1, 9C8 I24V N68T T83S IgG2 and 22B5 IgG1. For example, the V_L of an IL-6 antibody may contain one or more amino acid substitutions compared to germline found in the V_L of antibody 9C8 IgG1. In some cases, the amino acid changes are at one or more of the same positions, but involve a different substitution than in the reference antibody.

[0148] In some cases, amino acid changes relative to germline occur at one or more of the same positions as in any of the V_L of antibodies 9C8 IgG1, 9C8 IgG2, 9C8 N68T T83S IgG1, 9C8 N68T T83S IgG2, 9C8 E31G N68T T83S IgG1, 9C8 E31G N68T T83S IgG2, 9C8 I24V N68T T83S IgG1, 9C8 I24V N68T T83S IgG2 and 22B5 IgG1, but the changes may represent conservative amino acid substitutions at such position(s) relative to the amino acid in the reference antibody. For example, if a particular position in one of these antibodies is changed relative to germline and is glutamate, one may substitute aspartate at that position. Similarly, if an amino acid substitution compared to germline is serine, one may conservatively substitute threonine for serine at that position.

[0149] In some cases, the light chain of the human anti-IL-6 antibody comprises the V_L amino acid sequence of antibody 9C8 IgG1, 9C8 IgG2, 9C8 N68T T83S IgG1, 9C8 N68T T83S IgG2, 9C8 E31G N68T T83S IgG1, 9C8 E31G N68T T83S IgG2, 9C8 I24V N68T T83S IgG1, 9C8 I24V N68T T83S IgG2 and 22B5 IgG1 or the amino acid sequence having up to 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, or 10 conservative amino acid substitutions and/or a total of up to 3 non-conservative amino acid substitutions. In some cases, the light chain comprises

the amino acid sequence from the beginning of the CDR1 to the end of the CDR3 of any one of the foregoing antibodies.

[0150] In some cases, the light chain may comprise CDR1, CDR2 and CDR3 regions independently selected from the light chain CDR1, CDR2 and CDR3, respectively, of the light chain of antibodies 9C8 IgG1, 9C8 IgG2, 9C8 N68T T83S IgG1, 9C8 N68T T83S IgG2, 9C8 E31G N68T T83S IgG1, 9C8 E31G N68T T83S IgG2, 9C8 I24V N68T T83S IgG1, 9C8 I24V N68T T83S IgG2 and 22B5 IgG1, or CDR regions each having less than 4 or less than 3 conservative amino acid substitutions and/or a total of three or fewer non-conservative amino acid substitutions. In some cases, the light chain of the anti-IL-6 antibody comprises a light chain CDR1, CDR2, and CDR3, each of which are independently selected from the light chain CDR1, CDR2 and CDR3 regions of monoclonal antibody 9C8 IgG1, 9C8 IgG2, 9C8 N68T T83S IgG1, 9C8 N68T T83S IgG2, 9C8 E31G N68T T83S IgG1, 9C8 E31G N68T T83S IgG2, 9C8 I24V N68T T83S IgG1, 9C8 I24V N68T T83S IgG2 and 22B5 IgG1. In certain cases, the light chain of the anti-IL-6 antibody comprises the light chain CDR1, CDR2 and CDR3 regions of an antibody comprising the amino acid sequence of the V_L region of an antibody selected from 9C8 IgG1, 9C8 IgG2, 9C8 N68T T83S IgG1, 9C8 N68T T83S IgG2, 9C8 E31G N68T T83S IgG1, 9C8 E31G N68T T83S IgG2, 9C8 I24V N68T T83S IgG1, 9C8 I24V N68T T83S IgG2 and 22B5 IgG1 or the CDR regions each having less than 4 or less than 3 conservative amino acid substitutions and/or a total of three or fewer non-conservative amino acid substitutions.

[0151] In some cases, the variable domain (V_H) is encoded, at least in part, by a human gene. In some cases, the V_H sequence of the IL-6 antibody contains one or more amino acid substitutions, deletions or insertions (additions) relative to the germline amino acid sequence. In some cases, the variable domain of the heavy chain comprises 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, or 17 mutations from the germline amino acid sequence. In some cases, the mutation(s) are non-conservative substitutions, deletions or insertions, compared to the germline amino acid sequence. In some examples, the mutations are in the CDR regions of the heavy chain. In some examples, the amino acid changes are made at one or more of the same positions as the mutations from germline in any one or more of the V_H of antibodies 9C8 IgG1, 9C8 IgG2, 9C8 N68T T83S IgG1, 9C8 N68T T83S IgG2, 9C8 E31G N68T T83S IgG1, 9C8 E31G N68T T83S IgG2, 9C8 I24V N68T T83S IgG1, 9C8 I24V N68T T83S IgG2 and 22B5 IgG1. In other examples, the amino acid changes are at one or more of the same positions but involve a different mutation than in the reference antibody.

[0152] In some cases, the heavy chain comprises the V_H amino acid sequence of antibody 9C8 IgG1, 9C8 IgG2, 9C8 N68T T83S IgG1, 9C8 N68T T83S IgG2, 9C8 E31G N68T T83S IgG1, 9C8 E31G N68T T83S IgG2, 9C8 I24V N68T T83S IgG1, 9C8 I24V N68T T83S IgG2 and 22B5 IgG1 the V_H amino acid sequence having up to 1, 2, 3, 4, 6, 8, or 10 conservative amino acid substitutions and/or a total of up to 3 non-conservative amino acid substitutions. In some examples, the heavy chain comprises the amino acid sequence from the beginning of the CDR1 to the end of the CDR3 of any one of the foregoing antibodies.

[0153] In some cases, the heavy chain comprises the heavy chain CDR1, CDR2 and CDR3 regions of antibody 9C8 IgG1, 9C8 IgG2, 9C8 N68T T83S IgG1, 9C8 N68T T83S IgG2, 9C8 E31G N68T T83S IgG1, 9C8 E31G N68T T83S IgG2, 9C8 I24V N68T T83S IgG1, 9C8 I24V N68T T83S IgG2 and 22B5 IgG1 or the CDR regions each having less than 8, less than 6, less than 4, or less than 3 conservative amino acid substitutions and/or a total of three or fewer non-conservative amino acid substitutions.

[0154] In some cases, the heavy chain CDR regions are independently selected from the CDR regions of antibodies 9C8 IgG1, 9C8 IgG2, 9C8 N68T T83S IgG1, 9C8 N68T T83S IgG2, 9C8 E31G N68T T83S IgG1, 9C8 E31G N68T T83S IgG2, 9C8 I24V N68T T83S IgG1, 9C8 I24V N68T T83S IgG2 and 22B5 IgG1. In other cases, the heavy chain comprises CDR regions independently selected from two or more V_H regions selected from 9C8 IgG1, 9C8 IgG2, 9C8 N68T T83S IgG1, 9C8 N68T T83S IgG2, 9C8 E31G N68T T83S IgG1, 9C8 E31G N68T T83S IgG2, 9C8 I24V N68T T83S IgG1, 9C8 I24V N68T T83S IgG2 and 22B5 IgG1.

[0155] In other cases, the antibody comprises a light chain and a heavy chain. In a further example, the light chain CDRs and the heavy chain CDRs are from the same antibody.

[0156] One type of amino acid substitution that may be made is to change one or more cysteines in the antibody, which may be chemically reactive, to another residue, such as, without limitation, alanine or serine. In one example, there is a substitution of a non-canonical cysteine. The substitution can be made in a CDR or framework region of a variable domain or in the constant domain of an antibody. In some cases, the cysteine is canonical.

[0157] Another type of amino acid substitution that may be made is to change any potential proteolytic sites in the antibody. Such sites may occur in a CDR or framework region of a variable domain or in the constant domain of an antibody. Substitution of cysteine residues and removal of proteolytic sites may decrease the risk of any

heterogeneity in the antibody product and thus increase its homogeneity. Another type of amino acid substitution is to eliminate asparagine-glycine pairs, which form potential deamidation sites, by altering one or both of the residues.

[0158] In certain cases, the heavy and light chains of the IL-6 antibodies may optionally include a signal sequence.

[0159] In some cases, the antibody comprises the heavy and light chain variants of monoclonal antibodies 9C8 IgG1, 9C8 IgG2, 9C8 N68T T83S IgG1, 9C8 N68T T83S IgG2, 9C8 E31G N68T T83S IgG1, 9C8 E31G N68T T83S IgG2, 9C8 I24V N68T T83S IgG1, 9C8 I24V N68T T83S IgG2 and 22B5 IgG1. As discussed in greater detail in EXAMPLE 3, numerous heavy and light chain variant mutations were made to match those in the germline CDR regions. The specific amino acids that were mutated to arrive at the germline versions are apparent to those of skill in the art by comparing the sequences of the germline vs. a non-germline antibody. For example, one amino acid substitution is provided in the heavy chain of antibody 9C8, wherein an isoleucine at residue 24 is changed to a valine and is referred to as 9C8 I24V. A second exemplary amino acid substitution is in the light chain of antibody 9C8, and substitutes the lysine at residue 92 with an asparagine and is referred to as 9C8 K92N.

[0160] As will be appreciated, gene utilization analysis provides only a limited overview of antibody structure. As human B-cells stochastically generate V-D-J heavy or V-J kappa light chain transcripts, there are a number of secondary processes that occur, including, without limitation, somatic hypermutation, additions, and CDR3 extensions. Accordingly, to further examine antibody structures, predicted amino acid sequences of the antibodies were generated from the cDNAs obtained from the clones. In addition, N-terminal amino acid sequences were obtained through protein sequencing.

Class and Subclass of Anti-IL-6 Antibodies

[0161] The class (e.g., IgG, IgM, IgE, IgA, or IgD) and subclass (e.g. IgG1, IgG2, IgG3, or IgG4) of IL-6 antibodies may be determined by any suitable method. In general, the class and subclass of an antibody may be determined using antibodies that are specific for a particular class and subclass of antibody. Such antibodies are commercially available. The class and subclass can be determined by ELISA, or Western Blot, as well as other techniques.

[0162] Alternatively, the class and subclass may be determined by sequencing all or a portion of the constant domains of the heavy and/or light chains of the antibodies,

comparing their amino acid sequences to the known amino acid sequences of various class and subclasses of immunoglobulins, and determining the class and subclass of the antibodies. The IL-6 antibodies can be an IgG, an IgM, an IgE, an IgA, or an IgD molecule. For example, the IL-6 antibodies can be an IgG that is an IgG1, IgG2, IgG3, or an IgG4 subclass. In one example, the IL-6 antibodies are IgG2 subclass. In another example, the IL-6 antibodies are IgG1 subclass.

[0163] In one aspect methods are provided for converting the class or subclass of an IL-6 antibody to another class or subclass. In some cases, a nucleic acid molecule encoding a V_L or V_H that does not include sequences encoding C_L or C_H is isolated using any suitable methods. The nucleic acid molecule then is operatively linked to a nucleic acid sequence encoding a C_L or C_H from a desired immunoglobulin class or subclass. This can be achieved using a vector or nucleic acid molecule that comprises a C_L or C_H chain, as described above. For example, an IL-6 antibody that was originally IgM can be class switched to an IgG. Further, the class switching may be used to convert one IgG subclass to another, e.g., from IgG1 to IgG2. Another method for producing an antibody comprising a desired isotype comprises the steps of isolating a nucleic acid encoding a heavy chain of an IL-6 antibody and a nucleic acid encoding a light chain of an IL-6 antibody, isolating the sequence encoding the V_H region, ligating the V_H sequence to a sequence encoding a heavy chain constant domain of the desired isotype, expressing the light chain gene and the heavy chain construct in a cell, and collecting the IL-6 antibody with the desired isotype.

Binding Affinity of IL-6 Antibodies to IL-6

[0164] The binding affinity and dissociation rate of an anti-IL-6 antibody to IL-6 can be determined by any suitable method. The binding affinity can be measured by ELISAs, RIAs, flow cytometry, and surface plasmon resonance, such as BIACORE™. The dissociate rate can be measured by surface plasmon resonance. One can determine whether an antibody has substantially the same K_D as an anti-IL-6 antibody by using any suitable method. Example 7 exemplifies a method for determining affinity constants of anti-IL-6 monoclonal antibodies.

Identification of IL-6 Epitopes Recognized by Anti-IL-6 Antibodies

[0165] One can determine whether an antibody binds to the same epitope or cross-competes for binding with an IL-6 antibody by using any suitable method. In one example, one allows an IL-6 antibody to bind to IL-6 under saturating conditions and then measures

the ability of the test antibody to bind to IL-6. If the test antibody is able to bind to IL-6 at the same time as the IL-6 antibody, then the test antibody binds to a different epitope as the IL-6 antibody. However, if the test antibody is not able to bind to IL-6 at the same time, then the test antibody binds to the same epitope, an overlapping epitope, or an epitope that is in close proximity to the epitope bound by the human IL-6 antibody. This experiment can be performed using an ELISA, a RIA, BIACORE™, or flow cytometry (FACS).

[0166] To test whether an IL-6 antibody cross-competes with another IL-6 antibody, one may use the competition method described herein in two directions, i.e., determining if the reference antibody blocks the test antibody and vice versa. In one example, the experiment is performed using an ELISA.

Methods of Producing Antibodies

[0167] IL-6 antibodies or antigen-binding portions thereof can be produced by a variety of techniques, including conventional monoclonal antibody methodology, for example the standard somatic cell hybridization technique of Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495. Other techniques for producing monoclonal antibodies can also be employed such as viral or oncogenic transformation of B lymphocytes.

[0168] An exemplary animal system for preparing hybridomas is a murine system. Immunization protocols and techniques for isolation of immunized splenocytes for fusion are known in the art. Fusion partners (e.g., murine myeloma cells) and fusion procedures are also known.

[0169] Chimeric or humanized antibodies can be prepared based on the sequence of a murine monoclonal antibody prepared as described above. DNA encoding the heavy and light chain immunoglobulins can be obtained from the murine hybridoma of interest and engineered to contain non-murine (e.g., human) immunoglobulin sequences using standard molecular biology techniques. For example, to create a chimeric antibody, the murine variable regions can be linked to human constant regions using methods known in the art (see e.g., U.S. Patent No. 4,816,567 to Cabilly et al.). To create a humanized antibody, the murine CDR regions can be inserted into a human framework using methods known in the art (see e.g., U.S. Patent No. 5,225,539, and U.S. Patent Nos.: 5,530,101; 5,585,089; 5,693,762; and 6,180,370).

[0170] In one case, the anti-IL-6 antibodies are human monoclonal antibodies. Such human monoclonal antibodies directed against IL-6 can be generated using transgenic or transchromosomic mice carrying parts of the human immune system rather than the mouse

system. These transgenic and transchromosomal mice include mice referred to herein as the HuMAb Mouse[®] and KM Mouse[®], respectively, and are collectively referred to herein as "human Ig mice."

[0171] The HuMAb Mouse[®] (Medarex[®], Inc.) contains human immunoglobulin gene miniloci that encode unrearranged human heavy (μ and γ) and κ light chain immunoglobulin sequences, together with targeted mutations that inactivate the endogenous μ and κ chain loci (see e.g., Lonberg, et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). Accordingly, the mice exhibit reduced expression of mouse IgM or κ , and in response to immunization, the introduced human heavy and light chain transgenes undergo class switching and somatic mutation to generate high affinity human IgG κ monoclonal (Lonberg, N. et al. (1994); reviewed in Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, and Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). Preparation and use of the HuMAb Mouse[®], and the genomic modifications carried by such mice, is further described in Taylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaillon et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuaillon et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; and Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, the contents of all of which are hereby specifically incorporated by reference in their entirety. See further, U.S. Patent Nos.: 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,789,650; 5,877,397; 5,661,016; 5,814,318; 5,874,299; and 5,770,429; U.S. Patent No. 5,545,807; PCT Publication Nos.: WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 and WO 99/45962; and PCT Publication No. WO 01/14424.

[0172] In another aspect, human anti-IL-6 antibodies can be raised using a mouse that carries human immunoglobulin sequences on transgenes and transchromosomes, such as a mouse that carries a human heavy chain transgene and a human light chain transchromosome. Such mice, referred to herein as "KM miceTM", are described in detail in PCT Publication No. WO 02/43478.

[0173] Still further, alternative transgenic animal systems expressing human immunoglobulin genes are available in the art and can be used to raise IL-6 antibodies. For example, an alternative transgenic system referred to as the XenomouseTM (Abgenix, Inc.) can be used; such mice are described in, for example, U.S. Patent Nos.: 5,939,598; 6,075,181; 6,114,598; 6,150,584; and 6,162,963.

[0174] Moreover, alternative transchromosomal animal systems expressing human immunoglobulin genes are available in the art and can be used to raise IL-6 antibodies. For example, mice carrying both a human heavy chain transchromosome and a human light chain transchromosome, referred to as "TC mice" can be used; such mice are described in Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727. Furthermore, cows carrying human heavy and light chain transchromosomes have been described in the art (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894) and can be used to raise IL-6 antibodies.

[0175] Human monoclonal antibodies can also be prepared using SCID mice into which human immune cells have been reconstituted such that a human antibody response can be generated upon immunization. Such mice are described in, for example, U.S. Patent Nos.: 5,476,996; and 5,698,767.

Immunization of Human Ig Mice

[0176] Production of Antibodies and Antibody-Producing Cell Lines

[0177] After immunization of an animal with an IL-6 antigen, antibodies and/or antibody-producing cells can be obtained from the animal. In some cases, IL-6 antibody-containing serum is obtained from the animal by bleeding or sacrificing the animal. The serum may be used as it is obtained from the animal, an immunoglobulin fraction may be obtained from the serum, or the IL-6 antibodies may be purified from the serum.

[0178] In some cases, antibody-producing immortalized cell lines are prepared from cells isolated from the immunized animal. After immunization, the animal is sacrificed and lymph node and/or splenic B cells are immortalized by any means known in the art. Methods of immortalizing cells include, but are not limited to, transfecting them with oncogenes, infecting them with an oncogenic virus and cultivating them under conditions that select for immortalized cells, subjecting them to carcinogenic or mutating compounds, fusing them with an immortalized cell, e.g., a myeloma cell, and inactivating a tumor suppressor gene. If fusion with myeloma cells is used, the myeloma cells preferably do not secrete immunoglobulin polypeptides (a non-secretory cell line). Immortalized cells are screened using IL-6, a portion thereof, or a cell expressing IL-6. In some cases, the initial screening is performed using an enzyme-linked immunoassay (ELISA) or a radioimmunoassay. An example of ELISA screening is provided in PCT Publication No. WO 00/37504, incorporated herein by reference.

[0179] IL-6 antibody-producing cells, e.g., hybridomas, are selected, cloned and further screened for desirable characteristics, including robust growth, high antibody production and desirable antibody characteristics. Hybridomas can be expanded in vivo in syngeneic animals, in animals that lack an immune system, e.g., nude mice, or in cell culture in vitro. Methods of selecting, cloning and expanding hybridomas are well known to those of ordinary skill in the art.

[0180] In one example, the immunized animal is a non-human animal that expresses human immunoglobulin genes and the splenic B cells are fused to a myeloma cell line from the same species as the non-human animal. One such immunized animal is a Kirin TC MouseTM mouse and the myeloma cell line is a non-secretory mouse myeloma. In a further example the myeloma cell line is Sp2/0-Ag14 (American Type Culture Collection (ATCC) CRL-1581).

[0181] Also provided are methods for producing a cell line that produces a human monoclonal antibody or a antigen-binding portion thereof directed to IL-6 comprising: (a) immunizing a non-human transgenic animal described herein with IL-6, a portion of IL-6 or a cell or tissue expressing IL-6; (b) allowing the transgenic animal to mount an immune response to IL-6; (c) isolating antibody-producing cells from the transgenic animal; (d) immortalizing the antibody-producing cells; (e) creating individual monoclonal populations of the immortalized antibody-producing cells; and (f) screening the immortalized antibody-producing cells to identify an antibody directed to IL-6.

[0182] In another aspect, hybridomas are provided that produce a human IL-6 antibody. The human IL-6 antibody produced by the hybridoma may be an antagonist of IL-6. The hybridomas may be produced in a non-human, non-mouse species such as, for example, rats, sheep, pigs, goats, cattle or horses.

[0183] In one case, antibody-producing cells are isolated and expressed in a host cell, for example myeloma cells. In still another example, a transgenic animal is immunized with IL-6, primary cells (e.g., spleen or peripheral blood cells) are isolated from an immunized transgenic animal and individual cells producing antibodies specific for the desired antigen are identified. Polyadenylated mRNA from each individual cell is isolated and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) is performed using sense primers that anneal to variable region sequences, e.g., degenerate primers that recognize most or all of the FR1 regions of human heavy and light chain variable region genes and anti-sense primers that anneal to constant or joining region sequences. cDNAs of the heavy and light chain variable domains are then cloned and expressed in any suitable host cell,

e.g., a myeloma cell, as chimeric antibodies with respective immunoglobulin constant regions, such as the heavy chain and κ or λ constant domains. See Babcook, J.S. et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 7843-48, incorporated herein by reference. IL-6 antibodies may then be identified and isolated.

Recombinant Methods of Producing Antibodies

[0184] IL-6 antibodies or antigen-binding portions thereof can be prepared by recombinant expression of immunoglobulin light and heavy chain genes in a host cell. For example, to express an antibody recombinantly, a host cell is transfected with one or more recombinant expression vectors carrying DNA fragments encoding the immunoglobulin light and heavy chains of the antibody such that the light and heavy chains are expressed in the host cell and, preferably, secreted into the medium in which the host cells are cultured, from which medium the antibodies can be recovered. Various recombinant DNA methodologies are used to obtain antibody heavy and light chain genes, to incorporate these genes into recombinant expression vectors and to introduce the vectors into host cells, such as those described in Sambrook, Fritsch and Maniatis (eds), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F. M. et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989) and in U.S. Patent No. 4,816,397, the disclosures of which are incorporated herein by reference.

[0185] Mutations and Modifications

[0186] To express the IL-6 antibodies, DNA fragments encoding V_H and V_L regions can first be obtained using any of the methods discussed herein. Various mutations, deletions, and/or additions can also be introduced into the DNA sequences using various suitable methods. For example, mutagenesis can be carried out using standard methods, such as PCR-mediated mutagenesis, in which the mutated nucleotides are incorporated into the PCR primers such that the PCR product contains the desired mutations or site-directed mutagenesis. One type of substitution, for example, that may be made is to change one or more cysteines in the antibody, which may be chemically reactive, to another residue, such as, without limitation, alanine or serine. For example, there can be a substitution of a non-canonical or canonical cysteine. The substitution can be made in a CDR or framework region of a variable domain or in the constant domain of an antibody. The antibodies may also be mutated in the variable domains of the heavy and/or light chains, e.g., to alter a binding property of the antibody. For example, a mutation may be made in one or more of

the CDR regions to increase or decrease the K_D of the antibody for IL-6, to increase or decrease k_{off} , or to alter the binding specificity of the antibody. Techniques in site-directed mutagenesis include, for example, Sambrook et al. and Ausubel et al., which are incorporated herein by reference.

[0187] A mutation may also be made in a framework region or constant domain to increase the half-life of an IL-6 antibody. See, e.g., PCT Publication No. WO 00/09560, incorporated herein by reference. A mutation in a framework region or constant domain can also be made to alter the immunogenicity of the antibody, to provide a site for covalent or non-covalent binding to another molecule, or to alter such properties as complement fixation, FcR binding and antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC). A single antibody may have mutations in any one or more of the CDRs or framework regions of the variable domain or in the constant domain.

[0188] In a process known as "germlining", certain amino acids in the V_H and V_L sequences can be mutated to match those found naturally in germline V_H and V_L sequences. In particular, the amino acid sequences of the framework regions in the V_H and V_L sequences can be mutated to match the germline sequences to reduce the risk of immunogenicity when the antibody is administered. Germline DNA sequences for human V_H and V_L genes are known in the art (see e.g., the "Vbase" human germline sequence database; see also Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson et al. (1992) J. Mol. Biol. 227:776-798; and Cox et al. Eur. J. Immunol. 24:827-836 (1994); the contents of each of which are incorporated herein by reference).

[0189] Another type of amino acid substitution that may be made is to remove potential proteolytic sites in the antibody. Such sites may occur in a CDR or framework region of a variable domain or in the constant domain of an antibody. Substitution of cysteine residues and removal of proteolytic sites may decrease the risk of heterogeneity in the antibody product and thus increase its homogeneity. Another type of amino acid substitution is to eliminate asparagine-glycine pairs, which form potential deamidation sites, by altering one or both of the residues. In another example, the C-terminal lysine of the heavy chain of an IL-6 antibody can be cleaved. In various examples, the heavy and light chains of the IL-6 antibodies may optionally include a signal sequence. In some cases, the C-terminal lysine of the heavy chain of the anti-IL-6 antibody may be proteolytically cleaved.

[0190] Once DNA fragments encoding the V_H and V_L segments are obtained, these DNA fragments can be further manipulated by standard recombinant DNA techniques, for

example to convert the variable region genes to full-length antibody chain genes, to Fab fragment genes, or to a scFv gene. In these manipulations, a V_L - or V_H -encoding DNA fragment is operatively linked to another DNA fragment encoding another protein, such as an antibody constant region or a flexible linker. The term "operatively linked", as used in this context, is intended to mean that the two DNA fragments are joined such that the amino acid sequences encoded by the two DNA fragments remain in-frame.

[0191] The isolated DNA encoding the V_H region can be converted to a full-length heavy chain gene by operatively linking the V_H -encoding DNA to another DNA molecule encoding heavy chain constant regions (CH1, CH2 and CH3). The sequences of human heavy chain constant region genes are known in the art (see e.g., Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The heavy chain constant region can be an IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM or IgD constant region, but most preferably is an IgG1 or IgG2 constant region. The IgG1 constant region sequence can be any of the various alleles or allotypes known to occur among different individuals, such as Gm(1), Gm(2), Gm(3), and Gm(17). These allotypes represent naturally occurring amino acid substitution in the IgG1 constant regions. For a Fab fragment heavy chain gene, the V_H -encoding DNA can be operatively linked to another DNA molecule encoding only the heavy chain CH1 constant region. The CH1 heavy chain constant region may be derived from any of the heavy chain genes.

[0192] The isolated DNA encoding the V_L region can be converted to a full-length light chain gene (as well as a Fab light chain gene) by operatively linking the V_L -encoding DNA to another DNA molecule encoding the light chain constant region, C_L . The sequences of human light chain constant region genes are known in the art (see e.g., Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) and DNA fragments encompassing these regions can be obtained by standard PCR amplification. The light chain constant region can be a kappa or lambda constant region. The kappa constant region may be any of the various alleles known to occur among different individuals, such as Inv(1), Inv(2), and Inv(3). The lambda constant region may be derived from any of the three lambda genes.

[0193] To create a scFv gene, the V_H - and V_L -encoding DNA fragments are operatively linked to another fragment encoding a flexible linker, e.g., encoding the amino

acid sequence (Gly₄-Ser)₃, such that the V_H and V_L sequences can be expressed as a contiguous single-chain protein, with the V_L and V_H regions joined by the flexible linker (see e.g., Bird et al. Science 242:423-426 (1988); Huston et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); McCafferty et al., Nature 348:552-554 (1990)). The single chain antibody may be monovalent, if only a single V_H and V_L are used, bivalent, if two V_H and V_L are used, or polyvalent, if more than two V_H and V_L are used. Bispecific or polyvalent antibodies may be generated that bind specifically to IL-6 and to another molecule.

[0194] In another case, a fusion antibody may be made that comprises all or a portion of an IL-6 antibody linked to another polypeptide. In another case, only the variable domains of the IL-6 antibody are linked to the polypeptide. In another case, the V_H domain of an IL-6 antibody is linked to a first polypeptide, while the V_L domain of an IL-6 antibody is linked to a second polypeptide that associates with the first polypeptide in a manner such that the V_H and V_L domains can interact with one another to form an antigen binding site. In another case, the V_H domain is separated from the V_L domain by a linker such that the V_H and V_L domains can interact with one another. The V_H-linker-V_L antibody is then linked to the polypeptide of interest. In addition, fusion antibodies can be created in which two (or more) single-chain antibodies are linked to one another. This is useful if one wants to create a divalent or polyvalent antibody on a single polypeptide chain, or if one wants to create a bispecific antibody.

[0195] In other cases, other modified antibodies may be prepared using IL-6 antibody encoding nucleic acid molecules. For instance, "Kappa bodies" (Ill et al., Protein Eng. 10: 949-57 (1997)), "Minibodies" (Martin et al., EMBO J. 13: 5303-9 (1994)), "Diabodies" (Holliger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)), or "Janusins" (Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991) and Traunecker et al., Int. J. Cancer (Suppl.) 7:51-52 (1992)) may be prepared using suitable molecular biological techniques following the teachings discussed herein.

[0196] Bispecific antibodies or antigen-binding fragments can be produced by a variety of methods including fusion of hybridomas or linking of Fab' fragments. See, e.g., Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990), Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992). In addition, bispecific antibodies may be formed as "diabodies" or "Janusins." In some cases, the bispecific antibody binds to two different epitopes of IL-6. In some cases, the modified antibodies described herein are prepared using one or more of the variable domains or CDR regions from a human IL-6 antibody.

Vectors and Host Cells

[0197] To express IL-6 antibodies and antigen-binding portions thereof, DNAs encoding partial or full-length light and heavy chains, obtained as described herein, are inserted into expression vectors such that the genes are operatively linked to transcriptional and translational control sequences. In this context, the term "operatively linked" is intended to mean that an antibody gene is ligated into a vector such that transcriptional and translational control sequences within the vector serve their intended function of regulating the transcription and translation of the antibody gene. The expression vector and expression control sequences are chosen to be compatible with the expression host cell used. Expression vectors include, for example, plasmids, retroviruses, adenoviruses, adeno-associated viruses (AAV), plant viruses such as cauliflower mosaic virus, tobacco mosaic virus, cosmids, YACs, and EBV derived episomes. The antibody gene is ligated into a vector such that transcriptional and translational control sequences within the vector serve their intended function of regulating the transcription and translation of the antibody gene. The expression vector and expression control sequences are chosen to be compatible with the expression host cell used. The antibody light chain gene and the antibody heavy chain gene can be inserted into separate vectors or both genes are inserted into the same expression vector. The antibody genes are inserted into the expression vector by various methods (e.g., ligation of complementary restriction sites on the antibody gene fragment and vector, or blunt end ligation if no restriction sites are present).

[0198] A convenient vector is one that encodes a functionally complete human C_H or C_L immunoglobulin sequence, with appropriate restriction sites engineered so that any V_H or V_L sequence can easily be inserted and expressed, as described above. In such vectors, splicing usually occurs between the splice donor site in the inserted J region and the splice acceptor site preceding the human C domain, and also at the splice regions that occur within the human C_H exons. Polyadenylation and transcription termination occur at native chromosomal sites downstream of the coding regions. The recombinant expression vector also can encode a signal peptide that facilitates secretion of the antibody chain from a host cell. The antibody chain gene may be cloned into the vector such that the signal peptide is linked in-frame to the amino terminus of the immunoglobulin chain. The signal peptide can be an immunoglobulin signal peptide or a heterologous signal peptide (i.e., a signal peptide from a non-immunoglobulin protein).

[0199] In addition to the antibody chain genes, the recombinant expression vectors carry regulatory sequences that control the expression of the antibody chain genes in a host

cell. The design of the expression vector, including the selection of regulatory sequences may depend on such factors as the choice of the host cell to be transformed, the level of expression of protein desired. Regulatory sequences for mammalian host cell expression include viral elements that direct high levels of protein expression in mammalian cells, such as promoters and/or enhancers derived from retroviral LTRs, cytomegalovirus (CMV) (such as the CMV promoter/enhancer), Simian Virus 40 (SV40) (such as the SV40 promoter/enhancer), adenovirus, (e.g., the adenovirus major late promoter (AdMLP)), polyoma and strong mammalian promoters such as native immunoglobulin and actin promoters. For further description of viral regulatory elements, and sequences thereof, see e.g., U.S. Patent No. 5,168,062, U.S. Patent No. 4,510,245 and U.S. Patent No. 4,968,615, incorporated herein by reference, Methods for expressing antibodies in plants, including a description of promoters and vectors, as well as transformation of plants is known in the art. See, e.g., U. S. Patent No. 6,517,529, incorporated herein by reference.

[0200] In addition to the antibody chain genes and regulatory sequences, the recombinant expression vectors may carry additional sequences, such as sequences that regulate replication of the vector in host cells (e.g., origins of replication) and selectable marker genes. The selectable marker gene facilitates selection of host cells into which the vector has been introduced (see e.g., U.S. Patent Nos. 4,399,216, 4,634,665 and 5,179,017, incorporated herein by reference). For example, typically the selectable marker gene confers resistance to drugs, such as G418, hygromycin or methotrexate, on a host cell into which the vector has been introduced. Selectable marker genes include the dihydrofolate reductase (DHFR) gene (for use in dhfr-host cells with methotrexate selection/amplification), the neomycin phosphotransferase gene (for G418 selection), and the glutamate synthetase gene.

[0201] Nucleic acid molecules encoding IL-6 antibodies and vectors comprising these nucleic acid molecules can be used for transfection of a suitable mammalian, plant, bacterial or yeast host cell. Transformation can be any suitable method for introducing polynucleotides into a host cell. Methods for introduction of heterologous polynucleotides into mammalian cells include dextran-mediated transfection, calcium phosphate precipitation, polybrene-mediated transfection, protoplast fusion, electroporation, encapsulation of the polynucleotide(s) in liposomes, and direct microinjection of the DNA into nuclei. In addition, nucleic acid molecules may be introduced into mammalian cells by viral vectors. Methods of transforming cells are well known in the art. See, e.g., U.S. Patent Nos. 4,399,216, 4,912,040, 4,740,461, and 4,959,455, incorporated herein by reference).

Methods of transforming plant cells are well known in the art, including, e.g., *Agrobacterium*-mediated transformation, biolistic transformation, direct injection, electroporation and viral transformation. Methods of transforming bacterial and yeast cells are also well known in the art.

[0202] Mammalian cell lines available as hosts for expression are well known in the art and include many immortalized cell lines available from the American Type Culture Collection (ATCC). These include, for example, Chinese hamster ovary (CHO) cells, NSO cells, SP2 cells, HEK-293T cells, NIH-3T3 cells, HeLa cells, baby hamster kidney (BHK) cells, African green monkey kidney cells (COS), human hepatocellular carcinoma cells (e.g., Hep G2), A549 cells, and a number of other cell lines. Cell lines of particular preference are selected through determining which cell lines have high expression levels. Other cell lines that may be used are insect cell lines, such as Sf9 or Sf21 cells. When recombinant expression vectors encoding antibody genes are introduced into mammalian host cells, the antibodies are produced by culturing the host cells for a period of time sufficient to allow for expression of the antibody in the host cells or, more preferably, secretion of the antibody into the culture medium in which the host cells are grown. Antibodies can be recovered from the culture medium using various protein purification methods. Bacterial host cells include *E. coli* and *Streptomyces* species. Yeast host cells include *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia pastoris*.

[0203] Further, expression of antibodies from production cell lines can be enhanced using any suitable techniques. For example, the glutamine synthetase (the GS system) and DHFR gene expression systems are common approaches for enhancing expression under certain conditions. High expressing cell clones can be identified using conventional techniques, such as limited dilution cloning and Microdrop technology. The GS system is discussed in European Patent Nos. 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997 and 0 338 841.

[0204] It is likely that antibodies expressed by different cell lines or in transgenic animals will have different glycosylation from each other. However, all antibodies encoded by the nucleic acid molecules provided herein, or comprising the amino acid sequences provided herein are part of the present disclosure, regardless of the glycosylation of the antibodies.

Phage Display Libraries

[0205] Also provided are methods for producing an IL-6 antibody or antigen-binding portion thereof comprising the steps of synthesizing a library of human antibodies on phage, screening the library with IL-6 or a portion thereof, isolating phage that bind IL-6, and obtaining the antibody from the phage. By way of example, one method for preparing the library of antibodies for use in phage display techniques comprises the steps of immunizing a non-human animal comprising human immunoglobulin loci with IL-6 or an antigenic portion thereof to create an immune response, extracting antibody-producing cells from the immunized animal; isolating RNA encoding heavy and light chains of antibodies from the extracted cells, reverse transcribing the RNA to produce cDNA, amplifying the cDNA using primers, and inserting the cDNA into a phage display vector such that antibodies are expressed on the phage. Recombinant IL-6 antibodies may be obtained in this way.

[0206] Recombinant IL-6 human antibodies can be isolated by screening a recombinant combinatorial antibody library. Preferably the library is a scFv phage display library, generated using human V_L and V_H cDNAs prepared from mRNA isolated from B cells. Methods for preparing and screening such libraries are known in the art. Kits for generating phage display libraries are commercially available (e.g., the Pharmacia Recombinant Phage Antibody System, catalog no. 27-9400-01; and the Stratagene SurfZAP™ phage display kit, catalog no. 240612). There also are other methods and reagents that can be used in generating and screening antibody display libraries (see, e.g., U.S. Patent No. 5,223,409; PCT Publication Nos. WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs et al., *Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991); Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85 (1992); Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992); Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580 (1992); Garrad et al., *Bio/Technology* 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137 (1991); and Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982 (1991), all incorporated herein by reference.

[0207] To isolate and produce human IL-6 antibodies with the desired characteristics, a human IL-6 antibody is first used to select human heavy and light chain sequences having similar binding activity toward IL-6, using the epitope imprinting methods described in PCT Publication No. WO 93/06213, incorporated herein by reference. The antibody libraries used in this method are preferably scFv libraries prepared and screened as described in PCT Publication No. WO 92/01047, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554

(1990); and Griffiths et al., EMBO J. 12:725-734 (1993), all incorporated herein by reference.

[0208] Once initial human V_L and V_H domains are selected, "mix and match" experiments are performed, in which different pairs of the initially selected V_L and V_H segments are screened for IL-6 binding to select preferred V_L/V_H pair combinations. Additionally, to further improve the quality of the antibody, the V_L and V_H segments of the preferred V_L/V_H pair(s) can be randomly mutated, preferably within the CDR3 region of V_H and/or V_L , in a process analogous to the in vivo somatic mutation process responsible for affinity maturation of antibodies during a natural immune response. This in vitro affinity maturation can be accomplished by amplifying V_H and V_L domains using PCR primers complementary to the V_H CDR3 or V_L CDR3, respectively, which primers have been "spiked" with a random mixture of the four nucleotide bases at certain positions such that the resultant PCR products encode V_H and V_L segments into which random mutations have been introduced into the V_H and/or V_L CDR3 regions. These randomly mutated V_H and V_L segments can be re-screened for binding to IL-6.

[0209] Following screening and isolation of an IL-6 antibody from a recombinant immunoglobulin display library, nucleic acids encoding the selected antibody can be recovered from the display package (e.g., from the phage genome) and subcloned into other expression vectors by standard recombinant DNA techniques. If desired, the nucleic acid can further be manipulated to create other antibody forms, as described herein. To express a recombinant human antibody isolated by screening of a combinatorial library, the DNA encoding the antibody is cloned into a recombinant expression vector and introduced into mammalian host cells, as described above.

Deimmunized Antibodies

[0210] In another aspect, the IL-6 antibodies or antigen binding portions thereof may be deimmunized to reduce their immunogenicity using the techniques described in, e.g., PCT Publication Nos.: WO98/52976 and WO00/34317 (incorporated herein by reference).

Derivatized and Labeled Antibodies

[0211] An IL-6 antibody or antigen-binding portion can be derivatized or linked to another molecule (e.g., another peptide or protein). In general, the antibodies or antigen-binding portion thereof are derivatized such that the IL-6 binding is not affected adversely by the derivatization or labeling. Accordingly, the antibodies and antigen-binding portions are

intended to include both intact and modified forms of the human IL-6 antibodies described herein. For example, an antibody or antigen-binding portion can be functionally linked (by chemical coupling, genetic fusion, noncovalent association or otherwise) to one or more other molecular entities, such as another antibody (e.g., a bispecific antibody or a diabody), a detection agent, a label, a cytotoxic agent, a pharmaceutical agent, and/or a protein or peptide that can mediate association of the antibody or antigen-binding portion with another molecule (such as a streptavidin core region or a polyhistidine tag).

[0212] One type of derivatized antibody is produced by crosslinking two or more antibodies (of the same type or of different types, e.g., to create bispecific antibodies). Suitable crosslinkers include those that are heterobifunctional, having two distinctly reactive groups separated by an appropriate spacer (e.g., m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester) or homobifunctional (e.g., disuccinimidyl suberate). Such linkers are available from Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

[0213] Another type of derivatized antibody is a labeled antibody. Useful detection agents with which an antibody or antigen-binding portion may be derivatized include fluorescent compounds, including, for example, fluorescein, fluorescein isothiocyanate, rhodamine, 5-dimethylamine-1-naphthalene-sulfonyl chloride, phycoerythrin, lanthanide phosphors. An antibody can also be labeled with enzymes that are useful for detection, such as, for example, horseradish peroxidase, β -galactosidase, luciferase, alkaline phosphatase, or glucose oxidase. When an antibody is labeled with a detectable enzyme, it is detected by adding additional reagents that the enzyme uses to produce a reaction product that can be discerned. For example, when the agent horseradish peroxidase is present the addition of hydrogen peroxide and diaminobenzidine leads to a colored reaction product, which is detectable. An antibody can also be labeled with biotin, and detected through indirect measurement of avidin or streptavidin binding. An antibody can also be labeled with a predetermined polypeptide epitope recognized by a secondary reporter (e.g., leucine zipper pair sequences, binding sites for secondary antibodies, metal binding domains, epitope tags). In some cases, labels are attached by spacer arms of various lengths to reduce potential steric hindrance. An IL-6 antibody can also be derivatized with a chemical group such as polyethylene glycol (PEG), a methyl or ethyl group, or a carbohydrate group. These groups are useful to improve the biological characteristics of the antibody, e.g., to increase serum half-life.

[0214] The specific Examples set forth herein are intended to illustrate particular aspects of the disclosure and are not intended to limit the scope of the claims.

EXAMPLE 1

Generation of Hybridomas Producing Anti-IL-6 Antibody

[0215] Exemplary antibodies in accordance with the disclosure were prepared, selected, and assayed as follows:

Mouse Strains

[0216] Fully human monoclonal antibodies to human IL-6 were prepared using human Ig transgenic mouse strains HCo7 and HCo12, as well as the human transchromosomal/transgenic strain, KM (Medarex, Inc.). These strains all express fully human antibodies that are indistinguishable from antibodies isolated from humans.

[0217] In all three strains, both the endogenous mouse kappa light chain gene and the endogenous mouse heavy chain gene have been homozygously disrupted as described in Chen et al. (1993) EMBO J. 12:811-820 and in Example 1 of PCT Publication WO 01/09187, respectively. Moreover, all three carry a human kappa light chain transgene, KCo5, as described in Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851. In contrast, the three strains are distinct with respect to their human heavy chain genes. The HCo7 strain carries the HCo7 human heavy chain transgene as described in U.S. Patent Nos.: 5,545,806, 5,625,825, and 5,545,807; the HCo12 strain carries the HCo12 human heavy chain transgene as described in Example 2 of PCT Publication WO 01/09187; and the KM strain carries a human mini-chromosome as described in Ishida et al., (2002), Cloning and Stem Cells, 4: 91-102.

Immunization with IL-6 Antigen and Selection of HuMab Mice Producing Anti-IL-6 Monoclonal Antibodies

[0218] General immunization schemes for HuMab mice are described in Lonberg et al (1994) Nature 368(6474): 856-859; Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 and PCT Publication WO 98/24884. In the present case, a total of 81 HuMab mice of the HCo7, HCo12 and KM strains were immunized beginning at 6-16 weeks of age with 5-25 µgs of purified human IL-6 in Ribi adjuvant. Human IL-6 was isolated from a human

bone marrow-derived stromal cell, HS-5 (ATCC CRL-11882, Roecklein B. A. & Torok-Storb B., *Blood* 85: 997-1005, 1995), which endogenously secretes IL-6 into the media. Human IL-6 was purified from IL-6 expressing HS-5 media, which was concentrated by ultrafiltration followed by a Q Sepharose anion exchange chromatography step and an affinity chromatography step using a mouse anti-hIL-6 MAb (R&D Systems, Catalog number MAB2061, clone 1936). The purified human IL-6 had a purity of about 90% by SDS-PAGE. The major bands were excised from the SDS-PAGE gel, digested with trypsin and the extracted gel purified tryptic peptides were analyzed via MALDI/MS on the 4700 TOF/TOF Proteomics Analyzer and were confirmed to be human IL-6. Alternatively, one can use recombinant human IL-6 from commercial sources (for example, Recombinant Human IL-6, catalog number 206-IL-6/CF, R&D System Inc. 614 McKinley Place NE, Minneapolis, MN 55413). Administration was via injection intra-peritoneally, subcutaneously or into the footpad at 3-14 day intervals, up to a total of 8 immunizations. Immune response was monitored via ELISA screening, as described below.

Selection of HuMab Mice Producing anti-IL-6 Antibodies

[0219] Blood from the transgenic mice described above was obtained via retro-orbital bleeds and analyzed by ELISA for specific binding to purified human IL-6 recombinant protein, as described by Fishwild et al. (1996), *Nature Biotechnology* 14: 845-851.

[0220] Briefly, microtiter plates were coated using 50 µl/well of a purified recombinant IL-6 solution containing 1 µg /ml in PBS, and incubated overnight at 4°C. The wells were then blocked using 200 µl/well of 5% chicken serum in PBS/Tween (0.05%). Dilutions of plasma from IL-6-immunized mice were added to each well and incubated for 1 hour at ambient temperature. The plates were washed with PBS/Tween and then incubated with a goat-anti-human IgG Fc polyclonal antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) for 1 hour at room temperature. After washing, the plates were developed with ABTS substrate (Moss Inc, product #: ABTS-1000 mg/ml) and analyzed by spectrophotometer at OD 415-495. Mice that developed the highest titers of anti-IL-6 antibodies (22 animals total) were used for fusions.

Generation of Hybridomas Producing Human Monoclonal Antibodies to IL-6:

[0221] The mice selected above were boosted intravenously with IL-6 at 3 days and then again at 2 days prior to sacrifice and removal of the spleen and/or lymph nodes. A total of 17 fusions were performed.

[0222] The mouse splenocytes and/or lymph node lymphocytes isolated from immunized HuMab or KM mice, were fused to SP2/0 non-secreting mouse myeloma cells (ATCC, CRL-1581, ATCC American Type Culture Collection, 1080 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 USA) using electrofusion (E-fusion, Cyto Pulse™ technology, Cyto Pulse™ Sciences, Inc., Glen Burnie, MD), according to standard or manufacturer-recommended protocols.

[0223] Briefly, single cell suspensions of splenocytes and/or lymph node lymphocytes from immunized mice were prepared and then combined with an equal number of Sp2/0 non-secreting mouse myeloma cells; E-fusion was then performed.

[0224] The cells were then plated at 2×10^4 cells /well in flat bottom microtiter plate, and incubated for 10-14 days in selective medium containing 10% fetal bovine serum, 10% P388D1 (ATCC, CRL-TIB-63) conditioned medium, 3-5% (IGEN) in DMEM (Mediatech, Herndon, VA, Cat. No. CRL 10013, with high glucose, L-glutamine and sodium pyruvate), 5 mM HEPES, 0.055 mM 2-mercaptoethanol, 50 mg/ml gentamycin and 1x HAT (Sigma, Cat. No. CRL -P-7185).

[0225] After 1-2 weeks, cells were cultured in medium in which the HAT was replaced with HT. Approximately 10-14 days after cell plating supernatants from individual wells were screened for the presence of human gamma, kappa antibodies. The supernatants which scored positive for human gamma, kappa were then screened by ELISA (using the protocol described above) for human anti-IL-6 monoclonal IgG antibodies. The antibody-secreting hybridomas were transferred to 24 well plates, screened again and, if confirmed positive for human anti-IL-6 IgG monoclonal antibodies, were subcloned at least twice by limiting dilution. The stable subclones were then cultured in vitro to generate small amounts of antibody in tissue culture medium for further characterization.

Example 2

Sequencing of IL-6 antibodies

[0226] Full-length anti-IL-6 antibodies were cloned and sequence verified from hybridomas as follows: Poly(A)⁺ mRNA was isolated using an RNeasy Mini Kit (Qiagen) and cDNA synthesized from the mRNA with the Advantage RT-for-PCR kit (BD Biosciences)

using oligo(dT) priming. The oligo(dT) primed cDNA for clone 9C8 was amplified using degenerate primers listed in Table 1 respectively.

Table 1: Degenerate primers (5' to 3') for 9C8

VH4_5UTR_F	CTTTCTGAGASTCMTGGAKCTCMTG SEQ ID NO:49
G_3UTR_R	TACGTGCCAAGCATCCTCGC SEQ ID NO:50
VK1a_5UTR_F	GSARTCAGWCYCWVYCAGGACACAGC SEQ ID NO:51
K_3UTR_F	AGGCTGGAAGTGGAGCAGGTG SEQ ID NO:52

[0227] Amplification was achieved using the High Fidelity Polymerase (Roche) and a PTC-200 DNA Engine (MJ Research) with cycling as follows: 2'@95°C; 25x (20"@95°C, 30"@52°C, 2'@72°C); 10'@72°C. PCR amplicons were cloned into the pCR2.1 TOPO and transformed into TOP10 chemically competent cells (Invitrogen) using the standard protocol. Clones were sequence verified using Grills 16th BDTv3.1/dGTP chemistry (Applied Biosystems Inc) and a 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems Inc). All sequences were analyzed by alignments to the 'V BASE sequence directory' (Tomlinson, et al, *J. Mol. Biol.*, 227, 776–798 (1992); *Hum. Mol. Genet.*, 3, 853–860 (1994); *EMBO J.*, 14, 4628–4638 (1995). The germline gene segment usages of exemplary anti IL-6 antibodies are listed in Table 2.

Table 2:

Clone	Heavy chain			Light chain		Subtype
	V _H	D	J _H	V _K	J _K	
9C8	4-34	-	3b	L15	JK1	IgG1
22B5	4-34	-	3b	L15	JK1	IgG1

Full-length sequences of the ANTI-IL-6 antibody derived from hybridomas

9C8

DNA sequence of 9C8 heavy chain from hybridoma cells (variable domain in uppercase)

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCAC
 CTGCGCTATCTATGGTGGGTCTTCAGGGAGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAG
 GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCTTTCATAGTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCC
 CTCAAGAGTTCGAGTCAACATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAC
 CTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGAATTAGATGATTTTG
 ATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAACGTCTCTTCAGcctccaccaagggcccatcggtc
 ttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgctggt
 caaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcg
 tgcacaccttcccggtgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacc
 gtgcccctccagcagcttgggcaccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaa
 caccaaggtggacaagagagttgagcccaaactcttgtagacaaaactcacacatgccaccgt
 gccagcaccctgaactcctgggggggaccgtcagtcctcctcttccccccaaaacccaaggac
 accctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaaga
 ccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatgccaagacaaagc
 cgcgaggagagcagtacaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactgggtgaatggcaaggagtacaagtgaagggtctccaacaaagccctcccagcccccat
 cgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccc
 catcccggtgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctat
 cccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccac
 gcctcccgtgctggactccgacgggtccttcttctctacagcaagctcacctgggacaaga
 gcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccac
 tacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa SEQ ID NO:1

Derived protein sequence (by translation) of 9C8 heavy chain from hybridoma cells (variable domain in uppercase)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIYGGSFREYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIFHSGSTNYNPS
 LKSRVNISVDTSKNQFSLKLTSVTAADTAVYYCAREELDDFDIWGQGTMTVTVSSastkgspsv
 fplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssglyslssvvt
 vpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtccppcpapellggpsvflfpkpkd
 tlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrsvsvltvlhq
 dwlngkeykckvsnkalpapiektiskakggpprepqvytlppsrdeitknqvsitclvkgyf

psdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealnhh
ytqkslsispkg SEQ ID NO:3

DNA sequence of 9C8 light chain from hybridoma cells (variable domain in uppercase)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGTCTGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGA
AAGCCCCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTT
AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGCCTGCAGCCTGAAGATTT
TGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAAAAGTTACCCTCGGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAGG
TGGAATCAAacgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttccccgccatctgatgagcag
ttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaa
agtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtggtcacagagc
aggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactac
gagaaacacaaagtctacgctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgccccgtcacaaa
gagcttcaacaggggagagtg SEQ ID NO:12

Derived protein sequence (by translation) of 9C8 light chain from hybridoma cells (variable domain in uppercase)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYKSYPRTFGQGTKVEIKrtvaapsvfifppsdeq
lksgtasvvcllnnfyfpreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsdstylsstltlskady
ekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec SEQ ID NO:14

ANTI-IL-6 antibodies variable domains were cloned into expression vectors as follows:

[0228] The variable domains were amplified from pCR2.1 cloned cDNA using primers listed in Table 3. Amplification was achieved using the *Pfx* Platinum polymerase (Invitrogen) and a PTC-200 DNA Engine (MJ Research) with cycling as follows: 2'@94°C; 20x (30"@94°C, 45"@55°C, 1'@68°C); 5'@68°C. The variable domains were then cloned into expression vectors containing constant domains of the appropriate isotype. These clones were sequence verified using Grills 16th BDTv3.1/dGTP chemistry (Applied Biosystems Inc) and a 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems Inc).

Table 3: Variable domain primers (5' to 3') for 9C8

H4_34	ttacagtGCGCGCACTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGG SEQ ID NO:53
K_O12	ttacagtGTGCACTCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCC SEQ ID NO:54
G1/2_ch1(ApaI)_R	GAAGACCGATGGGCCCTTGG SEQ ID NO:55
JK1_R	tatattccttaattaagttattctactcacGTTTGATTTCACCTTGGTCC CT SEQ ID NO:56

Full-length sequences of recombinant ANTI-IL-6 antibodies**9C8**

DNA sequence of recombinant 9C8 IgG2 heavy chain (variable domain in uppercase)

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCTGTCCCTCAC
CTGCGCTATCTATGGTGGGTCTTCAGGGAGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAG
GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCTTTCATAGTGAAGACCAACTACAACCCGTCC
CTCAAGAGTTCGAGTCAACATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAC
CTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGAATTAGATGATTTTG
ATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAACGTCTCTTCAGcctccaccaagggcccatcggtc
ttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcggccctgggctgacctggt
caaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggcg
tgcacaccttcccggtgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtagtgacc
gtgccctccagcaacttcggcaccagacctacacctgcaacgtagatcacaagcccagcaa
caccaaggtggacaagacagttgagcgcaaagtgtgtgagtgcccaccgtgcccagcac
cacctgtggcaggaccgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacacctcatgatc
tcccggaaccttgaggtcacgtgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccccgaggtcca
gttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccacgggaggagc
agttcaacagcacgttccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcgtgcaccaggactggctgaac
ggcaaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaaggcctcccagcccccatcgagaaaaccat
ctccaaaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgcccccatcccgggagg
agatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctaccccagcgacatc
gccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaaactacaagaccacacctcccatgct
ggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagc
aggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacacagaag
agcctctccctgtctccgggtaaa SEQ ID NO:23

Derived protein sequence (by translation) of recombinant 9C8 IgG2 heavy chain (variable domain in uppercase)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIYGGSFREYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIFHSGSTNYNPS
LKSRVNISVDTSKNQFSLKLTSVTAADTAVYYCAREELDDFDIWQGQTMVTVSSastkgpsv
fplapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavllqssglyslssvvt
vpssnfgtqttytcnvdhkpsntkvdkterkccvecppcpappvagpsvflfppkpkdtlmi
srtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwln

gkeykckvsnkglpapiektisktkgqpprepqvytlppsreemtknqvsltclvkgyfypsdi
avewesngqpennykttppmldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqk
slslspgk SEQ ID NO:24

DNA sequence of recombinant 9C8 Kappa light chain (variable domain in uppercase)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCAT
CACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGAGA
AAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTC
AGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGCCTGCAGCCTGAAGATTT
TGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAAAAGTTACCCTCGGACGTTCCGGCCAAGGGACCAAGG
TGGAAATCAAACgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttccccgccatctgatgagcag
ttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaa
agtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagc
aggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagcaaagcagactac
gagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaa
gagcttcaacaggggagagtgt SEQ ID NO:25

Derived protein sequence (by translation) of recombinant 9C8 Kappa light chain (variable domain in uppercase)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRF
SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYKSYPRTFGQGTKVEIKrtvaapsvfifppsdeq
lksgtasvvcllnnfympreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsdstyslsstltliskady
ekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec SEQ ID NO:26

Example 3

Mutagenesis of anti-IL-6 antibody:

[0229] Amino acid substitution variants of the anti-IL-6 antibody 9C8 in the heavy chain variable domain were made at positions 24 (I24V), 30 (R30S), 31 (E31G), 52 (F52N), 68 (N68T), 83 (T83S) either singly or in combination both in the context of an IgG1 or an IgG2 format. Amino acid substitution variants of the anti-IL-6 antibody 9C8 in the light chain variable domain were made at 92 (K92N) both as an IgG1 or an IgG2 format. Antibodies having both a heavy chain variable domain and a light chain variable domain variant were made. Some of the various mutation combinations are shown in Table 6a and 6b. Mutagenesis, in the V_H (I24V), V_H (E31G), V_H (N68T), and V_H (T83S) regions of clone 9C8, was conducted with the primers listed in Table 4 (sense strands shown; targeted residue shown in bold) and the QuickChange kit (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The mutated variants were sequence verified and cloned into expression vectors by standard procedures.

Table 4: Mutagenic primers (5' to 3') for 9C8

9C8_H_I24V	CCTCACCTGCGCT GT CTATGGTGGGTCC SEQ ID NO: 57
9C8_H_E31G	GGGTCCTTCAGGGGGTACTACTGGAGCTG SEQ ID NO: 58
9C8_H_N68T	CCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACG SEQ ID NO: 59
9C8_H_T83S	CTCCCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCC SEQ ID NO: 60

DNA sequence of recombinant 9C8 IgG2 heavy chain (N68T, T83S) heavy chain

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCAC
CTGCGCTATCTATGGTGGGTCTTCAGGGAGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCAG
GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCTTTCATAGTGAAGACCAACTACAACCCGTCC
CTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAG
CTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGAATTAGATGATTTTG
ATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCAgcctccaccaagggcccatcggtc
ttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcacagcgccctgggctgctggg
caaggactacttccccgaaccggtgacgggtgtcgtggaactcaggcgctctgaccagcggtg
tgcacaccttcccggtgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtagtgacc
gtgccctccagcaacttcggcaccagacctaactgcaacgtagatcacaagcccagcaa
caccaaggtggacaagacagttgagcgcaaagtgtgtgtcgagtgccaccggtgccagcac
cacctgtggcaggaccgtcagtccttctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatc
tcccggaccctgaggtcacgtgcgtgggtgggacgtgagccacgaagaccccgaggtcca
gttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatgccaaagacaaagccacgggaggagc
agttcaacagcacgttccgtgtgggtcagcgctctcacgctcgtgcaccaggactgggtgaac
ggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaaaggcctcccagcccccatcgagaaaaccat

ctccaaaaccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatccccgggagg
 agatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctaccccagcgacatc
 gccgtggagtgaggagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctcccatgct
 ggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagc
 aggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgcagaag
 agcctctccctgtctccgggtaaa SEQ ID NO:27

Derived protein sequence (by translation) of recombinant 9C8 IgG2 heavy chain (N68T, T83S) heavy chain

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIYGGSFREYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIFHSGSTNYNPS
 LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREELDDFDIWGQGTMTVTVSSastkgpsv
 fplapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssglyslssvvt
 vpssnfgtqtytcnvdhkpsntkvdkterkccvecpccpappvagpsvflfppkpkdtlmi
 srtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnatkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwln
 gkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepvytlppsreemtknqvsltclvkgyfypsdi
 avewesngqpennykttppmldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqk
 slslspgk SEQ ID NO:28

DNA sequence of recombinant 9C8 IgG1 heavy chain (N68T, T83S) heavy chain

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCAC
 CTGCGCTATCTATGGTGGGTCTTCAGGGAGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAG
 GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCTTTCATAGTGAAGACCAACTACAACCCGTCC
 CTCAAGAGTTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAG
 CTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGAATTAGATGATTTTG
 ATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCAACGCTCTCTCAGcctccaccaagggcccatcggtc
 tccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgctggt
 caaggactacttccccgaaccgggtgacgggtgtcgtggaactcaggcgccctgaccagcggcg
 tgcacaccttcccggtgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtagtacc
 gtgcctccagcagcttgggcacccagacctacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaa
 caccaaggtggacaagaaagttgagcccaaactcttgtagacaaaactcacacatgccaccgt
 gccagcacctgaactcctggggggaccgtcagtccttcttccccccaaaacccaaggac
 accctcatgatctcccgaccctgaggtcacatgctggtggtggacgtgagccacgaaga
 ccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcggtggaggtgcataatgccaagacaaagc
 cgcgaggaggagcagtagaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccag
 gactggctgaatggcaaggagtagaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccat
 cgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccc
 catccccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgctggtcaaaggcttctat
 ccagcgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccac
 gcctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaaga
 gcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccac
 tacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa SEQ ID NO:31

Protein sequence of recombinant 9C8 IgG1 heavy chain (N68T, T83S) heavy chain

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIYGGSFREYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIFHSGSTNYNPS
 LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREELDDFDIWGQGTMTVTVSSastkgpsv
 fplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavlgssglyslssvvt
 vpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtcppcpapellggpsvflfppkpkd
 tlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqynstyrvsvltvlhq
 dwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvytlppsreemtknqvsltcclvkgyf
 psdiavewesngqpennykttppvldsdgsfflyskltvdkswqqgnvfscsvmhealnhh
 ytkkslspsgk SEQ ID NO:32

Variable domain DNA sequence of recombinant 9C8 (E31G, N68T, T83S) heavy chain

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCAC
 CTGCGCTATCTATGGTGGGTCTTCAGGGGGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAG
 GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCTTTCATAGTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCC
 CTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAG
 CTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGAATTAGATGATTTTG
 ATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCA SEQ ID NO:33

Variable domain translated protein sequence of recombinant 9C8 (E31G, N68T, T83S)
 heavy chain

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIYGGSFRRYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIFHSGSTNYNPS
 LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREELDDFDIWGQGTMTVTVSS SEQ ID
 NO:34

Variable domain DNA sequence of recombinant 9C8 (I24V, N68T, T83S) heavy chain

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCAC
 CTGCGCTGTCTATGGTGGGTCTTCAGGGAGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGCCCCCAG
 GGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCTTTCATAGTGGAAGCACCAACTACAACCCGTCC
 CTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGAG
 CTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGGAATTAGATGATTTTG
 ATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCA SEQ ID NO:36

Variable domain translated protein sequence of recombinant 9C8 (I24V, N68T, T83S) heavy
 chain

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFREYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIFHSGSTNYNPS
 LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREELDDFDIWGQGTMTVTVSS SEQ ID
 NO:37

[0230] The CMV promoter containing expression vectors were transfected in 293
 Freestyle (Invitrogen) cells according to the vendor's protocol. Supernatants from these
 cells were collected by centrifugation and purified by standard Protein-A affinity

chromatography to isolate recombinant immunoglobulins. These proteins were then characterized by SDS-PAGE, light scatter, and spectrophotometrically.

[0231] The heavy and light chains of the anti-IL-6 antibodies indicated in Table 5 were deposited under terms in accordance with the Budapest Treaty with the American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209. The heavy & light chains have been assigned the following accession numbers:

Table 5

Antibody	Clone Designation	ATCC Designation	Patent Deposit Designation	Deposit Date
9C8 heavy chain IgG1	E. coli; pCR2.1 TOPO 9C8H(WT)	UC25510	PTA-8013	Nov. 21, 2006
9C8 light chain IgG1	E. coli; pCR2.1 TOPO 9C8L(WT)	UC25511	PTA-8014	Nov. 21, 2006
9C8 N68T, T83S IgG2 heavy chain	E. coli; pCR2.1 TOPO 9C8H(NT)hG2	UC25512	PTA-8015	Nov. 21, 2006
9C8 N68T, T83S IgG2 light chain	E. coli; pCR2.1 TOPO 9C8L(wt)hk	UC25513	PTA-8016	Nov. 21, 2006
9C8 E31G, N68T, T83S variable region	E. coli; pCR2.1 TOPO 9C8H(ENT)	UC25514	PTA-8017	Nov. 21, 2006
9C8 I24V, N68T, T83S variable region	E. coli; pCR2.1 TOPO 9C8H(INT)	UC25515	PTA-8018	Nov. 21, 2006
9C8 N68T, T83S IgG1 heavy chain	E. coli; pCR2.1 TOPO 9C8H(NT)hG1	UC25526	PTA-8019	Nov. 21, 2006

Example 4

TF-1 Proliferation

[0232] Human cells, TF-1 cells, from American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Va.), were obtained and maintained in RPMI-1640 medium containing 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, Ca.), with 2 ng/ml recombinant human GM-CSF. TF-1 cells were split to $1-2 \times 10^5$ for next day use. Prior to plating, the cells were washed three times with RPMI-1640, counted, and the volume adjusted with assay medium to yield 2×10^5 cells/ml. To each well, 50 μ l of the washed cells was added and incubated overnight at 37°C with 5% CO₂. All conditions were conducted in triplicate in 96-

well tissue culture treated plates (Corning, Corning, NY). To each well, either 25 ng/ml or 2.5 ng/ml IL-6 in a volume of 25 μ l and test or control antibodies at various concentrations in a volume of 25 μ l in sodium phosphate buffer (10 mM sodium phosphate and 150 mM sodium chloride, pH 7.4) to a final volume of 100 μ l was added. Antibodies were tested alone and with human IL-6. The plates were incubated for 48 hours (hrs) at 37°C with 5% CO₂. After 48 hours, 10 μ l/well of 0.5 μ Ci ³H-thymidine (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.) was added and pulsed with the cells for 3 hrs. To detect the amount of incorporated thymidine, the cells were harvested onto pre-wet unifilter GF/C filterplates (Packard, Meriden, Ct.) and washed 10 times with water. The plates were allowed to dry overnight. Bottom seals were added to the filterplates. Next, 45 μ l Microscint 20 (Packard, Meriden, Ct.) per well was added. After a top seal was added, the plates were counted in a Trilux microbeta counter (Wallac, Norton, Oh.) and data is reported as CPM (counts per minute). Tables 6a and 6b show the IC₅₀s in the TF-1 proliferation assay of the 9C8 antibody and the various antibodies having amino acid substitutions. The results shown in Table 6a and Table 6b are from assays done on two separate occasions.

Table 6a

Hc	Lc	Average IC ₅₀ (μ g/ml)	Fold Difference
9C8	9C8	0.0022	1.0
9C8 I24V	9C8	0.0071	3.3
9C8 R30S	9C8	0.0260	12.1
9C8 N68T	9C8	0.0028	1.3
9C8 T83S	9C8	0.0026	1.2
9C8 I24V, N68T, T83S	9C8	0.0145	6.7
9C8 I24V, R30S, N68T, T83S	9C8	0.2040	94.9
9C8 E31G	9C8	0.0051	2.4
9C8 F52N	9C8	1.3850	644.2
9C8	9C8 K92N	0.0120	5.6

Table 6b

Hc	Lc	Average IC ₅₀ (μ g/ml)	Fold Difference
9C8	9C8	0.0031	1.4
9C8 N68T, T83S	9C8	0.0030	1.4
9C8 E31G, N68T, T83S	9C8	0.0083	3.9
9C8 I24V, E31G, N68T, T83S	9C8	0.0528	24.5
9C8 N68T, T83S	9C8 9C8 K92N	0.0186	8.6
9C8 E31G, N68T T83S	9C8 K92N	0.1015	47.2
9C8 I24V, E31G N68T, T83S	9C8 K92N	0.9670	449.9

Hc = heavy chain, Lc = light chain

Example 5

C-Reactive Protein from LPS-Monkey Study

[0233] The in-vivo portion of this study was conducted by Charles River Laboratories Preclinical Services at their Worcester, MA Test Facility. Briefly, the study consisted of fifteen male cynomolgus monkeys (five groups; 3 monkeys/group). On Day 1 animals in group 1 received vehicle; animals in Groups 2 and 3 received the antibody 9C8 N68T T83S IgG₁ at doses of 0.5 and 5 mg/kg, respectively; and animals in Groups 4 and 5 received 9C8 N68T T83S IgG₂ at doses of 0.5 and 5 mg/kg, respectively. All treatments were administered by IV bolus injection at dose volumes of 1 mL/kg each. Approximately 2 hours after treatment, all animals were challenged with 10 µg/kg bacterial lipopolysaccharide (LPS) at a volume of 1 mL/kg by slow IV bolus injection. On Day 1 blood was collected from a peripheral vessel at baseline (prior to treatment); immediately following treatment; 2 hours post-treatment (immediately prior to LPS administration); and at 30 minutes and 1, 2, 3, 4, 6, 8, and 22 hours after LPS challenge. Blood samples were also collected on Days 3, 4, 5, 6 and 7. Whole blood samples were processed for serum and serum samples were stored frozen. C-Reactive Protein (CRP) was measured using a human Vascular Injury Panel II Multi-Spot® Assay Kit from Meso Scale Discovery (MSD®), Gaithersburg, MD. Assays were performed as outlined in published kit instructions from MSD. Figure 2 shows the total serum CRP for the 9C8 N68T T83S IgG₂ antibody.

Example 6

pSTAT3 Assay by Flow Cytometry

[0234] In vitro assays were conducted in human whole blood and human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) stimulated with recombinant human IL-6 (rhIL-6) to measure phosphorylated STAT3 (pSTAT3) levels in the presence of anti-IL-6 antibodies.

Whole Blood Assay

[0235] Freshly collected heparinized human whole blood was incubated with anti-IL-6 antibody or vehicle control (final volume 300 µL in 15 mL polypropylene tube) for 15 minutes at 37°C. Samples were stimulated with recombinant human (rh) IL-6 for a final

concentration of 25 ng/mL and incubated for 10 minutes at 37°C. Red blood cells (RBCs) were then lysed with 4 mL RBC Lysing Buffer (Sigma), and samples were mixed gently for 10 minutes at 37°C. Samples were spun at 400 × g for 5 min to pellet cells. Supernatants were removed. Two milliliters of wash buffer (4% BSA in PBS, Gibco) were added to each tube, and then samples were spun at 400 × g for 5 min to pellet cells. Supernatants were removed, and cell pellets were resuspended in 200 µL of preheated (37°C) permeabilization buffer (2% formaldehyde in PBS, Polysciences, Inc.) and incubated at 37°C for 10 minutes. Three milliliters of ice cold MeOH was added to each sample to fix the cells. Samples were mixed and placed on ice for at least 30 min. Samples were spun (400× g for 5 min.) and supernatants were removed. Pellets were washed once with wash buffer. Cell pellets were then stained with anti-phosphorylated STAT3 (Y705) antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (BD Pharmingen) diluted in wash buffer, final volume 100 µL. Samples were incubated on ice for 30 minutes then washed 2X in wash buffer. Final cell pellets were resuspended in 400 µL IF Buffer (Hank's Buffered Saline Solution, 2% Fetal Calf Serum, 10 mM Hepes, 0.2% Sodium Azide, Gibco). A FACSCalibur instrument using CellQuest software (BD Biosciences) was used to collect and analyze data. Table 7 shows the pSTAT3 levels in the presence of anti-IL-6 antibodies as measured in human whole blood.

Table 7

Anti IL-6 Antibody	IL-6 Conc ng/ml	WB IC50 µg/ml	Assay #
9C8	25	0.487	1
	25	0.432	2
	25	0.482	3
I24V,N68T,T83S	25	0.420	1
	25	0.527	2
	25	0.749	3
E31G,N68T,T83S	25	0.626	1
	25	0.714	2
	25	0.968	3
I24V,E31G,N68T,T83S	25	0.364	1
	25	0.603	2
	25	0.821	3

PBMC Assay

[0236] Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from freshly collected heparinized human whole blood using Accuspin System-Histopaque 1077 columns according to manufacture's protocol (Sigma-Aldrich A7054) and placed in (0.1 % penicillin

streptomycin in Macrophage SFM Media, Gibco). Approximately 2×10^6 PBMCs were incubated with anti-IL-6 antibody or vehicle control (final vol. 300 μ L) for 15 min. at 37°C. PBMCs were stimulated with rhIL-6 for a final concentration of 25 ng/mL and incubated for 10 min. at 37°C. Samples were spun at 400 $\times$ g for 5 min to pellet cells. Supernatants were removed. Two mL wash buffer (4% BSA in PBS) was added to each sample. Samples were spun at 400 $\times$ g 5 min to pellet cells. Supernatants were removed and cell pellets were resuspended in 200 μ L of preheated (37°C) permeabilization buffer (2% formaldehyde in PBS, Polysciences, Inc.) and incubated at 37°C for 10 min. Three milliliters of ice cold MeOH was added to each sample to fix the cells. Samples were mixed and kept on ice for at least 30 min. Samples were spun at 400 $\times$ g for 5 min. and supernatants were removed. Cell pellets were washed once with wash buffer then stained and analyzed as described in the whole blood assay. Table 8 shows the pSTAT3 levels in the presence of anti-IL-6 antibodies as measured in human peripheral blood mononuclear cells.

Table 8

Anti IL-6 Antibody	IL-6 conc. ng/ml	PBMC IC50 μ g/ml
9C8	25	0.210
R&D MAB2061	25	0.580

Example 7

Binding Affinity*Preparation of BIAcore Chips*

[0237] The anti-IL-6 antibody 9C8 N68T T83S IgG2 was immobilized onto BIAcore CM5 chips (GE Biosciences - formerly BIAcore Inc, Piscataway, NJ) by amine coupling to carboxymethylcellulose (CM) attached to the dextran matrix of the chip as described by Löfås & Johnsson (*J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1990); 21:pp1526-1528). The chip was pretreated with 1 M NaCl and 50 mM NaOH prior to coupling. Amine coupling was accomplished by combining EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide and NHS (N-hydroxysuccinimide) and passing across the chip to activate the CM groups. The ligand in 10 mM acetate buffer pH 5 was passed across the chip surface and covalently bound to the activated CM group. The remaining active CM groups on the chip surface were quenched by passing 1M ethanolamine pH 8.5 across the chip. The EDC, NHS, and ethanolamine were

obtained as part of the Amine Coupling kit obtained from GE Biosciences. Coupling was performed using the automated Surface Preparation Wizard included with the BiaControl Software V3.2.

Determination of Binding Affinity

[0238] All SPR measurements were performed on a BIAcore 3000 instrument (GE Biosciences, Piscataway, NJ). BIAcore Software – BIAcore 3000 Control Software V3.2 was used for the operation and control of the BIAcore 3000 instrument. BiaEvaluation Software V4.1 was used for the analysis of SPR data from the BIAcore 3000 instrument and data was plotted using Graph Pad Prism Software Version 5. The binding affinity of IL-6 to monoclonal antibodies (mAb) was measured in HBS-EP buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3.4 mM EDTA, 0.005% P20) at 25°C. The flow rate for the affinity study was 40 $\mu\text{L}/\text{minute}$ to minimize mass transport effects (Myszka, D. G., et al., *Biophysical chemistry*. 64, 127-137, 1997). Human IgG_k was used as the ligand for the construction of the reference channel of the chip. Analyte (rhIL-6; R&D Systems, Minneapolis, MN, 206-IL) binding to the immobilized ligand (9C8 N68T T83S IgG₂) was measured in duplicate and the concentration of the IL-6 ranged from 0 to 25 nM. Injection time for IL-6 was 6 minutes and dissociation time was 25 minutes. The surface was regenerated between cycles by 10 mM glycine pH 1.7 for 30 seconds at a flow rate of 30 $\mu\text{L}/\text{min}$. The regeneration conditions were established to be optimal after a regeneration study (data not shown). Data was analyzed by using the Kinetics Wizard and the manual fitting programs that are both included with the BiaEvaluation Software V4.1 using a 1:1 Langmuir model (Karlson R & Fält A., *J. Immunol. Methods*. 200: pp121-133, 1997). The anti IL-6 antibody 9C8 N68T T83S IgG₂ was shown to have $k_a = 9.95\text{E}+05 \text{ (Ms)}^{-1}$, a $k_d = 1.34\text{E}-04 \text{ s}^{-1}$ and a $K_D = 1.35\text{E}-10 \text{ M}$ or 135 pM.

SUMMARY OF SEQUENCE LISTING (sequences are amino acid sequences except those indicated by 'n.a.' for nucleic acid)

SEQ ID NO:	SEQUENCE		SEQ ID NO:	SEQUENCE
1	heavy 9C8 IgG1 n.a.		23	heavy 9C8 IgG2 n.a.
2	V _H 9C8 n.a.		24	heavy 9C8 IgG2
3	heavy 9C8 IgG1		25	light 9C8 IgG2 n.a.
4	V _H 9C8		26	light 9C8 IgG2
5	V _H CDR1 9C8		27	heavy 9C8 N68T T83S IgG2 n.a.
6	V _H CDR2 9C8		28	heavy 9C8 N68T T83S IgG2
7	V _H CDR3 9C8		29	V _H 9C8 N68T T83S
8	V _H FR1 9C8		30	V _H FR3 9C8 N68T T83S
9	V _H FR2 9C8		31	heavy 9C8 N68T T83S IgG1 n.a.
10	V _H FR3 9C8		32	heavy 9C8 N68T T83S IgG1
11	V _H FR4 9C8		33	V _H 9C8 E31G N68T T83S n.a.
12	light 9C8 IgG1 n.a.		34	V _H 9C8 E31G N68T T83S
13	V _L 9C8 n.a.		35	V _H CDR1 9C8 E31G N68T T83S
14	light 9C8 IgG1		36	V _H 9C8 I24V N68T T83S n.a.
15	V _L 9C8		37	V _H 9C8 I24V N68T T83S
16	V _L CDR1 9C8		38	V _H FR1 9C8 I24V N68T T83S
17	V _L CDR2 9C8		39	V _H 22B5 n.a.
18	V _L CDR3 9C8		40	V _H 22B5
19	V _L FR1 9C8		41	V _H CDR3 22B5
20	V _L FR2 9C8		42	V _L 22B5 n.a.
21	V _L FR3 9C8		43	V _L 22B5
22	V _L FR4 9C8		44	Consensus 1 CDR3
			45	Consensus 2 CDR3

We Claim:

1. An isolated human monoclonal antibody or antigen-binding portion thereof comprising a heavy chain variable (V_H) domain amino acid sequence comprising a CDR1, CDR2, and CDR3 region selected from the group consisting of:

- a) a V_H CDR1 as set forth in SEQ ID NO:5, a V_H CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6, and a V_H CDR3 as set forth in SEQ ID NO:7;
- b) a V_H CDR1 as set forth in SEQ ID NO:35, a V_H CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6, and a V_H CDR3 as set forth in SEQ ID NO:7;
- c) a V_H CDR1 as set forth in SEQ ID NO:5, a V_H CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6, and a V_H CDR3 as set forth in SEQ ID NO:41;
- d) a V_H CDR1 as set forth in SEQ ID NO:5, a V_H CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6, and a V_H CDR3 as set forth in SEQ ID NO:44; and
- e) a V_H CDR1 as set forth in SEQ ID NO:5, a V_H CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6, and a V_H CDR3 as set forth in SEQ ID NO:45;

wherein said antibody binds specifically to human IL-6.

2. The isolated human antibody or antigen-binding portion according to claim 1 further comprising a light chain variable (V_L) domain amino acid sequence comprising a V_L CDR1 as set forth in SEQ ID NO:16, a V_L CDR2 as set forth in SEQ ID NO:17, and a V_L CDR3 as set forth in SEQ ID NO:18.

3. An isolated human antibody or antigen-binding portion thereof comprising a light chain variable (V_L) domain amino acid sequence comprising a V_L CDR1 as set forth in SEQ ID NO:16, a V_L CDR2 as set forth in SEQ ID NO:17, and a V_L CDR3 as set forth in SEQ ID NO:18;

wherein said antibody binds specifically to human IL-6.

4. The isolated antibody or antigen-binding portion thereof according to claim 2 comprising: a V_H CDR1 as set forth in SEQ ID NO:5, a V_H CDR2 as set forth in SEQ ID NO:6, a V_H CDR3 as set forth in SEQ ID NO:7, a V_L CDR1 as set forth in SEQ ID NO:16, a V_L CDR2 as set forth in SEQ ID NO:17, and a V_L CDR3 as set forth in SEQ ID NO:18.

5. An isolated human monoclonal antibody or antigen-binding portion thereof comprising a heavy chain variable (V_H) domain amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:37 and SEQ ID NO:40 or differs from any one of SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:37 and SEQ ID NO:40 by having at least one conservative amino acid substitution or differs from any one of SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:37 and SEQ ID NO:40 by having at least one germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:46; wherein said antibody binds specifically to human IL-6.

6. The antibody or antigen-binding portion thereof according to claim 5, wherein the V_H domain is at least 90% identical in amino acid sequence to any one of SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:34, SEQ ID NO:37 and SEQ ID NO:40.

7. An isolated human monoclonal antibody or antigen-binding portion thereof comprising a light chain variable (V_L) domain amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:15 or differs from SEQ ID NO:15, by having a conservative amino acid substitution, or differs from SEQ ID NO:15, by having a germline amino acid substitution compared to SEQ ID NO:47; wherein said antibody binds specifically to human IL-6.

8. The antibody or antigen-binding portion thereof according to claim 7, comprising a V_L domain that is at least 90% identical in amino acid sequence to SEQ ID NO:15.

9. The isolated human monoclonal antibody or antigen-binding portion thereof according to claim 5 further comprising a light chain variable (V_L) domain amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:15 or differs from SEQ ID NO:15, by having a conservative amino acid substitution, or differs from SEQ ID NO:15 by having a germline amino acid substitution compared to their respective germline sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:47.

10. An isolated human monoclonal antibody or antigen-binding portion thereof comprising V_L and V_H domains at least 90% identical in amino acid sequence to the V_L and V_H domains, respectively, of antibody 9C8, 9C8 N68T T83S, 9C8 E31G N68T T83S, 9C8 I24V N68T T83S, and 22B5; wherein said antibody binds specifically to human IL-6.

11. An isolated human monoclonal antibody or antigen-binding portion thereof comprising:
- a) at least one heavy chain CDR1, CDR2 and/or CDR3 independently selected from the heavy chain of an antibody selected from the group consisting of monoclonal antibodies 9C8 IgG1, 9C8 IgG2, 9C8 N68T T83S IgG1, 9C8 N68T T83S IgG2, 9C8 E31G N68T T83S IgG1, 9C8 E31G N68T T83S IgG2, 9C8 I24V N68T T83S IgG1, 9C8 I24V N68T T83S IgG2 and 22B5 IgG1; or
 - b) at least one light chain CDR1, CDR2 and/or CDR3 independently selected from the light chain of an antibody selected from the group consisting of monoclonal antibodies 9C8 IgG1, 9C8 IgG2, 9C8 N68T T83S IgG1, 9C8 N68T T83S IgG2, 9C8 E31G N68T T83S IgG1, 9C8 E31G N68T T83S IgG2, 9C8 I24V N68T T83S IgG1, 9C8 I24V N68T T83S IgG2 and 22B5 IgG1; or
 - c) at least a heavy chain CDR1, CDR2 and/or CDR3 independently selected from the heavy chain of an antibody selected from the group consisting of monoclonal antibodies 9C8 IgG1, 9C8 IgG2, 9C8 N68T T83S IgG1, 9C8 N68T T83S IgG2, 9C8 E31G N68T T83S IgG1, 9C8 E31G N68T T83S IgG2, 9C8 I24V N68T T83S IgG1, 9C8 I24V N68T T83S IgG2 and 22B5 IgG1 and at least one light chain CDR1, CDR2 and/or CDR3 independently selected from the light chain of an antibody selected from the group consisting of monoclonal antibodies 9C8 IgG1, 9C8 IgG2, 9C8 N68T T83S IgG1, 9C8 N68T T83S IgG2, 9C8 E31G N68T T83S IgG1, 9C8 E31G N68T T83S IgG2, 9C8 I24V N68T T83S IgG1, 9C8 I24V N68T T83S IgG2 and 22B5 IgG1; wherein said antibody binds specifically to human IL-6.
12. An isolated human monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain having an amino sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:28, and SEQ ID NO:32, or differs from any one of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:28, and SEQ ID NO:32, by having a conservative amino acid substitution, or differs from any one of SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:28, and SEQ ID NO:32, by having a germline amino acid substitution compared to their respective germline sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:46; wherein said antibody binds specifically to human IL-6.
13. An isolated human monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a light chain having an amino sequence selected from the group consisting of

SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:43, or differs from any one of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:43 by having a conservative amino acid substitution, or differs from any one of SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:26 and SEQ ID NO:43 by having a germline amino acid substitution compared to the corresponding germline sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:47; wherein said antibody binds specifically to human IL-6.

14. The isolated human monoclonal antibody or antigen binding portion thereof comprising a heavy chain and a light chain selected from the group consisting of:
- a) the heavy chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:3 and the light chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:14;
 - b) the heavy chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:24 and the light chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:26;
 - c) the heavy chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:28 and the light chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:26; and
 - d) the heavy chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO:31 and the light chain having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 14.

15. The isolated human monoclonal antibody or antigen binding portion thereof according to claim 14 wherein the heavy chain amino acid sequence is SEQ ID NO:28 and the light chain amino acid sequence is SEQ ID NO:26.

16. The isolated monoclonal antibody or an antigen-binding portion thereof according to any one of claims 1, 2, 3, 4, and 11 further comprising one or more V_H FR1, FR2, FR3 or FR4 and/or V_L FR1, FR2, FR3 or FR4 amino acid sequence of an antibody selected from the group consisting of: 9C8, 9C8 N68T T83S, 9C8 E31G N68T T83S, 9C8 I24V N68T T83S, and 22B5.

17. A pharmaceutical composition comprising the antibody or antigen-binding portion according to any one of claims 1 to 16 and a pharmaceutically acceptable carrier.

18. An isolated cell line that produces the antibody or antigen-binding portion according to any one of claims 1 to 16 or the heavy chain or light chain of said antibody or said antigen-binding portion.

19. An isolated nucleic acid molecule comprising a nucleotide sequence that encodes an antibody according to any one of claims 1 to 16.
20. A vector comprising the nucleic acid molecule according to claim 19, wherein the vector optionally comprises an expression control sequence operably linked to the nucleic acid molecule.
21. A host cell comprising the vector according to claim 20 or the nucleic acid molecule according to claim 19.
22. A method for treating, preventing or alleviating the symptoms of a IL-6 mediated disorder in a subject in need thereof, comprising administering to said subject an antibody or antigen-binding portion according to any one of claims 1 to 16 or the pharmaceutical composition according to claim 17.
23. The method of claim 22, wherein the subject is afflicted with one or more conditions or disorders selected from the group consisting of an inflammatory disorder, an allergic disorder, an autoimmune disorder, a graft rejection disorder, atherosclerosis, osteoporosis, neuropathic pain, type 2 diabetes mellitus, chronic obstructive pulmonary disease, multiple sclerosis, sepsis, cancer, and a fibrotic condition.
24. The method of claim 23 wherein said inflammatory disorder is selected from the group consisting of rheumatoid arthritis, juvenile idiopathic arthritis, osteoarthritis, systemic lupus erythematosus, ankylosing spondylitis, psoriasis, Castleman's disease, Crohn's disease, and adult-onset Still's disease,
25. The method of claim 23 wherein said fibrotic condition is selected from the group consisting of liver fibrosis, renal fibrosis, and pulmonary fibrosis.
26. The method of claim 23 wherein said cancer is selected from the group consisting of multiple myeloma, renal cell carcinoma, and Castleman's disease.

ANTI-IL6 22B5 VH REGION

GERMLINE	Q	V	Q	L	Q	Q	W	G	A	G	L	L	K	P	S	E	T	L	S	L	T	C	A	V	Y	G	G	S	F	S	G	Y	Y	W	S	I	R	Q	P	P	
22B5 VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
GERMLINE	G	K	G	L	E	W	I	G	E	I	N	H	S	G	S	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L	K	L
22B5 VH	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
GERMLINE	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	#	#	#	A	F	D	I	Q	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S	SEQ	ID	NO:46					
22B5 VH	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

FIG. 1a

2/7

ANTIHL6 22B5 VK REGION

GERMLINE	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	G	I	S	S	W	L	A	W	Y	Q	Q	K
22B5 VK2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GERMLINE	P	E	K	A	P	K	S	L	I	Y	A	A	S	S	L	Q	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L
22B5 VK2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GERMLINE	Q	P	E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	Y	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	SEQ ID NO:47									
22B5 VK2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

FIG. 1b

3/7

ANTI-IL-6 9C8 VH

GERMLINE Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G S F S G Y Y W S I R Q P

9C8 - - - - - - - - - - - - - - - I - - - - - R E - - - - - - - - - - - - - - - -

GERMLINE P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L

9C8 - - - - - - - - - - - F - - - - - - - - - - N - - - - - - - - - - - - - - - -

GERMLINE K L S S V T A A D T A V Y Y C A R # # # A F D I W G Q G T M V T V S S

SEQ ID NO:46

9C8 - - - - - T - - - - - - - - - - E E L D D - - - - - - - - - - - - - - - -

FIG. 1c

5/7

ANTI- IL-6 9C8 N68T, T83S VH

GERMLINE	Q	V	Q	L	Q	Q	W	G	A	G	L	L	K	P	S	E	T	L	S	L	T	C	A	V	Y	G	G	S	F	S	G	Y	Y	W	S	I	R	Q	P	
9C8N68TT83S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	-	-	-	-	-	R	E	-	-	-	-	-	-			
GERMLINE	P	G	K	G	L	E	W	I	G	E	I	N	H	S	G	S	T	N	Y	N	P	S	L	K	S	R	V	T	I	S	V	D	T	S	K	N	Q	F	S	L
9C8N68TT83S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
GERMLINE	K	L	S	S	V	T	A	A	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	#	#	#	#	A	F	D	I	W	G	Q	G	T	M	V	T	V	S	S				
9C8N68TT83S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

SEQ ID NO:46

FIG. 1e

6/7

[illegible]

FIG. 1f

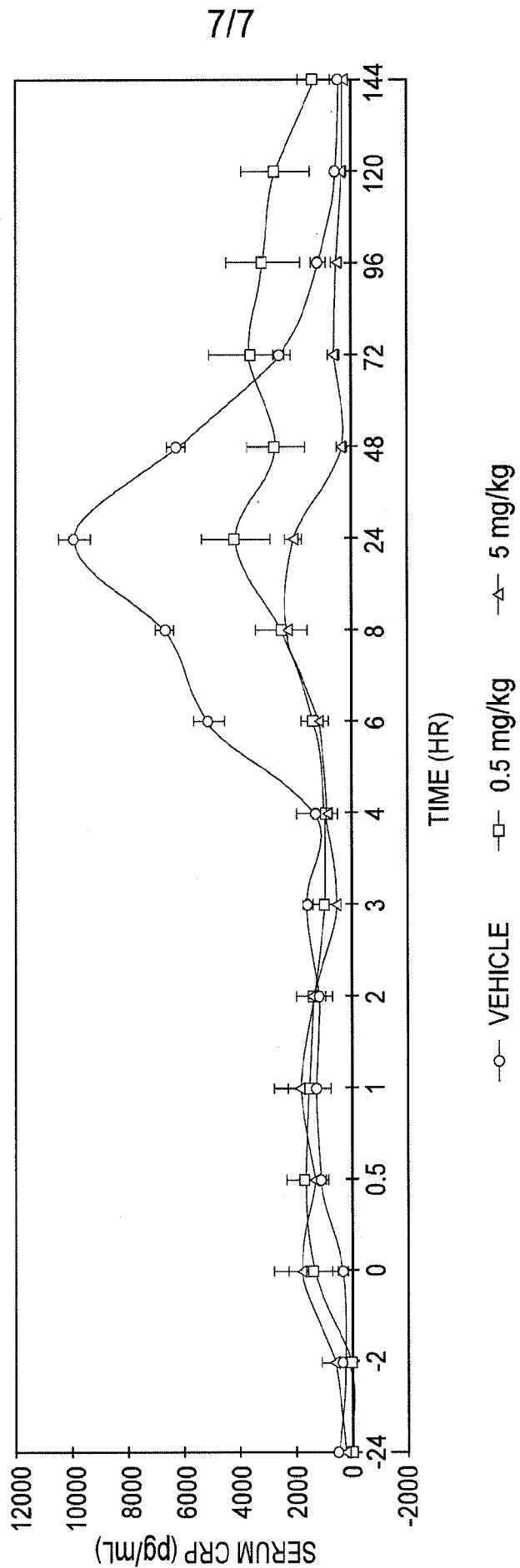


FIG. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2009/046837

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/24 A61K39/395

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2008/019061 A (VACCINEX INC [US]; SMITH ERNEST S [US]; WANG WEI [US]) 14 February 2008 (2008-02-14) abstract -----	1-26
X	WO 2006/119115 A (CENTOCOR INC [US]; APPLIED MOLECULAR EVOLUTION [US]; CHEN YAN [US]; GA) 9 November 2006 (2006-11-09) abstract -----	1-26
P,X	WO 2008/144763 A (ALDER BIOPHARMACEUTICALS INC [US]; GARCIA-MARTINEZ LEON [US]; JENSEN A) 27 November 2008 (2008-11-27) abstract -----	1-26
A	US 5 856 135 A (TSUCHIYA MASAYUKI [JP] ET AL) 5 January 1999 (1999-01-05) ----- -/--	1-26

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

X document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

Y document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 November 2009

Date of mailing of the international search report

01/12/2009

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Kalsner, Inge

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2009/046837

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	LIANG BAILIN ET AL: "Anti-interleukin-6 monoclonal antibody inhibits autoimmune responses in a murine model of systemic lupus erythematosus" IMMUNOLOGY, BLACKWELL PUBLISHING, OXFORD, GB, vol. 119, no. 3, 1 November 2006 (2006-11-01), pages 296-305, XP002506260 ISSN: 0019-2805 abstract -----	1-26
A	TSUNENARI T ET AL: "THERAPEUTIC POTENTIAL OF HUMANIZED ANTI-INTERLEUKIN-6 RECEPTOR ANTIBODY: ANTITUMOR ACTIVITY IN XENOGRAFT MODEL OF MULTIPLE MYELOMA" ANTICANCER RESEARCH, INTERNATIONAL INSTITUTE OF ANTICANCER RESEARCH, GR, vol. 16, no. 5A, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 2537-2544, XP001021494 ISSN: 0250-7005 abstract -----	1-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2009/046837

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2008019061 A	14-02-2008	AU 2007282023 A1	14-02-2008
		CA 2657763 A1	14-02-2008
		CN 101563365 A	21-10-2009
		CR 10563 A	14-04-2009
		EP 2064241 A2	03-06-2009
		KR 20090039801 A	22-04-2009
		US 2008075726 A1	27-03-2008
WO 2006119115 A	09-11-2006	AR 053370 A1	02-05-2007
		AU 2006242347 A1	09-11-2006
		CA 2606348 A1	09-11-2006
		CR 9551 A	30-07-2009
		EA 200702374 A1	30-10-2008
		EC SP077888 A	26-03-2008
		EP 1874351 A2	09-01-2008
		JP 2008538931 T	13-11-2008
		KR 20080017014 A	25-02-2008
		PA 8672101 A1	07-12-2006
		US 2006257407 A1	16-11-2006
		US 2009239258 A1	24-09-2009
WO 2008144763 A	27-11-2008	US 2009028784 A1	29-01-2009
US 5856135 A	05-01-1999	AU 6808194 A	20-12-1994
		WO 9428159 A1	08-12-1994
		TW 458985 B	11-10-2001
		US 6121423 A	19-09-2000
		ZA 9403778 A	21-02-1995

ANTICUERPOS CONTRA IL-6 Y SUS USOSREFERENCIA CRUZADA CON PATENTES RELACIONADAS Y SOLICITUDES
DE PATENTE

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisoria de los Estados Unidos serie N.º 61/073430 presentada el 18 de junio de 2008; que se incorpora a la presente por referencia en su totalidad.

ACUERDO DE INVESTIGACIÓN CONJUNTA

[0002] La descripción y las reivindicaciones de la presente se redactaron como resultado de las actividades llevadas a cabo dentro del alcance de un acuerdo de investigación conjunta vigente con anterioridad o a la fecha en que se concretó la invención reivindicada entre Pfizer Inc. y Medarex, Inc.

ANTECEDENTES

[0003] La presente invención se refiere a anticuerpos y sus porciones fijadoras de antígeno, las cuales se unen a IL-6 humano. La presente invención también se refiere a ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos y sus porciones fijadoras de antígeno; métodos para preparar dichos anticuerpos y sus porciones fijadoras de antígeno; composiciones que comprenden dichos anticuerpos o sus porciones fijadoras de antígeno; y los usos de dichos anticuerpos o sus porciones fijadoras de antígeno.

[0004] La interleuquina-6 (IL-6), también denominada interferón B2 (IFNB2), es una citosina pleiotrópica que pertenece a la familia de ligandos gp130 y es producida por muchos tipos celulares incluso linfocitos T, fibroblastos y monocitos. La IL-6 es producida en forma constitutiva con niveles bajos y es fácilmente inducida por estímulos infecciosos o citoquinas inflamatorias. La IL-6 se une a un receptor IL-6R específico (gp80) que se heterodimeriza con el gp130 fijado a la célula o soluble a fin de formar un complejo de receptor funcional. La fijación de IL-6 a su receptor inicia los eventos celulares que incluyen la activación de la vía JAK-STAT3 y las señales de MAP-cinasa mediadas por *ras*. La IL-6 puede desencadenar un amplio espectro de efectos tales como la proliferación y la diferenciación de las células B y monocitos, la activación de las células T, la hematopoyesis, la activación de osteoclastos, el crecimiento de los queratinocitos, el crecimiento neuronal, la activación de los hepatocitos y la inducción de la proteína de fase aguda proveniente de los hepatocitos.

[0005] La IL-6 juega un papel importante en las anomalías de las células B, tal como se demuestra en lupus eritematoso sistémico, mieloma múltiple y trastornos linfoproliferativos. De modo similar, la IL-6 también interviene en la patogenia de enfermedades autoinmunes e inflamatorias tales como artritis reumatoidea y osteoartritis. Recientemente, las evidencias indirectas sugieren una asociación entre IL-6 y enfermedad pulmonar obstructiva crónica y resistencia a insulina en diabetes tipo 2. La IL-6 tiene efectos tanto proinflamatorios como antiinflamatorios sobre el sistema inmune, lo cual indica que esta citoquina probablemente juegue un papel central en

la regulación de la respuesta fisiológica a la enfermedad. En consecuencia, usar IL-6 como objetivo probablemente proporcione beneficios terapéuticos en diversas áreas de enfermedad.

[0006] Se ha observado un incremento de la producción de IL-6 en numerosas enfermedades, incluso: enfermedad de Alzheimer, enfermedades autoinmunes, tales como artritis reumatoidea, inflamación, infarto de miocardio, enfermedad de Paget, osteoporosis, fibrosis hepática, tumores sólidos (carcinoma de células renales), cánceres de próstata y de vejiga, cánceres neurológicos, y enfermedades malignas de células B (p. ej., enfermedad de Castleman, ciertos linfomas, leucemia linfocítica crónica, y mieloma múltiple). Las investigaciones han indicado que la IL-6 está ligada a la patogenia de muchas de estas enfermedades, particularmente, cáncer y artritis reumatoidea y, en consecuencia, el bloqueo de IL-6 debería traducirse en beneficios clínicos.

SÍNTESIS

[0007] Un anticuerpo aislado o sus porciones fijadoras de antígeno se fijan específicamente a IL-6 y pueden actuar como antagonista de receptor de IL-6, y se producen las composiciones que comprenden el anticuerpo o la porción.

[0008] Se proveen composiciones que comprenden (i) las cadenas pesadas y/o livianas, sus dominios variables correspondientes, o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes, del anticuerpo anti-IL-6, o moléculas de ácido nucleico que los codifican; y (ii) un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones también

pueden comprender otro componente, tal como un agente terapéutico o un agente de diagnóstico.

[0009] También se proveen métodos de diagnóstico y terapéuticos. De modo similar, se proveen el anticuerpo anti-IL-6s y sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes para la fabricación de medicamentos para tratar trastornos inflamatorios y no inflamatorios.

[0010] Se proveen los vectores y células huésped que comprenden las moléculas de ácido nucleico, así como métodos para la producción recombinante de los polipéptidos codificados por las moléculas de ácidos nucleicos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0011] La Figura 1 muestra un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la línea germinal de las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas comparado con las respectivas regiones variables de las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos anti-IL-6s 9C8, 9C8 N68T T83S y 22B5 (sólo se muestran las faltas de coincidencia para los anticuerpos 9C8, 9C8 N68T T83S y 22B5). Las CDR están subrayadas y las brechas por falta de coincidencia se indican con un signo ponderado (#).

[0012] La Figura 2 muestra el total de proteína C reactiva sérica (CRP) para el vehículo y el anticuerpo 9C8 N68T T83S IgG₂ determinado por inmunoensayo de electroquimioluminiscencia. Cada punto representa un valor promedio de CRP from 3 cynomolgus monkeys ($\pm$ SE) dosed con vehículo o anticuerpo IgG₂ anti-IL-6 9C8 N68T T83S a 0,5 mg/kg y 5,0 mg/kg. Se midió CRP sérica por Meso Scale

Discovery (MSD). Se administró LPS en el punto temporal de 0 horas.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones y técnicas generales

[0013] El término “anticuerpo” es sinónimo de inmunoglobulina y se debe entender tal como se conoce comúnmente en la técnica. En particular, el término anticuerpo no está limitado por cualquier método particular para producir el anticuerpo. Por ejemplo, el término anticuerpo incluye, *inter alia*, anticuerpos recombinantes, anticuerpos monoclonales, y anticuerpos policlonales.

[0014] La unidad estructural básica del anticuerpo es un tetramero. Cada tetramero se compone de dos pares idénticos de cadenas de polipéptidos, en donde cada par tiene una cadena “liviana” (aproximadamente 25 kDa) y una cadena “pesada” (aproximadamente 50-70 kDa). La amino terminal porción de cada cadena incluye una región variable de aproximadamente 100 a 120 o más aminoácidos primariamente responsables del reconocimiento de antígenos. La porción carboxi terminal de cada cadena define una región constante primariamente responsable de la función efectora. Las cadenas livianas humanas se clasifican como cadenas livianas kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa o ypsilon, y definen el isotipo de anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, y IgE, respectivamente. Dentro de las cadenas livianas y pesadas, las regiones variables y constantes están unidas por una región “J” de aproximadamente 12 o más aminoácidos, en

donde la cadena pesada también incluye una región "D" de aproximadamente 3 o más aminoácidos.

[0015] Las regiones variables de cada par de cadenas pesadas/livianas (V_H y V_L), respectivamente, forman el sitio de fijación del antígeno. En consecuencia, un anticuerpo IgG intacto, por ejemplo, tiene dos sitios de fijación. Excepto en anticuerpos bifuncionales o biespecíficos, los dos sitios de fijación son iguales.

[0016] Las regiones variables de las cadenas pesadas y livianas exhiben la misma estructura general de regiones de marco relativamente conservado (FR) unidas por tres regiones hipervariables, también denominadas regiones determinantes complementarias o CDR. El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre los anticuerpos y se usan para la fijación y la especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente en todos los dominios variables de los anticuerpos, sino que se concentra en las CDR, las cuales están separadas por las FR más altamente conservadas. Las CDR de las dos cadenas de cada par están alineadas mediante las FR, lo cual permite la fijación a un epitopo específico. Desde el N-terminal al C-terminal, tanto las cadenas livianas como las pesadas comprenden los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. La asignación de aminoácidos a cada dominio es de acuerdo con las definiciones de las secuencias de proteínas de interés inmunológico de Kabat (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 y 1991)), o Chotia & Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chotia et al. *Nature* 342:878-883

(1989), cuyas descripciones se incorporan a la presente por referencia.

[0017] Tal como se usa en la presente, un anticuerpo al que se hace referencia por el número es igual a un anticuerpo monoclonal que se obtiene del hibridoma del mismo número. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-IL-6 9C8 es el mismo anticuerpo que uno obtenido del hibridoma 9C8, o uno de sus subclones.

[0018] El término "análogo" o "análogo de polipéptido" significa un polipéptido que comprende un segmento que tiene sustancial identidad con alguna secuencia de aminoácidos de referencia y que tiene sustancialmente la misma función o actividad que la secuencia de aminoácidos de referencia. Generalmente, los análogos de polipéptido comprenden una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos (o inserciones o deleciones) con respecto a la secuencia de referencia. Los análogos pueden tener al menos 20 o 25 aminoácidos de largo, o pueden tener al menos 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150 ó 200 aminoácidos de largo o más, y a menudo pueden tener el largo del polipéptido de longitud total. Algunas formas de realización incluyen análogos de polipéptidos con 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ó 17 sustituciones respecto de la secuencia de aminoácidos de referencia. En algunas instancias, la secuencia de aminoácidos de referencia es una secuencia de línea germinal. Las moléculas análogas de anticuerpos o inmunoglobulinas pueden ser preparadas fácilmente por los expertos en la técnica.

[0019] Tal como se analiza en la presente, las sustituciones de aminoácido en un anticuerpo IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno son las que generalmente: (1) reducen la susceptibilidad a la proteólisis, (2)

reducen la susceptibilidad a la oxidación, (3) alteran la afinidad de unión para formar complejos de proteínas, (4) eliminan o crean un sitio de glucosilación, o (4) confieren o modifican otras propiedades fisicoquímicas o funcionales de dichos análogos, pero mantienen la fijación específica a la IL-6.

[0020] Los análogos pueden incluir diversas sustituciones de la secuencia de péptido que aparece normalmente. Por ejemplo, se pueden hacer sustituciones únicas o múltiples de aminoácidos, con preferencia sustituciones conservadoras de aminoácidos, en la secuencia que aparece normalmente. Una sustitución conservativa de aminoácidos generalmente no cambia sustancialmente las características estructurales de la secuencia original.

[0021] El término "porciones fijadoras de antígeno " de un anticuerpo se refiere a un fragmento de un anticuerpo que retiene la capacidad para fijarse específicamente a un antígeno (por ejemplo, IL-6). Se ha demostrado que la función fijadora de antígeno de un anticuerpo puede ser llevada a cabo por fragmentos de un anticuerpo de longitud total. Los ejemplos de fragmentos de fijación abarcados en el término "porciones fijadoras de antígeno" de un anticuerpo incluyen: (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste de los dominios V_L , V_H , C_L y C_{H1} ; (ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab ligados a través de un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste de los dominios V_H y C_{H1} ; (iv) un fragmento Fv que consiste de los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo; (v) un anticuerpo de dominio, (dAb) (Ward et al., (1989) *Nature* 341:544-546), el cual consiste de un dominio V_H ; y (vi) una región determinante complementaria aislada (CDR).

Además, si bien los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H , son codificados por genes separados, se pueden unir mediante el uso de métodos recombinantes, a través de un ligador sintético que les permite armarse como una única cadena proteica en la cual las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (denominadas cadena única Fv (scFv)). Dichos anticuerpos de cadena única también pretender estar abarcados dentro del término "porciones fijadoras de antígeno" de un anticuerpo. Otras formas de anticuerpos de cadena única, tales como los diacuerpos también quedan incluidas en el término. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes biespecíficos en los cuales los dominios V_H y V_L se expresan en una única cadena de polipéptido, pero utilizan un ligador que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, por lo que fuerzan a los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena y crean dos sitios fijadores de antígeno. Además, una o más CDR provenientes de un anticuerpo pueden ser incorporados en una cadena de polipéptido más larga, la cual se puede ligar a otra en forma covalente o no covalente. En formas de realización que tienen uno o más sitios de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí, o pueden ser diferentes.

[0022] Más aún, un anticuerpo o sus porciones fijadoras de antígeno pueden ser parte de moléculas de inmunoadhesión más grandes, formadas por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o la porción de anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos. Los ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región nuclear de estreptavidina a fin de preparar una molécula tetramérica de scFv y usar un residuo

de cisteína, un péptido marcador y un rótulo C-terminal de polihistidina para formar moléculas bivalentes y biotiniladas de scFv. Otros ejemplos incluyen cuando una o más CDR provenientes de un anticuerpo se incorporan en una molécula en forma covalente o no covalente para transformarla en una inmunoadhesina que se fija específicamente a un antígeno de interés, tal como IL-6. En dichas formas de realización, la(s) CDR(s) se puede(n) incorporar como parte de una cadena de polipéptido más larga, se puede(n) ligar covalentemente a otra cadena de polipéptido, o se pueden incorporar en forma no covalente. Las porciones de anticuerpo tales como los fragmentos Fab y $F(ab')_2$, se pueden preparar a partir de anticuerpos enteros mediante el uso de cualquier técnica adecuada, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, a partir de anticuerpos enteros. Además, los anticuerpos, las porciones de anticuerpo y las moléculas de inmunoadhesión se pueden obtener mediante el uso de diversas técnicas de ADN recombinante.

[0023] La expresión "anticuerpo quimérico" significa cualquier anticuerpo que comprende regiones provenientes de dos o más anticuerpos diferentes, incluso anticuerpos provenientes de diferente especie. Por ejemplo, una o más de las CDR de un anticuerpo quimérico pueden derivar de un anticuerpo IL-6 humano. En un ejemplo, las CDR provenientes de un anticuerpo humano se pueden combinar con CDR provenientes de un anticuerpo no humano, tales como de ratón o de rata. En otro ejemplo, todas las CDR se pueden derivar de anticuerpos IL-6 humanos. En otro ejemplo, las CDR provenientes de más de un anticuerpo IL-6 humano se pueden combinar en un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede comprender una CDR1 proveniente

de la cadena liviana de un primer anticuerpo IL-6 humano, una CDR2 proveniente de la cadena liviana de un segundo anticuerpo IL-6 humano y una CDR3 proveniente de la cadena liviana de un tercer anticuerpo IL-6 humano, y una CDR proveniente de la cadena pesada que se pueden derivar de uno o más de otros anticuerpos IL-6. Además, las regiones marco se pueden derivar de uno de los anticuerpos IL-6, de los cuales se obtienen una o más de las CDR o de uno o más anticuerpos humanos diferentes. Más aún, el término "anticuerpo quimérico" pretende abarcar cualquiera de las combinaciones antes mencionadas, en las cuales las combinaciones incluyen anticuerpos humanos y no humanos.

[0024] El término "competir" significa que un primer anticuerpo, o sus porciones fijadoras de antígeno, compiten por la fijación con un segundo anticuerpo, o sus porciones fijadoras de antígeno, en donde la fijación del primer anticuerpo con su epítopo cognado disminuye en forma detectable en presencia del segundo anticuerpo, comparado con la fijación del primer anticuerpo en ausencia del segundo anticuerpo. La alternativa, en donde la fijación del segundo anticuerpo a su epítopo también disminuye en forma detectable en presencia del primer anticuerpo, puede ser el caso, pero no necesariamente. Es decir, un primer anticuerpo puede inhibir la fijación de un segundo anticuerpo a su epítopo sin que dicho segundo anticuerpo inhiba la fijación del primer anticuerpo a su respectivo epítopo. Sin embargo, cuando cada anticuerpo inhibe en forma detectable la fijación del otro anticuerpo a su epítopo o ligando cognado, sea en el mismo, mayor o menor grado, se dice que los anticuerpos presentan "competencia cruzada" entre sí por la fijación de su(s) respectivo(s) epítopo(s). Con independencia del mecanismo por el cual

tiene lugar dicha competencia o competencia cruzada (por ejemplo, impedimento estérico, cambio de conformación, o fijación a un epitopo común, o una de sus porciones), el experto en la técnica podrá apreciar, sobre la base de las enseñanzas provistas en la presente, que dichos anticuerpos en competencia y/o competencia cruzada pueden ser útiles para los métodos descritos en la presente.

[0025] El término "sustituciones conservadoras de aminoácidos" significa que un residuo de aminoácido es sustituido por otro residuo de aminoácido que tiene un grupo R en la cadena lateral con similares propiedades químicas (por ejemplo, carga o hidrofobicidad). En general, las sustituciones conservadoras de aminoácidos no cambian sustancialmente las propiedades funcionales de una proteína. En los casos en que dos o más secuencias de aminoácidos difieren entre sí por sustituciones conservadoras, se puede ajustar el porcentaje de identidad de secuencia hacia arriba, a fin de corregir la naturaleza conservadora de la sustitución. Los medios para realizar este ajuste son bien conocidos por los expertos en la técnica. Los ejemplos de grupos de aminoácidos que tienen cadenas laterales con propiedades químicas similares incluyen 1) cadenas laterales alifáticas: glicina, alanina, valina, leucina, e isoleucina; 2) cadenas laterales hidroxilo alifáticas: serina y treonina; 3) cadenas laterales que contienen amidas: asparagina y glutamina; 4) cadenas laterales aromáticas: fenilalanina, tirosina, y triptófano; 5) cadenas laterales básicas: lisina, arginina, e histidina; 6) cadenas laterales ácidas: ácido aspártico y ácido glutámico; y 7) cadenas laterales que contienen azufre: cisteína y metionina. Los grupos de sustitución conservadora de aminoácidos pueden ser, por ejemplo,

valina-leucina-isoleucina, fenilalanina-tirosina, lisina-arginina, alanina-valina, glutamato-aspartato, y asparagina-glutamina.

[0026] Un reemplazo conservador también es cualquier cambio que tenga un valor positivo de la matriz de probabilidad log PAM250 descrita en Gonnet et al., *Science* 256:1443-45 (1992), incorporada en la presente por referencia. Un reemplazo "moderadamente conservados" en cualquier cambio que tenga un valor no negativo de la matriz de probabilidad log PAM250.

[0027] "Poner en contacto" se refiere a reunir un anticuerpo o su porción fijadora de antígeno correspondiente y un IL-6 objetivo, o su epitopo, de manera tal que el anticuerpo pueda afectar la actividad biológica de la IL-6. Dicho "poner en contacto" se puede lograr *in vitro*, por ejemplo, en un tubo de ensayo, una placa de Petri, o similares. En un tubo de ensayo, el hecho de poner en contacto puede incluir sólo un anticuerpo o su porción fijadora de antígeno y la IL-6 o su epitopo, o puede incluir células enteras. Las células también se pueden mantener o cultivar en placas de cultivo de tejido y ponerse en contacto con anticuerpos o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes en dicho ambiente. En este contexto, se puede determinar la capacidad de un anticuerpo particular o su porción fijadora de antígeno correspondiente a fin de afectar un trastorno relacionado con IL-6, es decir la IC_{50} del anticuerpo, antes de usar el anticuerpo *in vivo* con organismos vivos más complejos. Para las células fuera del organismo existen múltiples métodos, y son bien conocidos por los expertos en la técnica, para poner en contacto la IL-6 con los anticuerpos o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes.

[0028] El término "ELISA" se refiere a un ensayo de inmunosorción ligado a enzima. Este tipo de ensayo es bien conocido por los expertos en la técnica.

[0029] El término "epitopo" incluye cualquier determinante de proteína capaz de fijarse específicamente a una inmunoglobulina o un receptor de células T, o de otro modo interactuar con una molécula. Los determinantes epitópicos generalmente consisten de agrupamientos de moléculas de superficie químicamente activas tales como cadenas laterales de aminoácidos o hidratos de carbono o azúcares y generalmente tienen características estructurales tridimensionales específicas, así como características de carga específicas. Un epitopo puede ser "lineal" o "de conformación". En un epitopo lineal, todos los puntos de interacción entre la proteína y la molécula interactuante (tal como un anticuerpo) aparecen linealmente a lo largo de la secuencia primaria de aminoácidos de la proteína. En un epitopo de conformación, los puntos de interacción aparecen a través de residuos de aminoácidos en la proteína que están separados entre sí. Una vez que se determina un epitopo deseado sobre un antígeno, se pueden generar anticuerpos contra dicho epitopo. Un enfoque para lograrlo consiste en conducir estudios de competencia cruzada a fin de encontrar anticuerpos que se fijan competitivamente entre sí, es decir, los anticuerpos compiten por la fijación con el antígeno. Un proceso de alto rendimiento para la "fijación" de anticuerpos sobre la base de su competencia cruzada se describe en la publicación internacional de patentes N.º WO 03/48731.

[0030] El término "secuencia de control de la expresión" tal como se usa en la presente significa las secuencias de polinucleótidos que son necesarias para

efectuar la expresión y el procesamiento de las secuencias codificadoras a las cuales están ligadas. Las secuencias de control de la expresión incluyen secuencias adecuadas de inicio de la transcripción, terminación, promotoras y mejoradoras; señales de procesamiento eficiente de ARN tales como señales de corte y empalme y de poliadenilación; secuencias que estabilizan el mRNA citoplasmático; secuencias que mejoran la eficiencia de la traducción (es decir, secuencia de consenso de Kozak); secuencias que mejoran la estabilidad de la proteína; y cuando se desea, secuencias que mejoran la secreción de proteínas. La naturaleza de dichas secuencias control difiere según el organismo huésped; en procariontes, dichas secuencias control generalmente incluyen secuencias promotoras, de sitio de fijación de ribosomas, y de terminación de la transcripción; en eucariontes, generalmente dichas secuencias control incluyen secuencias promotoras y de terminación de la transcripción. El término "secuencias control" se entiende con inclusión, como mínimo, de todos los componentes cuya presencia es esencial para la expresión y el procesamiento, y también pueden incluir componentes adicionales cuya presencia es ventajosa, por ejemplo, secuencias guía y secuencias de compañero de fusión.

[0031] El término "línea germinal" se refiere a las secuencias de nucleótidos de los genes de anticuerpo y los segmentos génicos como pasan de los progenitores a la progenie a través de las células germinales. Esta secuencia de línea germinal se distingue de las secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos en las células M maduras que han sido alteradas por eventos de recombinación

e hipermutación durante el curso de la maduración de las células B.

[0032] El término "anticuerpo humano" significa cualquier anticuerpo en el cual las secuencias de dominio variable y constante son secuencias humanas. El término abarca los anticuerpos con secuencias derivadas de genes humanos, incluso los que han sido modificados, por ejemplo, la disminuir la posible inmunogenicidad, incrementar la afinidad, eliminar los residuos de cisteína que podrían causar plegamientos no deseados, etc. El término también abarca los anticuerpos producidos en forma recombinante en célula no humanas, las cuales pueden impartir glucosilaciones no características de las células humanas. Estos anticuerpos se pueden preparar de diversas maneras.

[0033] El término "anticuerpo humanizado" se refiere a anticuerpos de origen no humano, en donde los residuos de aminoácidos que son característicos de las secuencias de anticuerpo de la especie no humana son reemplazados por residuos que se encuentran en las correspondientes posiciones de los anticuerpos humanos. Este proceso de "humanización" puede reducir la inmunogenicidad en humanos del anticuerpo obtenido. Los anticuerpos de origen no humano se pueden humanizar mediante el uso de cualquier técnica adecuada bien conocida en la técnica. El anticuerpo de interés se puede obtener por ingeniería mediante técnicas de ADN recombinante para sustituir CH1, CH2, CH3, los dominios bisagra, y/o el dominio de marco por la correspondiente secuencia humana. El término "anticuerpo humanizado" también incluye en su significado los anticuerpos humanos quiméricos y los anticuerpos con injerto de CDR. Los anticuerpos humanos quiméricos incluyen los dominios V_H y V_L de un anticuerpo de una especie no

humana y los dominios C_H y C_L de un anticuerpo humano. Los anticuerpos CDR trasplantados son el resultado del reemplazo de CDR proveniente de V_H y V_L de un anticuerpo humano por los de V_H y V_L , respectivamente, de un anticuerpo de un animal distinto de un humano.

[0034] El término "polinucleótido aislado" tal como se usa en la presente significa un polinucleótido de origen genómico, de cADN, o sintético o una de sus combinaciones, por las cuales en virtud de su origen el "polinucleótido aislado" (1) no se asocia con la totalidad o una porción de polinucleótidos con los cuales el "polinucleótido aislado" se encuentra en la naturaleza, (2) está ligado operativamente a un polinucleótido al cual no está ligado en la naturaleza, o (3) no aparece en la naturaleza como parte de una secuencia más grande.

[0035] El término "proteína aislada", "polipéptido aislado" o "anticuerpo aislado" se refiere a una proteína, un polipéptido o un anticuerpo que en virtud de su origen o fuente de derivación: (1) no está asociado con componentes naturalmente asociados que lo acompañan en su estado nativo; (2) está libre de otras proteínas provenientes de la misma especie; (3) es expresada por una célula proveniente de una especie diferente; o (4) no existe en la naturaleza. En consecuencia, un polipéptido que, por ejemplo, es sintetizado químicamente o sintetizado en un sistema celular diferente de la célula de la cual se origina naturalmente se "aisla" de sus componentes naturalmente asociados. Una proteína también se puede transformar en sustancialmente libre de componentes naturalmente asociados por aislamiento, mediante el uso de cualquier técnica adecuada de purificación de proteínas.

[0036] Los ejemplos de anticuerpos aislados incluyen un anticuerpo IL-6 que ha sido purificado por afinidad mediante el uso de IL-6, y un anticuerpo IL-6 que ha sido sintetizado por una línea celular *in vitro*.

[0037] El término " K_D " se refiere a la constante de equilibrio de afinidad de unión de una interacción particular de anticuerpo-antígeno. Se dice que un anticuerpo se fija específicamente a un antígeno cuando la K_D es ≤ 1 mM, con preferencia ≤ 100 nM, y con máxima preferencia ≤ 10 nM. Una constante de afinidad de unión K_D se puede medir por resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo mediante el uso del sistema BIACORE™ tal como se analiza en el EJEMPLO 7.

[0038] El término " k_{off} " se refiere a la constante de velocidad de disociación de una interacción particular de anticuerpo-antígeno. Una constante de velocidad de disociación k_{off} se puede medir por resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo mediante el uso del sistema BIACORE™ tal como se analiza en el EJEMPLO 7.

[0039] El término "nucleótidos naturales" tal como se usa en la presente incluye desoxirribonucleótidos y ribonucleótidos. El término "nucleótidos modificados" tal como se usa en la presente incluye, por ejemplo, nucleótidos con grupos azúcar modificados o sustituidos. El término "enlaces de oligonucleótidos" referido en la presente incluye enlaces de oligonucleótidos tales como, por ejemplo, fosforotioato, fosforoditioato, fosforoselenioato, fosforodiselenioato, fosforoanilotioato, fosforaniladato, fosforoamidato. Un oligonucleótido puede incluir un rótulo para su detección, si se desea.

[0040] Las secuencias "ligadas operativamente" incluyen las secuencias de control de la expresión que son

contiguas al gen de interés y las secuencias de control de la expresión que actúan en trans o a distancia para controlar el gen de interés.

[0041] La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" en el contexto de las secuencias de ácidos nucleicos significa los residuos en dos secuencias que son iguales cuando se alinean para un máximo de correspondencia. La longitud de la comparación de identidad de secuencia puede ser de al menos aproximadamente nueve nucleótidos, usualmente al menos aproximadamente 18 nucleótidos, más usualmente al menos aproximadamente 24 nucleótidos, en general al menos aproximadamente 28 nucleótidos, más en general al menos aproximadamente 32 nucleótidos, y al menos aproximadamente 36, 48 o más nucleótidos. Hay numerosos algoritmos diferentes conocidos en la técnica que se pueden usar para medir la identidad de la secuencia de nucleótidos. Por ejemplo, las secuencias de polinucleótidos se pueden comparar mediante el uso de FASTA, Gap o Bestfit, los cuales son programas en Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, incluye, por ejemplo, los programas FASTA2 y FASTA3, para proveer alineamientos y porcentaje de identidad de secuencia de las regiones de mayor superposición entre las secuencias incógnita y de búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258 (1996); Pearson, *J. Mol. Biol.* 276:71-84 (1998); incorporados en la presente por referencia). Generalmente se usan parámetros predeterminados para un programa o algoritmo particular. Por ejemplo, el porcentaje de identidad de secuencia entre las secuencias de ácidos nucleicos se puede determinar

mediante el uso de FASTA con sus parámetros predeterminados (un tamaño de palabra de 6 y el factor NOPAM para la matriz de calificación) o mediante el uso de Gap con parámetros predeterminados tal como se provee en GCG Versión 6.1, incorporado en la presente por referencia.

[0042] Una referencia a una secuencia de nucleótidos abarca su complemento a menos que se especifique otra cosa. En consecuencia, una referencia a un ácido nucleico que tiene una secuencia particular se debe entender que abarca su cadena complementaria, con su secuencia complementaria.

[0043] La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" en el contexto de secuencias de aminoácidos significa los residuos en las dos secuencias que son iguales cuando se alinean para el máximo de correspondencia. La longitud de la comparación de la identidad de secuencia puede ser de más de al menos aproximadamente cinco aminoácidos, usualmente al menos aproximadamente 20 aminoácidos, más usualmente al menos aproximadamente 30 aminoácidos, generalmente al menos aproximadamente 50 aminoácidos, más en general al menos aproximadamente 100 aminoácidos, y aún más en general aproximadamente 150, 200 o más aminoácidos. Hay numerosos algoritmos diferentes conocidos en la técnica que se pueden usar para medir la identidad de la secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, las secuencias de aminoácidos se pueden comparar mediante el uso de FASTA, Gap o Bestfit, los cuales son programas en Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin.

[0044] La identidad de secuencia para polipéptidos generalmente se mide mediante el uso de software de análisis de secuencias. El software de análisis de proteínas hace coincidir las secuencias mediante el uso de

medidas de similitud asignadas a diversas sustituciones, deleciones y otras modificaciones, incluso sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, GCG contiene programas tales como "Gap" y "Bestfit", los cuales se pueden usar con parámetros predeterminados tal como se especifica en los programas para determinar la homología de secuencia o la identidad de secuencia entre polipéptidos estrechamente relacionados, tales como polipéptidos homólogos provenientes de diferentes especies de organismos o entre una proteína de tipo salvaje y uno de sus análogos. Ver, por ejemplo, GCG Versión 6.1 (Universidad de Wisconsin, WI). Las secuencias de polipéptido también se pueden comparar mediante el uso de FASTA usando parámetros predeterminados o recomendados, ver GCG Versión 6.1. FASTA (por ejemplo, FASTA2 y FASTA3) que proveen alineamientos y porcentajes de identidad de secuencia de las regiones de mejor superposición entre las secuencias incógnita y de búsqueda (Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000)). Otro algoritmo para comparar una secuencia con una base de datos que contiene una gran cantidad de secuencias provenientes de diferentes organismos es el programa de computadora BLAST, especialmente blastp o tblastn, mediante el uso de parámetros predeterminados tales como los provistos con los programas. Ver, por ejemplo, Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-410 (1990); Altschul et al., *Nucleic Acid Res.* 25:3389-402 (1997).

[0045] La expresión "célula huésped recombinante" (o simplemente "célula huésped"), tal como se usa en la presente, significa una célula en la cual se ha introducido un vector de expresión recombinante. Se debe entender que "célula huésped recombinante" y "célula huésped" significan

no sólo la célula sujeto particular, sino también la progenie de dicha célula. Dado que se pueden producir ciertas modificaciones en posteriores generaciones debidas a la mutación o a influencias del ambiente, de hecho dicha progenie puede no ser idéntica a la célula progenitora, pero aún así se incluye en el alcance del término "célula huésped" tal como se usa en la presente.

[0046] Una proteína o un polipéptido es "sustancialmente puro", "sustancialmente homogéneo" o "sustancialmente purificado" cuando al menos aproximadamente 60 a 75% de una muestra exhibe una única especie de polipéptido. El polipéptido o la proteína pueden ser monomérico o multimérico. Un polipéptido o una proteína sustancialmente puro generalmente puede comprender aproximadamente 50%, 60%, 70%, 80% o 90% p/p de una muestra de proteína, más usualmente de aproximadamente 95%, y con preferencia puede ser de más de 99% puro. La pureza o la homogeneidad de la proteína puede estar indicada por cualquier medio adecuado, tal como electroforesis en gel de poliacrilamida de una muestra de proteína, seguido de la visualización de una única banda de polipéptido luego de la tinción del con una tintura. Como apreciará un experto en la técnica, se puede proveer mayor resolución mediante el uso de HPLC u otros medios de purificación.

[0047] La expresión "sustancial similitud" o "sustancial similitud de secuencia" en referencia a un ácido nucleico o su fragmento correspondiente, significa que cuando se alinean óptimamente con inserciones o deleciones de nucleótido adecuadas con otro ácido nucleico (o su cadena complementaria), hay una identidad de secuencia de nucleótidos en al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, y al menos aproximadamente

95%, 96%, 97%, 98% o 99% de las bases de nucleótidos, tal como se mide mediante cualquier algoritmo de identidad de secuencia bien conocido, tales como FASTA, BLAST o Gap, como se analizó con anterioridad.

[0048] Tal como se aplica a polipéptidos, La expresión "sustancial identidad" o "sustancial similitud" significa que dos secuencias de aminoácidos, cuando se alinean óptimamente, tales como mediante los programas GAP o BESTFIT mediante el uso de pesos de brechas predeterminados tal como se provee en los programas, comparten al menos 70%, 75% o 80% de identidad de secuencia, con preferencia al menos 90% o 95% de identidad de secuencia, y con mayor preferencia al menos 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia. En ciertas formas de realización, las posiciones de los residuos que no son idénticos difieren por sustituciones conservadoras de aminoácidos.

[0049] La expresión "resonancia de plasmón de superficie" se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de las interacciones bioespecíficas de tiempo real por detección de alteraciones de las concentraciones de proteínas dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo mediante el uso del sistema BIACORE™ (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N. J.). Para ulteriores descripciones, ver Johnsson U. et al., *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26 (1993); Johnsson U. et al., *Biotechniques* 11:620-627 (1991); Johnsson B. et al., *J. Mol. Recognit.* 8:125-131 (1995); y Johnsson B. et al., *Anal. Biochem.* 198:268-277 (1991).

[0050] Una "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de un agente terapéutico que se administra y que alivia en cierto grado uno o más de los síntomas del trastorno tratado. En referencia al

tratamiento de artritis reumatoidea, una cantidad terapéuticamente efectiva se refiere a la cantidad que tiene al menos uno de los siguientes efectos: reducir el daño estructural de las articulaciones; inhibir (es decir, frenar en cierto grado, con preferencia detener) la acumulación de fluido en la zona de la articulación; y aliviar en cierto grado (o, con preferencia, eliminar) uno o más síntomas asociados con artritis reumatoidea.

[0051] "Tratar", "tratado" y "tratamiento" se refieren a un método para aliviar o reducir un trastorno biológico y/o sus síntomas accesorios.

[0052] El término "utiliza" con referencia a un gen particular significa que la secuencia de aminoácidos de una región particular en un anticuerpo se derivó en última instancia de dicho gen durante la maduración de las células B. Por ejemplo, la frase "una secuencia de aminoácidos de una región variable de una cadena pesada que utiliza un gen de la familia de V_H-3 humana" se refiere a la situación en la cual la región V_H del anticuerpo fue derivada de la familia VH-3 de segmentos génicos durante la maduración de las células B. En las células B humanas hay más de 30 genes funcionales diferenciados de cadena pesada variable con los cuales generar anticuerpos. El uso de un gen particular de cadena pesada variable, en consecuencia, indica un motivo de unión de la interacción anticuerpo-antígeno con respecto a las propiedades combinadas de la fijación del antígeno y la actividad funcional. Tal como se apreciará, el análisis de utilización de genes provee sólo una visión general limitada de la estructura de los anticuerpos. A medida que las células B humanas generan en forma estocástica transcripciones de cadenas pesadas V-D-J o cadenas livianas V-J kappa, hay una cantidad de procesos secundarios que

ocurren, incluso sin limitación, hipermutación somática, adiciones, y extensiones de CDR3. Ver, por ejemplo, Mendez et al. *Nature Genetics* 15:146-156 (1997).

[0053] El término "vector", tal como se usa en la presente, significa una molécula de ácido nucleico capaz de transportar otro ácido nucleico al cual se ha unido. En algunos casos, el vector es un plásmido, es decir una porción de ADN circular bicatenario a la cual se pueden ligar segmentos adicionales de ADN. Por ejemplo, el vector es un vector viral, en donde se pueden ligar segmentos adicionales de ADN al genoma viral. En otro caso, los vectores son capaces de replicación autónoma en una célula huésped a la cual se introducen (por ejemplo, vectores bacterianos que tienen un origen de replicación bacteriano y vectores episomales de mamífero). En otro ejemplo, los vectores (por ejemplo, vectores no episomales de mamífero) se pueden integrar en el genoma de una célula huésped luego de la introducción en la célula huésped, y así se replica junto con el genoma del huésped. Más aún, ciertos vectores son capaces de dirigir la expresión de genes a los cuales están ligados operativamente. Dichos vectores se refieren en la presente como "vectores de expresión recombinantes" (o simplemente, "vectores de expresión").

[0054] Los términos "rótulo" o "rotulado" se refieren a la incorporación de otra molécula en el anticuerpo. Por ejemplo, el rótulo es una marca detectable, por ejemplo, la incorporación de un aminoácido con rótulo radiactivo o la adhesión a un polipéptido de restos biotinilo que pueden ser detectados mediante avidina marcada (por ejemplo, estreptavidina que contiene un marcador fluorescente o una actividad enzimática que puede ser detectada mediante métodos ópticos o colorimétricos). En otra forma de

realización, el rótulo o marcador puede ser terapéutico, por ejemplo, un conjugado de fármaco o toxina. En la técnica se conocen y se pueden usar diversos métodos de rotulado de polipéptidos y glucoproteínas. Los ejemplos de rótulos para polipéptidos incluyen, sin limitaciones, los siguientes: radioisótopos o radionucleidos (por ejemplo, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), rótulos fluorescentes (por ejemplo, FITC, rodamina, fósforos lantánidos), rótulos enzimáticos (por ejemplo, peroxidasa de rábano, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina), marcadores quimioluminiscentes, grupos biotinilo, epitopos predeterminados de polipéptidos reconocidos por informadores secundarios (por ejemplo, secuencias de par de cierres de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios fijadores de metal, rótulos de epitopo), agentes magnéticos tales como quelatos de gadolinio, toxinas tales como toxina pertussis, taxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxiantracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y sus análogos u homólogos. En algunos casos, los rótulos están adosados mediante brazos espaciadores de diversas longitudes a fin de reducir posibles impedimentos estéricos.

Métodos de uso terapéutico

[0055] También se proveen métodos para inhibir la actividad de IL-6 a través de la administración de un anticuerpo IL-6 a un paciente que lo necesite. Cualquiera

de los anticuerpos o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes descritas en la presente se puede usar terapéuticamente. En una forma de realización preferida, el anticuerpo IL-6 es un anticuerpo humano, quimérico o humanizado. En otra forma preferida de realización, la IL-6 es humana y el paciente es un paciente humano. Alternativamente, el paciente puede ser un mamífero que exprese una IL-6 con al cual el anticuerpo IL-6 tiene reacciones cruzadas. El anticuerpo se puede administrar a un mamífero no humano que expresa los propósitos de la IL-6 o como un modelo animal de enfermedad humana. Dichos modelos animales se pueden usar para demostrar la eficacia terapéutica de los anticuerpos.

[0056] Un anticuerpo IL-6 o su porción de anticuerpo se puede administrar a un paciente que exprese niveles anormalmente elevados de IL-6. El anticuerpo se puede administrar una vez, o se puede administrar múltiples veces. El anticuerpo se puede administrar desde tres veces al día hasta una vez cada seis meses o más. La administración puede ser según un esquema tal como tres veces diarias, dos veces diarias, una vez diaria, una vez cada dos días, una vez cada tres días, una vez por semana, una vez cada dos semanas, una vez por mes, una vez cada dos meses, una vez cada tres meses y una vez cada seis meses. El anticuerpo también se puede administrar continuamente a través de una minibomba. El anticuerpo se puede administrar por una vía mucosa, bucal, intranasal, inhalable, intravenosa, subcutánea, intramuscular, parenteral, o intratumoral. El anticuerpo se puede administrar una vez, al menos dos veces o al menos durante el periodo hasta que la condición sea tratada, paliada o curada. El anticuerpo generalmente se administra durante todo el periodo en que

esté presente la condición. El anticuerpo generalmente se administra como parte de una composición farmacéutica tal como se describe en la presente. La dosificación del anticuerpo generalmente estará en el rango desde 0,1 hasta 100 mg/kg, 0,5 hasta 50 mg/kg, 1 hasta 20 mg/kg, y 1 hasta 10 mg/kg. La concentración sérica del anticuerpo se puede medir por cualquier método adecuado.

[0057] También se proveen métodos para el tratamiento de infiltración celular anormal en un mamífero, incluso un humano, que comprende administrar al mamífero una cantidad terapéuticamente efectiva de un anticuerpo IL-6 o su porción fijadora de antígeno correspondiente, tal como se describe en la presente, que sea efectiva para el tratamiento de la infiltración celular anormal.

[0058] Los anticuerpos IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes se pueden usar para tratar artritis reumatoidea. También se pueden usar para tratar otras enfermedades en las cuales está implicada la IL-6. Los ejemplos de otras enfermedades que se pueden tratar mediante el uso de los anticuerpos IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes incluyen osteoartritis, particularmente el dolor asociado con osteoartritis, enfermedad de Castleman, artritis juvenil idiopática, enfermedad de Still de inicio en el adulto, osteoporosis, sepsis, mieloma múltiple, carcinoma de células renales, y enfermedad de Crohn.

[0059] Algunas de las enfermedades que se pueden tratar con los anticuerpos o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes se analizan a continuación.

[0060] Artritis reumatoidea (RA) se considera una enfermedad autoinmune e inflamatoria crónica que produce articulaciones inflamadas, las cuales por último aumentan

de tamaño, se tornan dolorosas, y experimentan degradación del cartílago, el hueso, y los ligamentos de la articulación. Una consecuencia de RA es la deformidad, la inestabilidad, y la rigidez de la articulación y la cicatrización dentro de la articulación. Las articulaciones se deterioran a una velocidad muy variable. Muchos factores, incluso la predisposición genética, pueden influir sobre el patrón de la enfermedad. Las personas con artritis reumatoidea pueden tener un curso leve, ocasionales brotes con largos periodos de remisiones sin enfermedad, o una enfermedad con progresión constante, que puede ser lenta o rápida. La artritis reumatoidea puede ser de inicio repentino, en donde muchas articulaciones presentan inflamación al mismo tiempo. Con mayor frecuencia, es de inicio insidioso, que gradualmente afecta diferentes articulaciones. Usualmente, la inflamación es simétrica, con afección de las articulaciones de ambos lados del cuerpo. Generalmente, se inflaman primero las pequeñas articulaciones de los dedos de las manos y de los pies, las manos, los pies, las muñecas, los codos, y los tobillos, seguidas de las rodillas y las caderas.

[0061] El dolor de la artritis reumatoidea generalmente es un dolor articular nociceptivo somático. Las muñecas tumefactas pueden pinzar un nervio y causar insensibilidad o parestesias debido al síndrome del túnel carpiano. Se pueden desarrollar quistes detrás de las rodillas afectadas, los cuales se pueden romper y causar dolor y tumefacción de las extremidades inferiores distales.

[0062] La osteoartritis se caracteriza por la pérdida del cartílago articular e hipertrofia del hueso. El inicio de la osteoartritis usualmente es gradual, con dolor como

síntoma temprano común. A medida que progresa la osteoartritis disminuye el movimiento de la articulación, y se puede producir sensibilidad y sensaciones ásperas. La osteoartritis comúnmente afecta las manos, los pies, la columna vertebral, y las articulaciones que soportan grandes pesos, tales como las caderas y las rodillas. El diagnóstico de osteoartritis generalmente se basa sobre los síntomas o por rayos X, los cuales pueden mostrar el estrechamiento del espacio articular, el aumento de la densidad del hueso subcondral, la formación de osteofitos en la periferia de las articulaciones, y la formación de pseudoquistes en la columna subcondral. Se realizan pruebas en sangre para excluir otras condiciones que pueden simular la osteoartritis. Además, para el diagnóstico de osteoartritis se puede efectuar artrocentesis, por lo cual se usa una aguja estéril para extraer líquido articular. El análisis del líquido articular es útil para excluir gota, infección, y otras causas de artritis. La osteoartritis también se denomina enfermedad degenerativa articular, artritis degenerativa, u osteoartritis.

[0063] El síndrome de Reiter (artritis reactiva) es una inflamación de las articulaciones y las inserciones de los tendones en las articulaciones, a menudo acompañada de inflamación de la conjuntiva ocular y de las membranas mucosas, tales como las de la boca y el tracto genitourinario, y por una erupción diferenciada. El síndrome de Reiter también se denomina artritis reactiva porque la inflamación articular parece ser una reacción contra una infección que se origina en el intestino o el tracto genital. Este síndrome es más común en varones de 20 a 40 años de edad. Hay dos formas de síndrome de Reiter: una ocurre con enfermedades de transmisión sexual tales

como a infección por clamidias y la otra usualmente sigue a una infección intestinal tal como shigellosis o salmonellosis. (La mayoría de las personas que tienen estas infecciones no desarrollan síndrome de Reiter.) Las personas que desarrollan síndrome de Reiter después de la exposición a estas infecciones parecen tener una predisposición genética a este tipo de reacción, relacionada en parte con el mismo gen que se encuentra en personas con espondilitis anquilosante.

[0064] La artritis infecciosa es una inflamación de una articulación que es el resultado de una infección bacteriana, fúngica, o viral de los tejidos sinoviales o periarticulares. Los factores de riesgo de artritis infecciosa incluyen la edad avanzada (es decir, mayores de 60 años); alcoholismo; anemia; artrocentesis o cirugía; enfermedad médica crónica (por ejemplo, enfermedad pulmonar o hepática); diabetes; hemofilia; inmunodeficiencia, incluso HIV; terapia inmunosupresora, incluso corticosteroides; uso de drogas IV; enfermedades malignas; implante de prótesis articulares; insuficiencia renal; artritis reumatoidea; enfermedad de células falciformes; infecciones cutáneas; y lupus eritematoso sistémico. Los pacientes con artritis reumatoidea están en situación de riesgo particularmente incrementado de artritis bacteriana. Las infecciones articulares pueden ser agudas, con inicio repentino de dolor y tumefacción articular (por ejemplo, dentro de pocas horas a pocos días), o crónica, con desarrollo insidioso de síntomas más leves. La artritis bacteriana aguda generalmente viene acompañada de dolor articular moderado a severo, calor, sensibilidad y movilidad restringida. La artritis bacteriana crónica generalmente es acompañada de tumefacción gradual, calor

leve, enrojecimiento mínimo o nulo de la zona articular, y dolor localizado, que puede ser leve.

[0065] La artritis psoriásica es una artritis inflamatorio que afecta las articulaciones y aparece en una minoría de los pacientes con psoriasis y en forma creciente en algunos pacientes con síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). La artritis psoriásica puede ser leve o puede producir severas deformaciones articulares que se asemejan a los cambios articulares observados en la artritis reumatoidea. Las articulaciones que pueden estar afectadas por la artritis psoriásica incluyen las articulaciones interfalángicas distales (DIP) de los dedos de las manos y de los pies, y comúnmente el compromiso asimétrico de las articulaciones grandes y pequeñas tales como el sacroilíaco y la columna vertebral. La psoriasis de la piel o las uñas puede preceder o seguir al compromiso articular. El curso temporal de la artritis psoriásica se caracteriza por las exacerbaciones y remisiones artríticas que pueden o no coincidir con exacerbaciones y remisiones cutáneas, y puede haber progresión a artritis crónica. El diagnóstico incluye un diagnóstico de psoriasis, antecedentes familiares de psoriasis, hallazgos radiológicos que muestren compromiso de las articulaciones DIP, compromiso de las articulaciones grandes asimétricas, una prueba sanguínea negativa de factor reumatoide para descartar artritis reumatoidea, y en algunos pacientes, la presencia de antígeno HLA-B27, especialmente cuando hay compromiso de la columna vertebral.

[0066] La poliartritis es cualquier tipo de artritis que incluya cinco o más articulaciones. La artritis de dos, tres o cuatro articulaciones se denomina oligoartritis o pauciartritis. La poliartritis es causada con mayor

frecuencia por un trastorno autoinmune tal como artritis reumatoidea, artritis psoriásica, o lupus eritematoso, pero también puede ser causada por infecciones. La poliartritis puede ser experimentada a cualquier edad y no es específica de sexo.

[0067] La artritis juvenil es una artritis que comienza antes de los 16 años de edad. Hay varios tipos diferentes de artritis juvenil. El tipo más común es la artritis reumatoidea juvenil (JRA), también denominada artritis juvenil idiopática. JRA incluye JRA de inicio sistémico, JRA pauciarticular, que incluye menos de cinco articulaciones, y JRA poliarticular, que afecta a cinco o más articulaciones. El diagnóstico de JRA implica considerar los síntomas, tomar radiografías y realizar análisis de sangre. Las pruebas específicas que un médico puede usar para el diagnóstico de JRA incluyen recuento sanguíneo completo, cultivos sanguíneos para infecciones, exámenes de médula ósea, examen de la velocidad de eritrosedimentación, determinación de anticuerpo de factor reumatoideo, determinación de anticuerpo antinuclear, y barridos óseos.

[0068] La artritis reumatoidea juvenil es una inflamación persistente o recurrente de las articulaciones similar a la artritis reumatoidea, pero que comienza antes de los 16 años de edad y se caracteriza por inflamación de las articulaciones o el tejido conectivo. Hay varios tipos de artritis reumatoidea juvenil, los cuales se determinan por los síntomas que desarrollan durante el primer mes de la enfermedad y de la cantidad de articulaciones que están afectadas. Estos tipos incluyen artritis reumatoidea pauciarticular juvenil, poliartritis, y enfermedad sistémica (enfermedad de Still). En la artritis reumatoidea

pauciarticular juvenil, están afectadas cuatro o menos articulaciones, usualmente las de la pierna. En la poliartritis, están afectadas cinco o más (a veces hasta 20 a 40) articulaciones. En la enfermedad sistémica (enfermedad de Still), pueden estar afectadas cualquier cantidad de articulaciones.

[0069] La artritis reactiva juvenil es una inflamación persistente o recurrente de las articulaciones similar a la artritis reactiva pero que comienza antes de los 16 años de edad.

[0070] La artritis psoriásica juvenil artritis psoriásica que comienza antes de los 16 años de edad en un paciente y se caracteriza por la presencia de artritis crónica y psoriasis; o artritis crónica y al menos dos de los siguientes: dactilitia, anomalías de las uñas (por ejemplo, formación de fositas u onicolisis), y antecedentes familiares de psoriasis en al menos un familia inmediato. Al igual que en los adultos con artritispsoriásica, la artritis puede preceder la condición cutánea. El patrón predominante en el inicio de la artritis psoriásica juvenil es una oligoartritis asimétrica de las pequeñas y grandes articulaciones, a menudo con dactilitia.

[0071] En un aspecto, el trastorno mediado por IL-6 se caracteriza por fibrosis. El término "fibrosis" tal como se usa en la presente se refiere a una condición patológica caracterizada por el depósito excesivo y el metabolismo de material fibrótico (por ejemplo, matriz extracelular) en respuesta a daño del tejido. En muchos casos, la fibrosis representa un proceso de reparación normal (es decir la curación de heridas) desbocada debida a un ataque crónico o excesivo del tejido que conduce a la acumulación de fibroblastos o la activación y la proliferación de las

células estrelladas, y la acumulación de colágeno. Las condiciones de fibrosis incluyen trastornos fibroproliferativos asociados con enfermedades vasculares, tales como enfermedad cardíaca, enfermedad cerebral, y enfermedad vascular periférica, así como de todos los tejidos principales y sistemas orgánicos tales como el ojo, la piel, el riñón, el pulmón, el intestino y el hígado (Wynn, *Nature Reviews* 4:583-594 (2004); Bataller, R y Brenner, D., *J. Clin. Invest.* 115:209-218 (2005)). Otras fuentes son los fármacos quimioterápicos, la fibrosis inducida por radiación, y las lesiones y quemaduras. Aunque las condiciones de fibrosis cubren un amplio grupo de patologías, se cree que para la mayoría de estas condiciones, los mecanismos generales conducentes a la acumulación de tejido fibrótico pueden tener muchos elementos en común. A menudo, la condición se inicia en respuesta a un influjo de células inflamatorias y se perpetúa por las posteriores vías de señales de citoquina entre las células infiltradas (por ejemplo, macrófagos, células T) y las células residentes dentro del tejido (por ejemplo, estrelladas, miofibroblastos, células de Kupffer). Además, los pericitos con un tipo celular fibrogénico clave que interviene en el desarrollo de esclerodermia y se ha demostrado que los inhibidores de receptor de tirosina quinasa PDGF (RTKI) frenan la proliferación de pericitos y suprimen las lesiones cutáneas en pacientes con esta enfermedad progresiva. En el riñón, la infiltración leucocitaria juega un papel importante en la mediación de la inflamación tubulointersticial y la fibrosis en la enfermedad renal crónica.

[0072] Tal como se usa en la presente, el término "fibrosis" también se usa como sinónimo de "acumulación de

fibroblastos y depósito de colágeno". Los fibroblastos son células de tejido conectivo que están dispersas en el tejido conectivo de todo el organismo. Los fibroblastos secretan una matriz extracelular no rígida que contiene colágeno de tipo I y/o de tipo III. En respuesta a una lesión de un tejido, los fibroblastos cercanos o las células estrelladas migran hacia la herida, proliferan, y producen grandes cantidades de matriz extracelular colagenoso. El colágeno es una proteína fibrosa rica en glicina y prolina que es uno de los principales componentes de la matriz extracelular y el tejido conectivo, el cartílago y el hueso. Las moléculas de colágeno son estructuras helicoidales tricatenarias denominadas cadenas α , las cuales se arrollan una alrededor de la otra en una hélice en forma de soga. El colágeno existe de diversas formas o tipos; de ellos, el tipo I es el más común y se encuentra en la piel, los tendones y el hueso; y el tipo III se encuentra en la piel, los vasos sanguíneos, y los órganos internos. Los ejemplos de condiciones de fibrosis incluyen sin limitaciones

- (I) enfermedades pulmonares asociadas con fibrosis, por ejemplo, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis inducida por radiación, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), esclerodermia, fibrosis pulmonar inducida por bleomicina, asma crónico, silicosis, fibrosis pulmonar inducida por asbesto, lesión pulmonar aguda y distrés respiratorio agudo (incluso inducida por neumonía bacteriana, inducida por traumatismo, inducida por neumonía viral, inducida por ventilador, inducida por sepsis no pulmonar, e inducida por aspiración) ;

- (II) Neuropatías crónicas asociadas con lesión /fibrosis (fibrosis renal), por ejemplo, lupus, diabetes, esclerodermia, glomerulonefritis, esclerosis glomerular focal segmentaria, nefropatía por IgA, hipertensión, aloinjertos, lupus, y síndrome de Alport;
- (III) Fibrosis intestinal, por ejemplo, esclerodermia, y fibrosis intestinal inducida por radiación;
- (IV) Fibrosis hepática, por ejemplo, cirrosis, fibrosis hepática inducida por alcohol, esteatohepatitis no alcohólica (NASH), lesión de los conductos biliares, cirrosis biliar primaria, fibrosis hepática inducida por infección o viral (por ejemplo, infección crónica por HCV), y hepatitis autoinmune;
- (V) Fibrosis de cabeza y cuello, por ejemplo, inducida por radiación;
- (VI) Cicatrización de la córnea, por ejemplo, LASIX™, trasplante de córnea, y trabeculectomía;
- (VII) Cicatrización hipertrófica y queloide, por ejemplo, inducida por quemaduras y quirúrgica; y otras enfermedades fibróticas, por ejemplo, sarcoidosis, esclerodermia, lesión/fibrosis de la columna vertebral, mielofibrosis, reestenosis vascular, aterosclerosis, granulomatosis de Wegener, enfermedad mixta del tejido conectivo, y enfermedad de Peyronie.

[0073] El término "fibromialgia" también se denomina síndrome de fibromialgia. El criterio de clasificación del American College de Rheumatology (ACR) de 1990 para fibromialgia incluye antecedentes de dolor crónico

ampliamente diseminado durante más de tres meses, y la presencia de dolor en 11 (o más) de 18 puntos sensibles al examen físico, en donde los puntos sensibles se encuentran por encima y por debajo de la cintura y a ambos lados del cuerpo (ver por ejemplo, Wolfe et al., *Arthritis Rheum.*, 1990; 33:160-172). Los pacientes con fibromialgia generalmente presentan anomalías de la percepción del dolor en la forma de alodinia (dolor en respuesta a un estímulo normalmente no doloroso) e hiperalgesia (aumento de la sensibilidad ante un estímulo doloroso). Los efectos en un paciente humano se pueden evaluar mediante el uso de los criterios de la ACR, una calificación total de un cuestionario de índice de fibromialgias (FIQ), índices de severidad del dolor (por ejemplo, escalas de dolor VAS o de Likert) e interferencia, la cantidad de puntos dolorosos, o una evaluación del umbral del dolor.

[0074] Aunque el dolor crónico ampliamente diseminado es un síntoma de referencia de la fibromialgia, los pacientes generalmente también exhiben otros síntomas, incluso uno o más de los siguientes: fatiga, alteraciones del sueño, migraña o cefaleas por tensión, síndrome de intestino irritable, cambios de la frecuencia urinaria, rigidez matutina, insensibilidad y parestesias, dismenorrea, múltiples sensibilidades a compuestos químicos, dificultad de concentración, y problemas circulatorios que afectan los pequeños vasos sanguíneos de la piel (fenómeno de Raynaud). Al igual que con muchas condiciones que causan dolor crónico, los pacientes con fibromialgia también pueden experimentar ansiedad, depresión o ambos inducidos por fibromialgia. En algunos pacientes con fibromialgia, el clima frío, húmedo, estrés

emocional, exceso de ejercicio, y otros factores que exacerban sus síntomas.

[0075] El dolor asociado con fibromialgia se refiere a cualquier dolor asociado con síndrome de fibromialgia, incluso el dolor crónico ampliamente diseminado que es una referencia de fibromialgia y dolor asociado con otros síntomas de fibromialgia.

[0076] La espondilitis anquilosantes es una enfermedad reumática que causa artritis de las articulaciones vertebrales y sacroilíacas. Varía de episodios intermitentes de dolor lumbar que aparece toda la vida a enfermedad crónica severa que afecta la columna vertebral, las articulaciones periféricas y otros órganos del cuerpo. Generalmente, los primeros síntomas son dolor frecuente y rigidez lumbar inferior y de las nalgas, que avanza gradualmente durante el curso de pocas semanas o meses. El dolor usualmente es sordo y difuso, en lugar de localizado. La espondilitis anquilosante generalmente se diagnostica mediante un exhaustivo examen físico que incluye rayos X, antecedentes médicos individuales, y antecedentes familiares de espondilitis anquilosante, así como determinaciones sanguíneas que incluyen una prueba de HLA-B27.

[0077] La psoriasis es un trastorno inflamatorio crónico de la piel que puede afligir a las personas de todas las edades. Clínicamente, la psoriasis afecta con mayor frecuencia la piel de los codos, rodillas, cuero cabelludo, zonas lumbosacras, hendidura interglútea, o glánde del pene. La piel afectada por la psoriasis generalmente contiene una o más lesiones secas que comprenden una placa bien demarcada, de color rosa a salmón cubierta por escamas de adhesión laxa que se caracterizan

por tener color blanco plateado. En aproximadamente 30% de los pacientes con psoriasis, las uñas también están afectadas, por ejemplo, por formación de fositas u onicolisis. Todas las formas de psoriasis están contempladas, incluso psoriasis anular y psoriasis anulada, la cual también se denomina psoriasis circinada; psoriasis artrópica; psoriasis difusa o psoriasis difundida; psoriasis exfoliativa; psoriasis flexural; psoriasis geográfica; psoriasis girada; psoriasis numular; psoriasis palmar; psoriasis punctata; y una forma variante poco frecuente denominada psoriasis pustular generalizada de Zambusch o simplemente psoriasis pustular. Morfológicamente, las lesiones establecidas de psoriasis tienen características histológicas bien conocidas tales como engrosamiento de la epidermis y escamas paraqueratóticas. Patológicamente, en la actualidad se piensa que la psoriasis es un trastorno autoinmune mediado por células T. El inicio de la psoriasis usualmente es gradual y el curso temporal característico es de remisiones y recurrencias crónicas y, ocasionalmente, exacerbaciones agudas. El diagnóstico de psoriasis se logra por evaluación de los signos y síntomas clínicos del paciente y los antecedentes familiares de psoriasis. El diagnóstico de psoriasis por la inspección visual de las lesiones cutáneas de la piel del paciente rara vez presenta dificultad y usualmente es todo lo que se requiere para un diagnóstico completo. Sin embargo, en ocasiones se realiza el análisis histológico de una biopsia de piel para buscar signos de psoriasis.

[0078] El lupus eritematoso sistémico ("SLE"), también denominado lupus eritematoso diseminado, es un trastorno inflamatorio crónico del tejido conectivo de causa

desconocida que puede afectar las articulaciones, los riñones, las superficies serosas, y las paredes de los vasos, y que aparece predominantemente en mujeres jóvenes, pero también en niños. El 90% de los casos de SLE ocurre en mujeres. SLE puede comenzar abruptamente con fiebre que simula una infección aguda, o se puede desarrollar en forma insidiosa durante meses o años con episodios de fiebre y malestar. Los hallazgos iniciales pueden ser cefaleas vasculares, epilepsia o psicosis. Pueden aparecer manifestaciones que se pueden referir a cualquier sistema orgánico. Los síntomas articulares, que varían desde artralgias intermitentes hasta poliartritis aguda, se observan en aproximadamente el 90% de los pacientes y pueden existir durante años antes de que aparezcan otras. En la enfermedad prolongada, se pueden producir erosiones de inserción capsular en las articulaciones metacarpofalángicas con marcada deformidad de la articulación secundaria, sin evidencias radiológicas de erosiones marginales obvias (artritis de Jaccoud). Sin embargo, la mayoría de las poliartritis lúpicas son no destructivas y no deformantes.

[0079] El lupus eritematoso sistémico es infrecuente a edad inferior a 5 años y la mayoría de los niños con SLE desarrollan la enfermedad durante la adolescencia. Los signos y síntomas de SLE juvenil son similares a los de adultos. Sin embargo, los niños tienen un nivel de transición particularmente elevado desde la enfermedad discoide a la sistémica.

[0080] La gota (también denominada artritis gotosa) es una artritis recurrente aguda o crónica de las articulaciones periféricas que resulta de la acumulación en el organismo de demasiado ácido úrico, el cual forma

cristales que se depositan en las articulaciones y causan inflamación. Durante un ataque agudo de gota hay tumefacción, inflamación, y dolor extremo en una articulación, con frecuencia la del dedo gordo del pie. La gota crónica se puede establecer después de varios años de ataques, con daño permanente y deformación de las articulaciones y destrucción de las células de los riñones. En la mayoría de los casos ocurre en varones y el primer ataque rara vez ocurre antes de los 30 años de edad.

[0081] El término espondiloartropatía indiferenciada (USpA) se usa para describir los síntomas y signos de espondilitis en las personas que no cumplen los criterios para un diagnóstico definitivo de espondilitis anquilosante o una enfermedad relacionada. En la familia de las espondiloartropatías se incluyen gran cantidad de síndromes bien establecidos, que incluyen espondilitis anquilosantes, artritis psoriásica, la artritis de enfermedad inflamatoria intestinal, el síndrome de Reiter, la artritis reactiva crónica y la artritis juvenil relacionada con entesitis. Con el tiempo, algunas personas con USpA desarrollan un tipo bien definido de espondilitis tal como espondilitis anquilosante.

[0082] La espondiloartritis de inicio juvenil (JSpA), también denominada espondiloartropatía juvenil, es el término médico para un grupo de enfermedades reumáticas de la infancia que causan artritis antes de los 16 años de edad y que pueden llegar hasta la vida adulta. Las espondiloartropatías juveniles incluyen la espondiloartropatía indiferenciada, la espondilitis anquilosante juvenil, la artritis psoriásica juvenil, la artritis asociada con enfermedad inflamatoria intestinal (artritis enteropatogénica), artritis reactiva, (síndrome

de Reiter como un tipo de artritis reactiva), y el síndrome SEA (seronegatividad, enteropatía, artropatía). JSpA generalmente causa dolor e inflamación en las articulaciones en la parte inferior del organismo, por ejemplo, la pelvis, las caderas, las rodillas y los tobillos. Otras zonas del organismo también pueden estar afectadas, tales como la columna vertebral, los ojos, la piel y el intestino. También se pueden producir fatiga y letargo.

[0083] La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria crónica transmural no específica que afecta más comúnmente el íleon distal y el colon pero que puede ocurrir en cualquier parte del tracto GI. Los síntomas más comunes de enfermedad de Crohn son diarrea crónica con dolor abdominal, fiebre, anorexia, pérdida de peso, y masa o sensación de plenitud en el cuadrante inferior derecho. Los síntomas menos frecuentes incluyen falta de apetito, fiebre, sudoración nocturna, dolor rectal, y sangrado rectal. La enfermedad de Crohn puede afectar el colon, el recto, y el intestino delgado y, en casos infrecuentes, también el estómago, la boca, y el esófago. Los patrones más comunes de la patología de la enfermedad de Crohn son (1) inflamación caracterizada por dolor abdominal y sensibilidad del cuadrante inferior derecho; (2) obstrucción recurrente parcial causada por estenosis intestinal y que conduce a cólicos severos, distensión abdominal, constipación, y vómitos; (3) yeyunoileítis difusa, con inflamación y obstrucción que causan desnutrición y debilidad crónica; y (4) fístulas y abscesos abdominales, usualmente de desarrollo tardío, a menudo causales de fiebre, masas abdominales dolorosas, y deterioro generalizado. La enfermedad de Crohn debe

sospecharse en un paciente con los síntomas inflamatorios o obstructivos antes descritos y en un paciente sin síntomas GI destacados pero con fístulas o abscesos perianales o artritis no explicado de otra forma, eritema nodoso, fiebre, anemia, o detención del crecimiento (en un niño). Los hallazgos de laboratorio son inespecíficos y pueden incluir anemia, leucocitosis, hipoalbuminemia, y niveles incrementados de reactantes de fase aguda que se reflejan en aumento de ESR, proteína C reactiva u orosomucoides. El aumento de la fosfatasa alcalina y la γ - glutamiltranspeptidasa que acompañan a una enfermedad colónica a menudo refleja colangitis esclerosante primaria. El diagnóstico usualmente se realiza por rayos X.

[0084] En los casos avanzados, se puede detectar el signo del cordón con marcadas estructuras ileales y separación de las asas intestinales. En los casos iniciales, en ocasiones el diagnóstico por rayos X puede ser difícil, pero mediante enema con aire en doble contraste y enterocclisis se pueden detectar aftas superficiales y úlceras lineales. La colonoscopia y la biopsia pueden contribuir a confirmar el diagnóstico de colitis de Crohn y permiten la visualización directa y la biopsia del íleo terminal. La endoscopia GI superior puede identificar el compromiso gastroduodenal de los pacientes con enfermedad de Crohn con síntomas de GI superior.

[0085] La colitis ulcerativa es una enfermedad crónica, inflamatoria, y ulcerativa que se origina en la mucosa colónica, con mayor frecuencia caracterizada por diarrea con sangre. La diarrea con sangre de intensidad y duración variada intercalada con intervalos asintomáticos son los síntomas más comunes de colitis ulcerativa. Usualmente el ataque comienza en forma insidiosa, con

aumento de la urgencia por defecar, calambres leves del abdomen inferior, y sangre y mucus en las heces. Sin embargo, un ataque puede ser agudo y fulminante, con diarrea súbita violenta, fiebre elevada, signos de peritonitis, y toxemia profunda. Algunos casos evolucionan después de una infección documentada (por ejemplo, amebiasis, disentería bacilar). Cuando la ulceración está confinada al rectosigmoides, las heces pueden ser normales o duras y secas, pero con descargas rectales de mucus cargado con glóbulos rojos y glóbulos blancos sanguíneos que acompañan o que ocurren entre los movimientos intestinales. Los síntomas sistémicos son leves o están ausentes. Si la ulceración se extiende en dirección proximal, las heces se tornan más flojas y el paciente puede tener > 10 movimientos intestinales /día, a menudo con calambres severos y tenesmo rectal molesto, sin respiro por la noche. Las heces pueden ser acuosas, pueden contener mucus, y con frecuencia consisten casi en su totalidad de sangre y pus. Puede haber malestar, fiebre, anemia, anorexia, pérdida de peso, leucocitosis, e hipoalbuminemia con extensiva colitis ulcerativa activa. Los antecedentes del paciente y el examen de las heces permiten un diagnóstico presuntivo de colitis ulcerativa que siempre debe ser confirmado por sigmoidoscopia, la cual provee una indicación directa inmediata de la actividad de enfermedad. En los casos iniciales, la membrana mucosa es finamente granular y friable, con pérdida del patrón vascular normal y a menudo con zonas hemorrágicas dispersas; traumatismos mínimos (friabilidad) causan sangrado en múltiples puntos puntuales. La mucosa pronto se rompe para dar una superficie esponjosa roja manchada con muchas úlceras que exudan sangre y pus. A medida que progresa el compromiso de

la mucosa, la inflamación y la hemorragia se extienden hacia el interior del músculo intestinal. Las grandes úlceras de la mucosa con copioso exudado purulento caracterizan la enfermedad severa. Los islotes de mucosa inflamatoria relativamente normal o hiperplásica (seudopólipos) se proyectan por sobre las zonas de mucosa ulcerada. Las biopsias pueden ser inespecíficas y en ocasiones no pueden excluir la colitis infecciosa aguda (autolimitante); sin embargo, las propiedades que sugieren el carácter crónico (por ejemplo, distorsión de la arquitectura de las criptas, atrofia de las criptas, un infiltrado inflamatorio crónico) avalan el diagnóstico de colitis ulcerativa. Incluso durante los intervalos asintomáticos, el aspecto sigmoidoscópico rara vez es normal; casi siempre persiste cierto grado de friabilidad o granularidad. Hay una pérdida del patrón vascular normal, y la biopsia muestra evidencias de inflamación crónica. Los rayos X simples del abdomen en ocasiones contribuyen a juzgar la severidad y el grado proximal de la colitis al mostrar pérdida de haustración, edema de mucosa, y ausencia de heces formadas en el intestino enfermo. Más tarde en el curso de la enfermedad, sin embargo, se debe evaluar todo el colon a fin de determinar el grado de compromiso. La colonoscopia total es el método más sensible y ampliamente usado, aunque el enema de bario puede dar información. La colonoscopia con biopsia es obligatoria para evaluar la naturaleza de una constricción. La biopsia también puede contribuir a distinguir la colitis ulcerativa de la enfermedad de Crohn si la inflamación es altamente focal o si se observa un granuloma.

[0086] El síndrome de intestino irritable (IBS) es un trastorno de la motilidad que incluye todo el tracto GI,

causando síntomas recurrentes de GI superior e inferior, incluso grados variables de dolor abdominal, constipación y/o diarrea, y hinchazón abdominal. La causa del síndrome de intestino irritable (IBS) es desconocida. No se encuentra una causa anatómica. Los factores emocionales, la dieta, los fármacos, o las hormonas pueden precipitar o agravar la motilidad GI aumentada. Las características de IBS son dolor aliviado por la defecación, un patrón alternante de hábitos intestinales, distensión abdominal, mucus en las heces, y sensación de evacuación incompleta después de la defecación. En general, el carácter y la localización del dolor, los factores precipitantes, y el patrón de defecación son diferenciados en cada paciente. Los pacientes con IBS también pueden tener síntomas extraintestinales (por ejemplo, fibromialgia, cefaleas, dispareunia, síndrome de articulación temporomandibular). Se han descrito dos tipos principales de IBS. En el IBS con predominio de constipación, la constipación es común, pero los hábitos intestinales varían. La mayoría de los pacientes tienen dolor al menos en una zona del colon, asociado con constipación periódica alternada con frecuencias de heces más normales. Las heces a menudo contienen mucus límpido o blanco. El dolor es cólico, en accesos, o un dolor sordo continuo; se puede aliviar con el movimiento intestinal. Por lo general, el comer desencadena los síntomas. También se puede producir hinchazón, flatulencias, náusea, dispepsia, y pirosis. El IBS con predominio de diarrea se caracteriza por diarrea precipitada que ocurre al levantarse o durante o inmediatamente después de comer. La diarrea nocturna es infrecuente. Son comunes el dolor, la hinchazón, y la urgencia rectal y puede haber incontinencia. El diagnóstico

de IBS se basa en los patrones intestinales característicos, el tiempo y el carácter del dolor, y la exclusión de otros procesos de enfermedad a través del examen físico y las pruebas de diagnóstico de rutina. Debido a la falta de una anomalía estructural o bioquímica fácilmente identificable en este síndrome, la comunidad médica ha desarrollado una definición y criterios de consenso, denominados los criterios de Roma, para facilitar el diagnóstico de IBS. De acuerdo con los criterios de Roma, IBS está indicada por dolor abdominal o molestia que (1) se alivia con la defecación y/o (2) se asocia con un cambio de la frecuencia o la consistencia de las heces, más dos o más de los siguientes: alteración de la frecuencia de las heces, alteración de la formación de las heces, alteración del paso de las heces, pasaje de mucus, e hinchazón o sensación de distensión abdominal. La palpación del abdomen puede revelar sensibilidad, particularmente en el cuadrante inferior izquierdo, por momentos asociada con un sigmoide palpable y sensible. Se debe efectuar un examen digital rectal de rutina en todos los pacientes, y un examen pelviano en las mujeres.

[0087] La enfermedad de intestino irritable (IBD), también denominada enfermedad de intestino inflamatorio, se caracteriza por la inflamación crónica en diversos sitios del tracto GI. IBD comprende dos subtipos clínicos conocidos, la enfermedad de Crohn (CD) y la colitis ulcerativa (UC). Ciertas diferencias de los patrones de enfermedad justifican distinguir entre enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa.

[0088] El dolor asociado con IBD e IBS se puede presentar como dolor crónico o agudo. Por ejemplo, una característica de IBS es el dolor agudo que se alivia con

la defecación, mientras que el dolor abdominal crónico es típico de la enfermedad de Crohn. Mientras que el dolor asociado con IBD e IBS puede ser extraintestinal o extravisceral, generalmente estas dolencias producen dolor visceral. El dolor visceral es dolor asociado con las vísceras, las cuales abarcan los órganos de la cavidad abdominal. Estos órganos incluyen los órganos sexuales, el bazo, los intestinos, el colon, el recto y otros órganos del aparato digestivo. El dolor visceral tiene cinco características clínicas importantes: (1) no es evocado desde todas las vísceras (órganos tales como el hígado, el riñón, la mayoría de las vísceras sólidas, y el parénquima pulmonar no son sensibles al dolor); (2) no siempre está ligado a lesión visceral; (3) es difuso y poco localizado; (4) se refiere a otras ubicaciones; y (5) se acompaña de reflejos motores y autonómicos, tales como náuseas, vómitos, y tensión muscular lumbar baja que se observa en el cólico renal.

[0089] El dolor es un importante mecanismo protector fisiológico diseñado para advertir sobre el peligro de estímulos potencialmente dañinos provenientes del ambiente externo. El sistema opera a través de un conjunto específico de neuronas sensitivas primarias y es activado por estímulos nocivos a través de mecanismos de transducción periféricos (ver Millan, 1999, *Prog. Neurobiol.*, 57, 1-164 para la revisión). Estas fibras sensitivas se denominan nociceptores y se caracterizan por tener axones de pequeño diámetro con bajas velocidades de conducción. Los nociceptores codifican la intensidad, la duración y la calidad del estímulo nocivo y, en virtud de su proyección organizada topográficamente hacia la columna vertebral, la localización del estímulo. Los nociceptores

se encuentran en fibras nerviosas nociceptivas de las cuales hay dos tipos principales, las fibras A-delta (mielínicas) y las fibras C (no mielínicas). La actividad generada por la entrada al nociceptor es transferida, después de un complejo procesamiento en el asta dorsal, en forma directa, o a través de los núcleos de relé del tronco cerebral, al tálamo ventrobasal y luego a la corteza, en donde se genera la sensación de dolor.

[0090] El dolor generalmente se puede clasificar como agudo o crónico. El dolor agudo comienza súbitamente y es de corta vida (usualmente doce semanas o menos). Usualmente se asocia con una causa específica tal como una lesión específica y a menudo es intensa y severa. Es el tipo de dolor que puede ocurrir después de lesiones específicas que son consecuencia de una cirugía, operatoria dentaria, distensión o esguince. El dolor agudo generalmente no da por resultado una respuesta psicológica persistente. En contraste, el dolor crónico es un dolor a largo plazo, que generalmente persiste durante más de tres meses y que conduce a significativos problemas psicológicos y emocionales. Los ejemplos comunes de dolor crónico son el dolor neuropático (por ejemplo, la neuropatía diabética dolorosa, la neuralgia posherpética), el síndrome del túnel carpiano, el dolor lumbar, la cefalea, el dolor de cáncer, el dolor artrítico y el dolor crónico posquirúrgico.

[0091] Cuando se produce sustancial daño del tejido corporal, por enfermedad o traumatismo, se alteran las características de activación del nociceptor y hay una sensibilización en la periferia, localmente alrededor de la lesión y centralmente donde terminan los nociceptores. Estos efectos conducen a un incremento de la sensación de dolor. En el dolor agudo, estos mecanismos pueden ser

útiles al promover los comportamientos protectores, los cuales pueden facilitar que tengan lugar los procesos de reparación. La expectativa normal sería que la sensibilidad vuelva a la normalidad una vez que haya curado la lesión. Sin embargo, en muchos estados de dolor crónico, la hipersensibilidad supera en mucho el tiempo del proceso de curación y a menudo se debe a lesión del sistema nervioso. Esta lesión a menudo conduce a anormalidades de las fibras nerviosas sensitivas asociadas con la mala adaptación y la actividad aberrante (Woolf & Salter, 2000, *Science*, 288, 1765-1768).

[0092] Clínicamente, se presenta el dolor cuando hay molestia y sensibilidad anormal entre los síntomas del paciente. Los pacientes tienden a ser bastante heterogéneos y se pueden presentar con diversos síntomas de dolor. Dichos síntomas incluyen: 1) dolor espontáneo que puede ser sordo, quemante, o incisivo; 2) exageradas respuestas de dolor a los estímulos nocivos (hiperalgesia); y 3) dolor producido por estímulos normalmente inocuos (alodinia - Meyer et al., 1994, *Textbook of Pain*, 13-44). Si bien los pacientes que sufren de diversas formas de dolor agudo y crónico pueden tener síntomas similares, los mecanismos subyacentes pueden ser diferentes y en consecuencia, requieren diferentes estrategias de tratamiento. En consecuencia, el dolor también se puede dividir en diversa cantidad de diferentes subtipos, de acuerdo con fisiopatologías variables, incluso el dolor nociceptivo, inflamatorio y neuropático.

[0093] El dolor nociceptivo es inducido por daño tisular o por estímulos intensos con la posibilidad de causar lesiones. Los aferentes del dolor son activados por transducción de los estímulos por los nociceptores al sitio

de lesión y activan las neuronas de la médula espinal en el nivel de su terminación. Luego son transmitidas por las vías espinales hasta el encéfalo, donde se percibe el dolor (Meyer et al., 1994, Textbook of Pain, 13-44). La activación de los nociceptores activa dos tipos de fibras nerviosas aferentes. Las fibras mielínicas A-delta transmiten rápidamente y son responsables de las sensaciones de dolor agudas e incisivas, mientras que las fibras C no mielínicas transmiten a menor velocidad y transportan un dolor sordo o continuo. El dolor agudo nociceptivo de moderado a severo es una característica prominente del dolor que proviene de un traumatismo del sistema nervioso central, distensiones/esguinces, quemaduras, infarto de miocardio y pancreatitis aguda, dolor posoperatorio (dolor que sigue a cualquier tipo de procedimiento quirúrgico), dolor postraumático, cólicos renales, dolor por cáncer y dolor lumbar. El dolor por cáncer puede ser un dolor crónico tal como el dolor relacionado con el tumor (por ejemplo, dolor óseo, cefalea, dolor facial o dolor visceral) o dolor asociado con la terapia del cáncer (por ejemplo, síndrome posquimioterapia, síndrome de dolor crónico posquirúrgico o síndrome posradiación). El dolor por cáncer también puede aparecer en respuesta a quimioterapia, inmunoterapia, hormonoterapia o radioterapia. El dolor lumbar puede deberse a hernias o ruptura de discos intravertebrales o anomalías de las facetas de las articulaciones lumbares, las articulaciones sacroilíacas, los músculos paraespinales o el ligamento posterior longitudinal. El dolor lumbar se puede resolver naturalmente, pero en algunos pacientes, cuando dura más de 12 semanas, se transforma en una condición crónica que puede ser particularmente debilitante.

[0094] El dolor neuropático se define actualmente como dolor iniciado o causado por una lesión primaria o disfunción del sistema nervioso. El daño nervioso puede ser causado por traumatismo y enfermedad, y en consecuencia, el término "dolor neuropático" abarca muchos trastornos con diversas etiologías. Estas incluyen, sin limitaciones, neuropatía periférica, neuropatía diabética, neuralgia posherpética, neuralgia del trigémino, dolor lumbar, neuropatía por cáncer, neuropatía por HIV, dolor de miembro fantasma, síndrome del túnel carpiano, dolor central posaccidente cerebrovascular y dolor asociado con alcoholismo crónico, hipotiroidismo, uremia, esclerosis múltiple, lesión de la médula espinal, enfermedad de Parkinson, epilepsia y deficiencia de vitaminas. El dolor neuropático es patológico dado que no tiene ningún papel protector. A menudo se presenta bastante después de que se disipó la causa original, comúnmente dura por años, y reduce significativamente la calidad de vida de un paciente (Woolf y Mannion, 1999, *Lancet*, 353, 1959-1964). Los síntomas de dolor neuropático son difíciles de tratar, dado que a menudo son heterogéneos incluso entre pacientes con la misma enfermedad (Woolf & Decosterd, 1999, *Pain Sup.*, 6, S141-S147; Woolf y Mannion, 1999, *Lancet*, 353, 1959-1964). Incluyen dolor espontáneo, el cual puede ser continuo, y dolor paroxístico o anormalmente evocado, tal como hiperalgesia (sensibilidad aumentada contra un estímulo nocivo) y alodinia (sensibilidad a un estímulo normalmente inocuo).

[0095] El proceso inflamatorio es una serie compleja de eventos bioquímicos y celulares, el cual se activa en respuesta a lesión tisular o la presencia de sustancias extrañas, lo cual da por resultado tumefacción y dolor

(Levine y Taiwo, 1994, Textbook of Pain, 45-56). El dolor artrítico es el dolor inflamatorio más común. La enfermedad reumatoidea es una de las condiciones inflamatorias crónicas más comunes en países desarrollados y la artritis reumatoidea es una causa común de discapacidad. Se desconoce la exacta etiología de la artritis reumatoidea, pero hipótesis actuales sugieren que pueden ser importantes los factores genéticos y microbiológicos (Grennan & Jayson, 1994, Textbook of Pain, 397-407). Se ha estimado que casi 16 millones de estadounidenses tienen osteoartritis sintomática (OA) o una enfermedad degenerativa articular, la mayoría de más de 60 años de edad, y se espera que esta cifra aumente a 40 millones a medida que incrementa la edad de la población, lo cual lo transformaría en un problema de salud pública de enorme magnitud (Houge & Mersfelder, 2002, Ann Pharmacother., 36, 679-686; McCarthy et al., 1994, Textbook of Pain, 387-395). La mayoría de los pacientes con osteoartritis buscan atención médica debido al dolor asociado. La artritis tiene significativo impacto sobre la función psicosocial y física, y es sabido que es la causa principal de discapacidad en años posteriores. La espondilitis anquilosante también es una enfermedad reumática que causa artritis de la columna vertebral y las articulaciones sacroilíacas. Varía desde episodios intermitentes de dolor lumbar que aparecen durante la vida hasta una enfermedad crónica severa que ataca la columna vertebral, las articulaciones periféricas y otros órganos del cuerpo.

[0096] Otro tipo de dolor inflamatorio es el dolor visceral, el cual incluye el dolor asociado con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). El dolor visceral es el dolor asociado con las vísceras, las cuales abarcan los

órganos de la cavidad abdominal. Estos órganos incluyen los órganos sexuales, el bazo y parte del aparato digestivo. El dolor asociado con las vísceras se puede dividir en dolor visceral digestivo y dolor visceral no digestivo. Los trastornos gastrointestinales (GI) comúnmente hallados que causan dolor incluyen de trastorno de la función intestinal (FBD) y enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). Estos trastornos GI incluyen un amplio rango de estados de enfermedad que actualmente sólo están moderadamente controlados, incluso, respecto de FBD, reflujo gastroesofágico, dispepsia, síndrome de intestino irritable (IBS) y síndrome de dolor abdominal funcional (FAPS), y respecto de IBD, enfermedad de Crohn, ileítis y colitis ulcerativa, todos los cuales regularmente producen dolor visceral. Otros tipos de dolor visceral incluyen el dolor asociado con dismenorrea, cistitis y pancreatitis y dolor pelviano.

[0097] Cabe destacar que algunos tipos de dolor tienen múltiples etiologías y en consecuencia se pueden clasificar en más de una zona, por ejemplo, el dolor lumbar y el dolor por cáncer tienen ambos componentes nociceptivos y neuropáticos.

[0098] Otros tipos de dolor incluyen:

- El dolor resultante de trastornos musculoesqueléticos, incluso mialgia, fibromialgia, espondilitis, artropatías seronegativas (no reumatóides), reumatismo no articular, distrofinopatías, glucogenólisis, polimiositis y piomiositis;
- Dolor cardíaco y vascular, incluso el dolor causado por angina, infarto de miocardio, estenosis mitral, pericarditis, fenómeno de Raynaud, esclerodermia e isquemia de músculo esquelético;

- Dolor cefálico, tales como migraña (incluso migraña con aura y migraña sin aura), cefalea acuminada, cefalea de tipo tensional, cefalea mixta y cefalea asociada con trastornos vasculares; y
- Dolor orofacial, incluso dolor dental, dolor ótico, síndrome de boca ardiente y dolor miofacial temporomandibular.

[0099] Los anticuerpos de IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes se pueden usar en combinación con uno o más de otros agentes terapéuticos. Por ejemplo, un anticuerpo o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes se pueden usar con un inhibidor de COX-2, tales como celecoxib, para el tratamiento de enfermedades tales como artritis reumatoidea, osteoartritis y dolor. Los anticuerpos IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes y los demás agentes terapéuticos se pueden administrar al paciente en la misma forma de dosificación o en diferentes formas de dosificación. Más aún, se pueden administrar al mismo tiempo o en diferentes momentos. A continuación se presentan algunos ejemplos de agentes terapéuticos que se pueden usar en combinación con los anticuerpos anti-IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes.

Artritis reumatoidea

[0100] Los anticuerpos IL-6 y sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes también se pueden usar en coterapias. Los compuestos de coterapia antiinflamatorios adecuados incluyen:

ciclosporina, ácido zoledrónico, efalizumab, alefacept, etodolac, lornoxicam, OM-89, valdecoxib, tocilizumab,

abatacept, meloxicam, etanercept, nambumetona, rimexolona, 153Sm-EDTMP, prosorba, salicilato de imidazol, oprelvekin, ácido hialurónico, naproxeno, piroxicam, diacereína, lumericoxib, tacrolimus, aceclofenac, actarit, tenoxicam, rosiglitazona, deflazacort, adalimumab, leflunomida, risedronato de sodio, misoprostol y diclofenac, SK-1306X, infliximab, anakinra, celecoxib, diclofenac, etoricoxib y felbinac, reumacon, golimumab, denosumab, ofatumumab, anticuerpo 10rT1, pelubiprofeno, licofelona, temsirolimus, eculizumab, iguratimod, y prednisona. Otros antiinflamatorios adecuados incluyen CP-481715, ABN-912, MLN-3897, HuMax-IL-15, RA-1, paclitaxel, Org-37663, Org 39141, AED-9056, AMG-108, fontolizumab, pegsunercept, pralnacasan, apilimod, GW-274150, AT-001, 681323 (GSK) K-832, R-1503, ocrelizumab, DE-096, Cpn10, THC+CBD (GW Farmaa), 856553 (GSK), ReN-1869, inmunoglobulina, mm-093, amelubant, SCIO-469, ABT-874, LenkoVAX, LY-2127399, TRU-015, KC-706, amoxapinet y dipiridamol, TAK-715, PG 760564, VX-702, prednisolona y dipiridamol, PMX-53, belimumab, prinaberel, CF-101, tgAAV-TNFR:Fc, R-788, prednisolona y SSRI, CP-690550 y PMI-001.

Osteoarthritis

[0101] Los anticuerpos IL-6 y sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes también se pueden coadministrar para el tratamiento de osteoarthritis con uno o más agentes útiles para tratar uno o más indicios de osteoarthritis. Los ejemplos de agentes útiles para tratar uno o más indicios de osteoarthritis para usar en combinación con los anticuerpos anti-IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes incluyen inhibidores de la metaloproteinasa de la matriz (MMP), inhibidores de

agrecanasa, inhibidores inducibles de óxido nítrico (iNOS), inhibidores de la expresión o actividad de factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), inhibidores de la expresión o actividad de factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), inhibidores de la expresión o actividad de CD 44, inhibidores de la expresión o actividad de interleucina (IL), inhibidores de la expresión o actividad de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), inhibidores de la expresión o actividad de proteína 6 inducible por factor de necrosis tumoral (TSG-6), inhibidores de la expresión o actividad de Bikunina, inhibidores de beta-secretasa (BACE), inhibidores de PACE-4, inhibidores de la expresión o actividad de receptor nuclear rev-ErbA alfa (NR1D1), inhibidores de la expresión o actividad de receptor 1 acoplado a proteína G endotelial de diferenciación de esfingolípidos (EDG-1), inhibidores de la expresión o actividad de receptor activado por proteínasa (PAR), inhibidores de la expresión o actividad de proteína sensible a ácido retinoico derivado de cartílago (CD-RAP), inhibidores de proteína quinasa C zeta (PKCz), inhibidores de la expresión o actividad de resistina, inhibidores de una desintegrina y metaloproteínasa 8 (ADAM8), inhibidores de la expresión o actividad de componente y subcomponente 1 de complemento (C1s), inhibidores de la expresión o actividad de péptido formilo similar a receptor 1 (FPRL1).

[0102] Otros ejemplos de agentes útiles en combinación con los anticuerpos IL-6 y sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes incluyen inhibidores de MMP -2, -3, -9, o -13; inhibidores de agrecanasa -1 o -2; inhibidores de la expresión o actividad de IGF -1 o -2; inhibidores de la expresión o actividad de FGF -2, -18, o -

9; y inhibidores de la expresión o actividad de IL -1, -4 o -6.

[0103] Otros ejemplos de agentes útiles en combinación con los anticuerpos IL-6 y sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes incluyen los anticuerpos IGF -1 o -2; antagonistas de receptor FGF -2 o -3, anticuerpos CD 44, anticuerpos IL -1, -4 o -6, anticuerpos TNF-alfa; anticuerpos TSG-6; anticuerpos de bikunina; antagonistas de NR1D1; antagonistas de EDG-1; antagonistas de PAR, anticuerpos CD-RAP, anticuerpos de resistina, anticuerpos C1s, y anticuerpos FPRL1.

Dolor

[0104] Los anticuerpos IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes se pueden administrar en combinación con uno o más de otros compuestos farmacológicamente activos para el tratamiento del dolor. Los compuestos se pueden administrar al mismo tiempo en una única forma de dosificación o por separado en formas de dosificación que pueden ser iguales o diferentes. Alternativamente, los compuestos se pueden administrar en secuencia. Las sales farmacéuticamente aceptables de los compuestos farmacológicamente activos también se pueden usare en las combinaciones.

[0105] Los ejemplos de compuestos que se pueden administrar con anticuerpos IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes incluyen:

[0106] Inhibidores selectivos de ciclooxigenasa-2 (COX-2) tales como celecoxib, rofecoxib, parecoxib, valdecoxib, deracoxib, etoricoxib, y lumiracoxib; analgésicos opioides tales como morfina, hidromorfona, oximorfona, fentanilo, codeína, dihidrocodeína, oxicodona,

hidrocodona, buprenorfina, tramadol, y nalbufina; fármacos antiinflamatorios no esteroides (AINE) tales como aspirina, diclofenac, diflunisal, ibuprofeno, fenoprofeno, naproxeno, nepafenac, y acetaminofeno; Inhibidores de fosfodiesterasa V (PDEV) tales como sildenafil; ligandos de alfa-2-delta tales como gabapentina y pregabalina; y anestésicos locales tales como benzocaína, lidocaína, ropivacaína, mentol, alcanfor y salicilato de metilo.

[0107] Los ejemplos de otros tipos de compuestos y clases de compuestos que se pueden usar en combinación con anticuerpos IL-6 y sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes incluyen: sedantes de barbiturato; benzodiazepinas; antagonistas de histamina H_1 que tienen acción sedante; sedantes; relajantes del músculo esquelético; antagonistas de receptor de ácido N-metil-D-aspartico (NMDA); alfa-adrenérgicos; antidepresivos tricíclicos; anticonvulsivantes tales como carbamazepina; antagonistas de taquicinina (NK), particularmente antagonistas de NK-3, NK-2 o NK-1; antagonistas de ácido muscarínico; neurolépticos; agonistas o antagonistas de receptores vainilloides; beta-adrenérgicos; corticosteroides; agonistas o antagonistas de receptores de serotonina (5-HT) tales como un antagonista de receptor 5-HT_{1B/1D}, 5-HT_{2A}, y 5-HT₃; analgésicos colinérgicos (nicotínicos); cannabinoides; antagonistas de receptor metabotrópico de glutamato subtipo 1 (mGluR1); inhibidores de la recaptación de serotonina tales como sertralina; inhibidores de la recaptación de noradrenalina (norepinefrina) tales como reboxetina, en particular (S,S)-reboxetina; inhibidores de la recaptación dual de serotonina-noradrenalina tales como duloxetina; inhibidores inducibles de óxido nítrico sintasa (iNOS) tales como S-[2-

[(1-iminoetil)amino]etil]-L-homocisteína, S-[2-[(1-iminoetil)-amino]etil]-4,4-dioxo-L-cisteína, S-[2-[(1-iminoetil)amino]etil]-2-metil-L-cisteína, ácido (2S,5Z)-2-amino-2-metil-7-[(1-iminoetil)amino]-5-heptenoico, 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hidroxil-1-(5-tiazolil)-butil]tio]-5-cloro-3-piridincarbonitrilo; 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hidroxil-1-(5-tiazolil)butil]tio]-4-clorobenzonitrilo, (2S,4R)-2-amino-4-[[2-cloro-5-(trifluorometil)fenil]tio]-5-tiazolebutanol, 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hidroxil-1-(5-tiazolil)butil]tio]-6-(trifluorometil)-3-piridincarbonitrilo, 2-[[[(1R,3S)-3-amino-4-hidroxil-1-(5-tiazolil)butil]tio]-5-clorobenzonitrilo, N-[4-[2-(3-clorobenzilamino)etil]fenil]tio]feno-2-carboxamidina, y etildisulfuro de guanidino; inhibidores de acetilcolinesterasa; antagonistas de prostaglandina E₂ subtipo 4 (EP4) tales como N-[(2-[4-(2-etil-4,6-dimetil-1H-imidazo[4,5-c]piridin-1-il)fenil]etil)amino)-carbonil]-4-metilbencenosulfonamida o ácido 4-[(1S)-1-([5-cloro-2-(3-fluorofenoxi)piridin-3-il]carbonil)amino)etil]benzoico; antagonistas de leucotrieno B₄ tales como ácido 1-(3-bifenil-4-ilmetil-4-hidroxil-croman-7-il)-ciclopentanocarboxílico; inhibidores de 5-lipoxigenasa; y bloqueadores de los canales de sodio.

Síndrome de fibromialgia

[0108] Productos: analgésicos tales como acetaminofeno, naproxeno sódico, ibuprofeno, tramadol, trazodona; ciclobenzaprina; aspirina, celecoxib, valdecoxib, indometacina, y otros AINE; antidepresivos tales como antidepresivos tricíclicos e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, por ejemplo antidepresivos tales como amitriptilina, imipramina,

nortriptilina, doxepina, fluoxetina, sertralina, y paroxetina; relajantes musculares tales como ciclobenzaprina; auxiliares del sueño tales como zolpidem.

[0109] Clases: inhibidores de la recaptación de norepinefrina-serotonina (NSRI y SNRI); inhibidores de la recaptación de norepinefrina (NRI); inhibidores de la recaptación selectiva de serotonina (SSRI); antidepresivos tricíclicos; inhibidores selectivos de ciclooxigenasa-2 (COX-2); fármacos antiinflamatorios no esteroides (NSAID); analgésicos.

Espondilitis anquilosantes

[0110] Productos: analgésicos tales como acetaminofeno, naproxeno sódico, ibuprofeno, tramadol, aspirina, celecoxib, valdecoxib, indometacina, y otros AINE; fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (DMARD) tales como sulfasalazina o metotrexato; corticosteroides; y bloqueadores de factor de necrosis tumoral (TNF) tales como etanercept e infliximab.

[0111] Clases: analgésicos; AINE; inhibidores de COX-2; DMARD; corticosteroides; bloqueadores de TNF.

Psoriasis

[0112] Productos: fototerapia, incluso terapia con psoraleno ultravioleta A (psoraleno UVA o PUVA), terapia con ultravioleta B (UVB) de banda angosta, y terapia lumínica de combinación; corticosteroides tópicos; análogos de vitamina D tales como calcipotrieno; antralina; retinoides tópicos (es decir, derivados de vitamina A) tales como acitretina y tazaroteno; propionato de clobetasol; metotrexato; azatioprina; ciclosporina;

hidroxiurea; y fármacos moduladores inmunes tales como alefacept, efalizumab, y etanercept.

[0113] Clases: fototerapia; corticosteroides; análogos de vitamina D; derivados de vitamina A.

Gota

[0114] Productos: AINE tales como acetaminofeno, naproxeno sódico, ibuprofeno, tramadol, aspirina, celecoxib, valdecoxib, e indometacina; y corticosteroides tales como prednisona.

[0115] Clases: analgésicos; AINE; inhibidores de COX-2; y corticosteroides.

Enfermedad de Crohn

[0116] Productos: analgésicos tales como acetaminofeno, naproxeno sódico, ibuprofeno, tramadol, aspirina, celecoxib, valdecoxib, indometacina, y otros AINE; fármacos antiinflamatorios; sulfasalazina, mesalamina, balsalazida, y olsalazina; y corticosteroides tales como prednisona y budesonida; fármacos inmunosupresores tales como azatioprina, mercaptopurina, bloqueadores de TNF tales como infliximab y adalimumab, metotrexato, y ciclosporina; antibióticos tales como metronidazol y ciprofloxacina; antidiarreicos tales como loperamida; y laxantes.

[0117] Clases: analgésicos; AINE; inhibidores de COX-2; fármacos antiinflamatorios; bloqueadores de TNF; antibióticos; antidiarreicos; y laxantes.

Colitis ulcerativa

[0118] Clases: analgésicos tales como acetaminofeno, naproxeno sódico, ibuprofeno, tramadol, aspirina,

celecoxib, valdecoxib, indometacina, y otros AINE; fármacos antiinflamatorios; sulfasalazina, mesalamina, balsalazida, y olsalazina; corticosteroides; fármacos inmunosupresores tales como azatioprina mercaptopurina bloqueadores de TNF tales como infliximab y adalimumab, metotrexato, y ciclosporina; antidiarreicos tales como loperamida; y laxantes.

[0119] Clases: AINE; inhibidores de COX-2; fármacos antiinflamatorios; bloqueadores de TNF; corticosteroides; inmunosupresores; inhibidores de Janus quinasa-3 (Jak-3); bloqueadores de TNF; antidiarreicos; y laxantes.

Síndrome de intestino irritable

[0120] Productos: antidiarreicos tales como loperamida; laxantes; fármacos anticolinérgicos; antidepresivos tales como antidepresivos tricíclicos e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina, por ejemplo antidepresivos tales como amitriptilina, imipramina, nortriptilina, doxepina, fluoxetina, sertralina, y paroxetina; alosetrona; y tegaserod.

[0121] Clases: antidiarreicos; laxantes; fármacos anticolinérgicos; inhibidores de la recaptación de norepinefrina-serotonina (NSRI y SNRI); inhibidores de la recaptación de norepinefrina (NRI); inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (SSRIs); antidepresivos tricíclicos.

Composiciones farmacéuticas y administración

[0122] También se proveen composiciones farmacéuticas para el tratamiento de infiltración de células anormales en un mamífero, incluso un humano, que comprenden una cantidad de un anticuerpo IL-6 o su porción fijadora de antígeno

correspondiente, tal como se describe en la presente, que es efectiva en el tratamiento de la infiltración celular anormal, y un portador farmacéuticamente aceptable. Las composiciones proveen un beneficio terapéutico a los pacientes con uno de más de una variedad de enfermedades inflamatorias y autoinmunes, tales como artritis reumatoidea, aterosclerosis, enfermedades granulomatosas, esclerosis múltiple, asma y cáncer.

[0123] Los anticuerpos IL-6 y sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración a un sujeto. Generalmente, la composición farmacéutica comprende un anticuerpo IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno y un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en la presente, "portador farmacéuticamente aceptable" significa cualquier solventes, medio de dispersión, cubierta, agente antibacteriano y antifúngico, agente isotónico y retardante de la absorción, y similares que son fisiológicamente compatibles. Algunos ejemplos de portadores farmacéuticamente aceptables son agua, solución fisiológica, solución fisiológica con buffer fosfato, dextrosa, glicerol, etanol y similares, así como sus combinaciones. En muchos casos, es preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro de sodio en la composición. Otros ejemplos de sustancias farmacéuticamente aceptables son agentes humectantes o cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes o buffer, los cuales mejoran la vida de depósito o la efectividad del anticuerpo.

[0124] Las composiciones de la presente invención pueden estar en una variedad de formas, por ejemplo, formas

de dosificación líquidas, semisólidas y sólidas, tales como soluciones líquidas (por ejemplo, soluciones inyectables y infusibles), dispersiones o suspensiones, comprimidos, píldoras, polvos, liposomas y supositorios. La forma depende del modo de administración pretendido y la aplicación terapéutica. Las composiciones típicas están en la forma de soluciones inyectables o infusibles, tales como composiciones similares a las usadas para la inmunización pasiva de humanos. En un caso el modo de administración es parenteral (por ejemplo, intravenoso, subcutáneo, intraperitoneal, intramuscular). En otro caso, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intravenosa. En otro caso, el anticuerpo se administra por infusión o inyección intramuscular o subcutánea. Las formulaciones para inyección se pueden presentar en formas de dosificación unitarias, por ejemplo, en ampollas o en contenedores de dosis múltiples, con o sin conservador agregado. Las composiciones pueden adoptar la forma de suspensiones, soluciones, o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilización y/o dispersión. Alternativamente, el ingrediente activo puede estar en forma de polvo para la constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua estéril libre de pirógenos, antes de su uso. Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar mediante la incorporación del anticuerpo IL-6 en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados con anterioridad, tal como se requiera, seguido de esterilización por filtrado. En un caso, el anticuerpo se administra en una formulación como solución acuosa estéril que tiene un pH que varía desde aproximadamente 5,0 hasta

aproximadamente 6,5 y que comprende desde aproximadamente 1 mg/ml hasta aproximadamente 200 mg/ml de anticuerpo, desde aproximadamente 1 milimolar hasta aproximadamente 100 milimolar de buffer de histidina, desde aproximadamente 0,01 mg/ml hasta aproximadamente 10 mg/ml de polisorbato 80 o polisorbato 20, desde aproximadamente 100 milimolar hasta aproximadamente 400 milimolar de un azúcar no reductor seleccionado sin limitaciones de trehalosa o sacarosa, desde aproximadamente 0,01 milimolar hasta aproximadamente 1,0 milimolar de EDTA disódico dihidrato y opcionalmente comprenden un antioxidante farmacéuticamente aceptable además de un agente quelante. Los antioxidantes adecuados incluyen sin limitaciones, metionina, tiosulfato de sodio, catalasa, y platino. Por ejemplo, la composición puede contener metionina en una concentración que varía desde 1 mM hasta aproximadamente 100 mM, y en particular, es de aproximadamente 27 mM. En algunos casos, una formulación contiene 5 mg/ml de anticuerpo en un buffer de 20 mM de citrato de sodio, pH 5,5, 140 mM de NaCl, y 0,2 mg/ml de polisorbato 80. Cabe destacar que los valores de dosificación pueden variar con el tipo y la severidad de la condición que se busca aliviar. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación adecuados incluyen secado en vacío y secado por congelación que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una de sus soluciones previamente esterilizadas por filtrado. La fluidez adecuada de una solución se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de una cubierta tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partículas requerido en el caso de dispersión y por el uso de agentes tensioactivos. La absorción

prolongada de composiciones inyectables se puede llevar a cabo mediante la inclusión en la composición de un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

[0125] Los anticuerpos IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes se pueden administrar por diversos métodos, aunque para muchas aplicaciones terapéuticas, la vía/el modo de administración puede ser subcutáneo, intramuscular, o infusión intravenosa. Tal como podrá apreciar un experto en la técnica, la vía y/o el modo de administración pueden variar según los resultados deseados.

[0126] En ciertos casos, las composiciones de anticuerpo IL-6 se pueden preparar con un portador que protege el anticuerpo contra la liberación rápida, tal como una formulación de liberación controlada, incluso implantes, parches transdérmicos, y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden usar polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como vinilacetato de etileno, polianhídridos, ácido poliglucólico, colágeno, poliortoésteres, y ácido poliláctico. Se pueden usar muchos métodos para la preparación de dichas formulaciones. Ver, por ejemplo, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978, que se incorpora a la presente por referencia.

[0127] También se pueden incorporar a las composiciones otros compuestos activos. En algunos casos, un anticuerpo IL-6 inhibidos se coformula y/o se coadministra con uno o más agentes terapéuticos adicionales. Estos agentes incluyen, sin limitación, anticuerpos que se fijan a otros objetivos, agentes antitumorales, agentes antiangiogénicos, inhibidores de la

transducción de señales, agentes antiproliferativos, agentes quimioterapéuticos, o análogos de péptidos que inhiben IL-6. Dichas terapias de combinación pueden requerir menores dosis del anticuerpo inhibidor IL-6 así como de los agentes coadministrados, por lo que se evitan posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

[0128] Las composiciones pueden incluir una “cantidad terapéuticamente efectiva” o una “cantidad preventivamente efectiva” de un anticuerpo o porciones fijadoras de antígeno. Una “cantidad terapéuticamente efectiva” se refiere a una cantidad efectiva en las dosis y durante los periodos necesarios para obtener el resultado terapéutico deseado. Una cantidad terapéuticamente efectiva del anticuerpo o las porciones fijadoras de antígeno puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, la edad, el sexo, y el peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo o la porción de anticuerpo para desencadenar una respuesta deseada en el individuo. Una cantidad terapéuticamente efectiva también es una en la cual cualquier efecto tóxico o en detrimento del anticuerpo o las porciones fijadoras de antígeno está compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos. Una “cantidad preventivamente efectiva” se refiere a una cantidad efectiva, en las dosis y durante los periodos necesarios, para obtener el resultado preventivo deseado. Generalmente, dado que se usar una dosis preventiva en los sujetos antes o en una etapa anterior de la enfermedad, la cantidad preventivamente efectiva puede ser inferior a la cantidad terapéuticamente efectiva.

[0129] Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para suministrar la respuesta óptima deseada (por ejemplo,

una respuesta terapéutica o preventiva). Por ejemplo, se puede administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas en el tiempo o la dosis se puede reducir o incrementar proporcionalmente tal como lo indican las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en una forma de dosificación unitaria a fin de facilitar la administración y la uniformidad de la dosis. La forma de dosificación unitaria tal como se usa en la presente se refiere a unidades físicamente separadas adecuadas como dosis unitarias para los sujetos mamíferos a tratar; en donde cada unidad contiene una cantidad predeterminada de anticuerpo IL-6 o su porción fijadora de antígeno correspondiente calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido.

[0130] Un ejemplo no limitante de rango de cantidad terapéuticamente o preventivamente efectiva de un anticuerpo IL-6 o una porción de anticuerpo es 0,025 a 50 mg/kg, 0,1 a 50 mg/kg, 0,1-25, 0,1 a 10 ó 0,1 a 3 mg/kg. En un caso, el anticuerpo IL-6 o su porción de anticuerpo se administra en una formulación como solución acuosa estéril que tiene un pH que varía desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 6,5 y que comprende desde aproximadamente 1 mg/ml hasta aproximadamente 200 mg/ml de anticuerpo, desde aproximadamente 1 milimolar hasta aproximadamente 100 milimolar de buffer de histidina, desde aproximadamente 0,01 mg/ml hasta aproximadamente 10 mg/ml de polisorbato 80, desde aproximadamente 100 milimolar hasta aproximadamente 400 milimolar de trehalosa, y desde aproximadamente 0,01 milimolar hasta aproximadamente 1,0 milimolar de EDTA disódico dihidrato. Cabe destacar que los

valores redosificación pueden variar con el tipo y la severidad de la condición que se busca aliviar. También se debe entender que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se deben ajustar con el tiempo de acuerdo con la necesidad del individuo y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y dichos rangos de dosificación establecidos en la presente son sólo ejemplos y no pretenden limitar el alcance o la puesta en práctica de las composiciones reivindicadas.

[0131] Otro aspecto provisto en la presente son kits que comprenden un anticuerpo IL-6 o las porciones fijadoras de antígeno o una composición que comprende dicho anticuerpo o las porciones fijadoras de antígeno. Un kit puede incluir, además del anticuerpo o la composición, agentes de diagnóstico o terapéuticos. Un kit también puede incluir instrucciones para el uso en un método de diagnóstico o terapéutico. En un caso, el kit incluye el anticuerpo o una composición que lo comprende y un agente de diagnóstico que puede ser usado en un método descrito en la presente. En otro caso, el kit incluye el anticuerpo o una composición que lo comprende y uno o más agentes terapéuticos que pueden ser usados en un método descrito en la presente.

Métodos de uso diagnóstico

[0132] Otro aspecto provisto en la presente son los métodos de diagnóstico. Los anticuerpos anti-IL-6 o su porción fijadora de antígeno se puede usar para detectar IL-6 en una muestra biológica in vitro o in vivo. Un aspecto provee un método para diagnosticar la presencia o la localización de células que expresan IL-6 en un sujeto

que lo necesite, que comprende las etapas de inyectar el anticuerpo en el sujeto, determinar la expresión de IL-6 en el sujeto mediante la localización en la cual se ha fijado el anticuerpo, comparar la expresión en el sujeto con la de un sujeto normal de referencia o estándar, y diagnosticar la presencia o localización de las células. Los anticuerpos anti-IL-6 también se pueden usar como marcadores de la inflamación y/o para la infiltración de células inmunes, tales como monocitos y células T, en un tejido.

[0133] Los anticuerpos anti-IL-6 se pueden usar en cualquier inmunoensayo adecuado, incluso sin limitaciones, ELISA, RIA, citometría de flujo e inmunohistoquímica de tejido, Western blot o inmunoprecipitación. Los anticuerpos anti-IL-6 o su porción fijadora de antígeno correspondiente se pueden usar para detectar IL-6 de humanos. En otro caso, se pueden usar los anticuerpos anti-IL-6 para detectar IL-6 de monos cinomolgus, monos rhesus y roedores, tales como ratones y ratas.

[0134] Los métodos para detectar IL-6 en una muestra biológica generalmente comprenden poner en contacto la muestra biológica con un anticuerpo anti-IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes y detectar el anticuerpo fijado. En un caso, el anticuerpo anti-IL-6 o su porción fijadora de antígeno correspondiente es rotulado directamente con un rótulo detectable. En otro caso, el anticuerpo anti-IL-6 (el primer anticuerpo) no está rotulado y se rotula un segundo anticuerpo u otra molécula capaz de fijarse al anticuerpo anti-IL-6. Se elige un segundo anticuerpo capaz de fijarse específicamente a la especie y clase particular del primer anticuerpo. Por ejemplo, si el anticuerpo anti-IL-6 es un IgG humano, entonces el anticuerpo secundario podría ser un IgG anti-

humano. Otras moléculas que se pueden fijar a los anticuerpos incluyen, sin limitación, la proteína A y la proteína G, ambas disponibles en el comercio, por ejemplo, de Pierce Chemical Co.

[0135] Los rótulos adecuados para el anticuerpo o anticuerpo secundario se describen en la presente e incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminescentes y materiales radioactivos. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbelliferona, fluoresceína, isotiocianati de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilaminfluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; y los ejemplos de material radiactivo adecuado incluyen, ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

[0136] IL-6 también se puede analizar en una muestra biológica mediante un inmunoensayo de competencia que utiliza estándares de IL-6 rotulados con una sustancia detectable y un anticuerpo anti-IL-6 no rotulado. En este ensayo, se combinan la muestra biológica, los estándares IL-6 rotulados y el anticuerpo anti-IL-6 y se determina la cantidad de estándar IL-6 rotulado fijado al anticuerpo no rotulado. La cantidad de IL-6 en la muestra biológica es inversamente proporcional a la cantidad de estándar de IL-6 rotulado fijada al anticuerpo anti-IL-6.

[0137] Se pueden usar dichos inmunoensayos para varios fines. Por ejemplo, los anticuerpos anti-IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes se pueden

usar para detectar IL-6 en células cultivadas. En un caso, los anticuerpos anti-IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes se usan para determina la cantidad de IL-6 en la superficie de las célula que han sido tratadas con diversos compuestos. Este método se puede usar para identificar compuestos que modulan los niveles de proteína IL-6. De acuerdo con este método, una muestra de células se trata con un compuesto de prueba durante un periodo, mientras que otra muestra se deja sin tratar. Si se debe medir el total de la expresión de IL-6, se lisan las células y se mide la expresión total de IL-6 mediante el uso de cualquier inmunoensayo adecuado. La expresión total de IL-6 en las células tratadas versus no tratadas se compara con el fin de determinar el efecto del compuesto de prueba.

[0138] Los inmunoensayos para medir la expresión de total IL-6 incluye citometría de flujo e inmunohistoquímica. Si se mide la expresión de IL-6 en la superficie celular, las células no se lisan, y los niveles de IL-6 en la superficie celular se miden mediante el uso de uno de los inmunoensayos descritos con anterioridad. Un inmunoensayo preferido para determinar los niveles de superficie celular de IL-6 incluye las etapas de rotular las proteínas de superficie celular con un rótulo detectable, tal como biotina o ^{125}I , inmunoprecipitar el IL-6 con un anticuerpo anti-IL-6 y luego detectar el IL-6 rotulado.

[0139] Otro inmunoensayo para determinar la localización de IL-6, por ejemplo, los niveles de superficie celular, consiste en usar inmunohistoquímica. Un inmunoensayo para detectar los niveles de superficie celular de IL-6 incluye fijar un anticuerpo anti-IL-6

rotulado con un fluoróforo adecuado, tal como fluoresceína o ficoeritrina, y detectar el anticuerpo primario mediante el uso de citometría de flujo. En otro ejemplo, el anticuerpo anti-IL-6 no se rotula y se rotula un segundo anticuerpo u otra molécula capaz de fijar el anticuerpo anti-IL-6. Los métodos tales como ELISA, RIA, citometría de flujo, Western blot, inmunohistoquímica, rotulado de superficie celular de proteínas integrales de membrana e inmunoprecipitación son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Harlow y Lane. Además, los inmunoensayos se pueden escalar para el análisis con alto rendimiento a fin de estudiar una gran cantidad de compuestos para la activación o la inhibición de IL-6.

[0140] El anticuerpo anti-IL-6s o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes también se pueden usar para determinar los niveles de IL-6 en un tejido o en células derivadas del tejido. En algunos ejemplos, el tejido es un tejido enfermo o una biopsia de tejido. El tejido o la biopsia de tejido se pueden usar en un inmunoensayo para determinar, por ejemplo, la expresión total de IL-6, los niveles de superficie celular de IL-6 o la localización de IL-6 por los métodos antes descritos. Dichos métodos se pueden usar para determinar si un tejido expresa niveles elevados de IL-6, lo cual podría indicar que el tejido es un objetivo de tratamiento con anticuerpo anti-IL-6.

[0141] Los anticuerpos IL-6 y sus porciones fijadoras de antígeno también se pueden usar in vivo para identificar tejidos y órganos que expresan IL-6. En algunos casos, los anticuerpos anti-IL-6 se usan para identificar las células que expresan IL-6. Los anticuerpos anti-IL-6 humanos se pueden usar con seguridad in vivo sin generar una respuesta

inmune sustancial contra el anticuerpo después de la administración, a diferencia de los anticuerpos que no son de origen humano o con anticuerpos humanizados o quiméricos.

[0142] El método comprende las etapas de administrar un anticuerpo anti-IL-6 con rótulo detectable o una composición que lo comprende a un paciente que necesite dicha prueba de diagnóstico y someter al paciente a análisis por imágenes a fin de determinar la localización de los tejidos que expresan IL-6. El análisis por imágenes es bien conocido en la técnica médica, e incluye, sin limitación, análisis por rayos X, imágenes por resonancia magnética (IRM) o tomografía computada (CT). El anticuerpo se puede rotular con cualquier agente adecuado para las obtención de imágenes in vivo, por ejemplo un agente de contraste, tal como bario, el cual se puede usar para el análisis por rayos X, o un agente de contraste magnético, tal como un quelato de gadolinio, el cual se puede usar para IRM o CT. Otros agentes rotuladores incluyen sin limitación, radioisótopos tales como ⁹⁹Tc. En otro caso, el antianticuerpo IL-6 no está rotulado y se obtiene la imagen al administrar un segundo anticuerpo u otra molécula que es detectable y que puede fijar el antianticuerpo IL-6. En un ejemplo, se obtiene una biopsia del paciente a fin de determinar si el tejido de interés expresa IL-6.

[0143] El anti-IL-6 con rótulo detectable puede comprender un fluoróforo. En ciertos casos, el fluoróforo es seleccionado del grupo que consiste de una tintura fluorescente del infrarrojo cercano, dinitrofenilo, fluoresceína o sus derivados, rodamina, los derivados de rodamina, ficoeritrina, ficocianina, aloficocianina, o-ftaldehído y fluorescamina, rojo Texas, verde de rodamina,

verde Oregon, azul cascada, ficoeritrina, CY3, CY5, CY2, CY7, cumarina, 40 infrarrojo, MR 200, IRD 40, Alexa Fluor, azul cascada, tetrametilrodamina, azul pacífico, SYBR, y BODIPI. En otro ejemplo, el fluoróforo incluye uno de los siguientes compuestos con su máximo de emisión indicado nm entre paréntesis, Cy2.TM. (506), GFP (Red Shifted) (507), YO-PRO®-1 (509), YOYO®-1 (509), calceína (517), FITC (518), FluorX® (519), Alexa® (520), rodamina 110 (520), 5-FAM (522), Oregon Green® 500 (522), Oregon Green® 488 (524), RiboGreen® (525), Rhodamine Green® (527), rodamina 123 (529), Magnesium Green® (531), Calcium Green® (533), TO-PRO®-1 (533), TOTO®-1 (533), JOE (548), BODIPI® 530/550 (550), Dil (565), BODIPI® (568), BODIPI® 558/568 (568), BODIPI® 564/570 (570), Cy3® (570), Alexa® 546 (570), TRITC (572), Magnesium Orange® (575), ficoeritrina R&B (575), rodamina falloidin (575), Calcium Orange® (576), Pironina Y (580), rodamina B (580), TAMRA (582), Rhodamine Red® (590), Cy3.5® (596), ROX (608), Calcium Crimson™. (615), Alexa® 594 (615), Texas Red.™. (615), Nile Red (628), YO-PRO®-3 (631), YOYO®-3 (631), R-ficocianina (642), C- ficocianina (648), TO-PRO®-3 (660), TOTO®-3 (660), DiD DilC(5) (665), Cy5.TM. (670), Tiadicarbocianina (671) y Cy5.5 (694).

[0144] En aún otro ejemplo, los anticuerpos anti-IL-6 también se pueden usar para determinar la reducción de la expresión de IL-6 de superficie celular sobre las células por ejemplo, los linfocitos o monocitos.

[0145] Los anticuerpos anti-IL-6 humanos o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes minimizan las respuestas inmunogénicas y alérgicas intrínsecas a anticuerpos monoclonales humanos o no humanos derivados (Mabs), y en consecuencia incrementan la eficacia y la

seguridad de los anticuerpos administrados o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes.

[0146] Otro aspecto provee anticuerpos anti-IL-6 humanos codificados en parte por una secuencia de línea germinal humana. Los genes V_H , V_K , V_λ se clasifican en familias sobre la base de la homología de secuencia. Dos genes V_H , V_K , o V_λ pertenecen a la misma familia si comparten la misma secuencia de nucleótidos en más del 80% de las posiciones. Un anticuerpo anti-IL-6 puede comprender una cadena liviana kappa humana (V_K) o una cadena liviana lambda humana (V_λ) o una secuencia de aminoácidos derivada de ellas. En algunos casos que comprenden una cadena liviana lambda, el dominio variable de la cadena liviana (V_L) es codificado en parte por un gen de la familia $V_{\lambda 1}$, $V_{\lambda 2}$, $V_{\lambda 3}$, $V_{\lambda 4}$, $V_{\lambda 5}$, $V_{\lambda 6}$, $V_{\lambda 7}$, $V_{\lambda 8}$, $V_{\lambda 9}$, o $V_{\lambda 10}$ humana (Williams S.C. et al. *J. Mol. Bio.* 264:220-232, 1996). En algunos casos que comprenden una cadena liviana kappa, el dominio variable de la cadena liviana (V_L) es codificado en parte por un gen de la familia V_{KI} , V_{KII} , V_{KIII} , V_{KIV} , V_{KV} , o V_{KVI} humano (Cox J. P. L., et al, *Eur. J. Immunol* 24:827-836, 1994), con preferencia un gen de la familia V_{KI} , V_{KII} , V_{KIII} , o V_{KIV} , y con preferencia un gen de la familia V_{KI} o V_{KVI} humana. En algunos casos, la secuencia de cadena liviana de línea germinal se selecciona de las secuencias de human VK que incluyen, sin limitaciones, A1, A10, A11, A14, A17, A18, A19, A2, A20, A23, A26, A27, A3, A30, A5, A7, B2, B3, L1, L10, L11, L12, L14, L15, L16, L18, L19, L2, L20, L22, L23, L24, L25, L4/18a, L5, L6, L8, L9, O1, O11, O12, O14, O18, O2, O4 y O8. En ciertos casos, este marco de línea germinar de cadena liviana humana se selecciona de V1-11, V1-13, V1-16, V1-17, V1-18, V1-19, V1-2, V1-20, V1-22, V1-3, V1-4, V1-5, V1-7, V1-9, V2-1, V2-11, V2-13, V2-

14, V2-15, V2-17, V2-19, V2-6, V2-7, V2-8, V3-2, V3-3, V3-4, V4-1, V4-2, V4-3, V4-4, V4-6, V5-1, V5-2, V5-4 y V5-6. Un anticuerpo anti-IL-6 puede comprender un dominio variable de la cadena pesada (V_H) codificado por un gen de la familia de V_{H1} , V_{H2} , V_{H3} , V_{H4} , V_{H5} , V_{H6} o V_{H7} humana. En ejemplos particulares, este marco de línea germinal de cadena pesada humana se selecciona de V_{H1-18} , V_{H1-2} , V_{H1-24} , V_{H1-3} , V_{H1-45} , V_{H1-46} , V_{H1-58} , V_{H1-69} , V_{H1-8} , V_{H2-26} , V_{H2-5} , V_{H2-70} , V_{H3-11} , V_{H3-13} , V_{H3-15} , V_{H3-16} , V_{H3-20} , V_{H3-21} , V_{H3-23} , V_{H3-30} , V_{H3-33} , V_{H3-35} , V_{H3-38} , V_{H3-43} , V_{H3-48} , V_{H3-49} , V_{H3-53} , V_{H3-64} , V_{H3-66} , V_{H3-7} , V_{H3-72} , V_{H3-73} , V_{H3-74} , V_{H3-9} , V_{H4-28} , V_{H4-31} , V_{H4-34} , V_{H4-39} , V_{H4-4} , V_{H4-59} , V_{H4-61} , V_{H5-51} , V_{H6-1} , y V_{H7-81} . En casos particulares, la región variable de la cadena liviana y/o la región variable de la cadena pesada comprenden una región de marco o al menos una porción de una región de marco (por ejemplo, que contiene 2 o 3 subregiones, tales como FR2 y FR3). En ciertos casos, al menos FRL1, FRL2, FRL3, o FRL4 es totalmente humano. En otros ejemplos, al menos FRH1, FRH2, FRH3, o FRH4 es totalmente humano. En algunos casos, al menos FRL1, FRL2, FRL3, o FRL4 es una secuencia de línea germinal (por ejemplo, una línea germinal humana) o comprende secuencias de consenso humanas para el marco particular (disponible fácilmente en las fuentes de secuencias de Ig humana descritas en la presente). En otros ejemplos, al menos FRH1, FRH2, FRH3, o FRH4 es una secuencia de línea germinal (por ejemplo, línea germinal humana) o comprende secuencias de consenso humanas para el marco particular.

[0147] La V_L del anticuerpo IL-6 puede comprender una o más sustituciones de aminoácidos relativas a la secuencia de línea germinal de aminoácidos del gen humano. En algunos

casos, la V_L del anticuerpo IL-6 comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 sustituciones de aminoácidos respecto de la secuencia de línea germinal de aminoácidos. En un ejemplo, uno o más de dichas sustituciones de la línea germinal está en las regiones de CDR de la cadena liviana. En un ejemplo, las sustituciones de aminoácido relativas a la línea germinal están en una o más de las mismas posiciones que las sustituciones relativas a la línea germinal en cualquiera de una o más de las V_L de los anticuerpos IgG1 9C8, IgG2 9C8, IgG1 9C8 N68T T83S, IgG2 9C8 N68T T83S, IgG1 9C8 E31G N68T T83S, IgG2 9C8 E31G N68T T83S, IgG1 9C8 I24V N68T T83S, IgG2 9C8 I24V N68T T83S e IgG1 22B5. Por ejemplo, la V_L de un anticuerpo IL-6 puede contener una o más sustituciones de aminoácidos comparado con la línea germinal hallada en la V_L del anticuerpo IgG1 9C8. En algunos casos, los cambios de aminoácidos están en una o más de las mismas posiciones, pero incluyen una sustitución diferente que en el anticuerpo de referencia.

[0148] En algunos casos, los cambios de aminoácidos relativos a la línea germinar ocurren en una o más de las mismas posiciones que en cualquiera de las V_L de los anticuerpos IgG1 9C8, IgG2 9C8, IgG1 9C8 N68T T83S, IgG2 9C8 N68T T83S, IgG1 9C8 E31G N68T T83S, IgG2 9C8 E31G N68T T83S, IgG1 9C8 I24V N68T T83S, IgG2 9C8 I24V N68T T83S e IgG1 22B5, pero los cambios pueden representar sustituciones conservadoras de aminoácidos en dichas posiciones respecto del aminoácido en el anticuerpo de referencia. Por ejemplo si una posición particular en uno de estos anticuerpos se modifica respecto de la línea germinal y es glutamato, se puede sustituir aspartato en dicha posición. De modo similar, si una sustitución de aminoácido comparado con la línea germinal es serina, es

posible sustituir conservadoramente treonina por serina en dicha posición.

[0149] En algunos casos, la cadena liviana del anticuerpo anti-IL-6 humano comprende la secuencia de aminoácidos V_L de anticuerpo IgG1 9C8, IgG2 9C8, IgG1 9C8 N68T T83S, IgG2 9C8 N68T T83S, IgG1 9C8 E31G N68T T83S, IgG2 9C8 E31G N68T T83S, IgG1 9C8 I24V N68T T83S, IgG2 9C8 I24V N68T T83S e IgG1 22B5 o la secuencia de aminoácidos que tiene hasta 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos y/o un total de hasta 3 sustituciones no conservadoras de aminoácidos. En algunos casos, la cadena liviana comprende la secuencia de aminoácidos desde el comienzo de CDR1 hasta el fin de CDR3 de cualquiera de los anticuerpos anteriores.

[0150] En algunos casos, la cadena liviana puede comprender las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 seleccionadas independientemente de la cadena liviana CDR1, CDR2 y CDR3, respectivamente, de la cadena liviana de anticuerpos IgG1 9C8, IgG2 9C8, IgG1 9C8 N68T T83S, IgG2 9C8 N68T T83S, IgG1 9C8 E31G N68T T83S, IgG2 9C8 E31G N68T T83S, IgG1 9C8 I24V N68T T83S, IgG2 9C8 I24V N68T T83S e IgG1 22B5, o las regiones CDR que tienen cada una menos de 4 o menos de 3 sustituciones conservadoras de aminoácidos y/o un total de tres o menos sustituciones no conservadoras de aminoácidos. En algunos casos, la cadena liviana del anticuerpo anti-IL-6 comprende una cadena liviana CDR1, CDR2, y CDR3, cada una de las cuales se selecciona independientemente de las regiones de la cadena liviana CDR1, CDR2 y CDR3 de anticuerpo monoclonal IgG1 9C8, IgG2 9C8, IgG1 9C8 N68T T83S, IgG2 9C8 N68T T83S, IgG1 9C8 E31G N68T T83S, IgG2 9C8 E31G N68T T83S, IgG1 9C8 I24V N68T T83S, IgG2 9C8 I24V N68T T83S e IgG1 22B5. En ciertos casos, la cadena liviana del

anticuerpo anti-IL-6 comprende las regiones de la cadena liviana CDR1, CDR2 y CDR3 de un anticuerpo que comprende la secuencia de aminoácidos de la región V_L de un anticuerpo seleccionado de IgG1 9C8, IgG2 9C8, IgG1 9C8 N68T T83S, IgG2 9C8 N68T T83S, IgG1 9C8 E31G N68T T83S, IgG2 9C8 E31G N68T T83S, IgG1 9C8 I24V N68T T83S, IgG2 9C8 I24V N68T T83S e IgG1 22B5 o las regiones de CDR que tienen cada una menos de 4 o menos de 3 sustituciones conservadoras de aminoácidos y/o un total de tres o menos sustituciones no conservadoras de aminoácidos.

[0151] En algunos casos, se codifica el dominio variable (V_H), al menos en parte, mediante un gen humano. En algunos casos, la secuencia V_H del anticuerpo IL-6 contiene una o más sustituciones de aminoácidos, deleciones o inserciones (adiciones) respecto de la secuencia de línea germinal de aminoácidos. En algunos casos, el dominio variable de la cadena pesada comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 ó 17 mutaciones respecto de la secuencia de línea germinal de aminoácidos. En algunos casos, las mutaciones son sustituciones, deleciones o inserciones, comparadas con secuencia de aminoácidos de línea germinal. En algunos ejemplos, las mutaciones están en las regiones CDR de la cadena pesada. En algunos ejemplos, los cambios de aminoácidos se realizan en una o más de las mismas posiciones que las mutaciones respecto de la línea germinal en una cualquiera o más de las V_H de los anticuerpos IgG1 9C8, IgG2 9C8, IgG1 9C8 N68T T83S, IgG2 9C8 N68T T83S, IgG1 9C8 E31G N68T T83S, IgG2 9C8 E31G N68T T83S, IgG1 9C8 I24V N68T T83S, IgG2 9C8 I24V N68T T83S e IgG1 22B5. En otros ejemplos, los cambios de aminoácidos están en una o más de las mismas posiciones pero incluyen una mutación diferente que en el anticuerpo de referencia.

[0152] En algunos casos, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos V_H de los anticuerpos IgG1 9C8, IgG2 9C8, IgG1 9C8 N68T T83S, IgG2 9C8 N68T T83S, IgG1 9C8 E31G N68T T83S, IgG2 9C8 E31G N68T T83S, IgG1 9C8 I24V N68T T83S, IgG2 9C8 I24V N68T T83S e IgG1 22B5, en donde las secuencias de aminoácidos V_H tienen hasta 1, 2, 3, 4, 6, 8 ó 10 sustituciones conservadoras de aminoácidos y/o un total de hasta 3 sustituciones no conservadoras de aminoácidos. En algunos ejemplos, la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácidos del comienzo de la CDR1 hasta el final de la CDR3 de cualquiera de los anticuerpos anteriores.

[0153] En algunos casos, la cadena pesada comprende las regiones de la cadena pesada CDR1, CDR2 y CDR3 de los anticuerpos IgG1 9C8, IgG2 9C8, IgG1 9C8 N68T T83S, IgG2 9C8 N68T T83S, IgG1 9C8 E31G N68T T83S, IgG2 9C8 E31G N68T T83S, IgG1 9C8 I24V N68T T83S, IgG2 9C8 I24V N68T T83S e IgG1 22B5 o las regiones CDR que tienen cada una menos de 8, menos de 6, menos de 4, o menos de 3 sustituciones conservadoras de aminoácidos y/o un total de tres o menos sustituciones no conservadoras de aminoácidos.

[0154] En algunos casos, las regiones de la cadena pesada CDR se seleccionan independientemente de las regiones CDR de los anticuerpos IgG1 9C8, IgG2 9C8, IgG1 9C8 N68T T83S, IgG2 9C8 N68T T83S, IgG1 9C8 E31G N68T T83S, IgG2 9C8 E31G N68T T83S, IgG1 9C8 I24V N68T T83S, IgG2 9C8 I24V N68T T83S e IgG1 22B5. En otros casos, la cadena pesada comprende regiones CDR seleccionadas independientemente de dos o más regiones V_H seleccionadas de IgG1 9C8, IgG2 9C8, IgG1 9C8 N68T T83S, IgG2 9C8 N68T T83S, IgG1 9C8 E31G N68T T83S, IgG2 9C8 E31G N68T T83S,

IgG1 9C8 I24V N68T T83S, IgG2 9C8 I24V N68T T83S e IgG1 22B5.

[0155] En otros casos, el anticuerpo comprende una cadena liviana y una cadena pesada. En otro ejemplo, la cadena liviana de CDR y la cadena pesada de CDR provienen del mismo anticuerpo.

[0156] Un tipo de sustitución de aminoácido que se puede hacer consiste en cambiar una o más cisteínas en el anticuerpo, el cual puede ser químicamente reactivo, a otro residuo, tal como, sin limitación, alanina o serina. En un ejemplo, hay una sustitución de una cisteína no canónica. La sustitución se puede hacer en una región de CDR o de marco de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. En algunos casos, la cisteína es canónica.

[0157] Otro tipo de sustitución de aminoácido que se puede hacer consiste en cambiar cualquier posible sitio proteolítico en el anticuerpo. Dichos sitios pueden aparecer en una región CDR o de marco de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. La sustitución de los residuos de cisteína y la remoción de los sitios proteolíticos pueden disminuir el riesgo de cualquier heterogeneidad en el producto del anticuerpo y en consecuencia incrementa su homogeneidad. Otro tipo de sustitución de aminoácido consiste en eliminar los pares de asparagina-glicina, los cuales forman posibles sitios de desamidación, al alterar uno o ambos residuos.

[0158] En ciertos casos, las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos IL-6 opcionalmente pueden incluir una secuencia señal.

[0159] En algunos casos, el anticuerpo comprende las variantes de cadenas pesadas y livianas de anticuerpos monoclonales IgG1 9C8, IgG2 9C8, IgG1 9C8 N68T T83S, IgG2

9C8 N68T T83S, IgG1 9C8 E31G N68T T83S, IgG2 9C8 E31G N68T T83S, IgG1 9C8 I24V N68T T83S, IgG2 9C8 I24V N68T T83S e IgG1 22B5. Tal como se analizó con mayor detalle en el EJEMPLO 3, se realizaron numerosas variantes de mutaciones de cadena pesada y liviana para coincidir los de las regiones CDR de la línea germinal. Los aminoácidos específicos que se mutaron para obtener las versiones de la línea germinal son aparentes para los expertos en la técnica, al comparar las secuencias de la línea germinal vs. un anticuerpo no de la línea germinal. Por ejemplo, una sustitución de aminoácido se provee en la cadena pesada del anticuerpo 9C8, en donde se cambia una isoleucina en el residuo 24 a valina y se refiere como 9C8 I24V. Un segundo ejemplo de sustitución de aminoácido consiste en la cadena liviana de anticuerpo 9C8, y sustituye la lisina en el residuo 92 por una asparagina y se refiere como 9C8 K92N.

[0160] Tal como se apreciará, el análisis de utilización génica provee sólo una visión general limitada de la estructura del anticuerpo. Dado que las células B humanas generan estocásticamente transcripciones de cadenas pesadas V-D-J o cadenas livianas kappa V-J, hay numerosos procesos secundarios que ocurren incluso sin limitación, hipermutación somática, adiciones, y extensiones de CDR3. En consecuencia, para examinar mejor las estructuras de los anticuerpos, se generaron secuencias de aminoácidos previstas de los anticuerpos a partir de los cADN obtenidos de los clones. Además, se obtuvieron secuencias de aminoácidos N-terminales mediante determinación de las secuencias de proteínas.

Clases y subclases de anticuerpos anti-IL-6

[0161] La clase (por ejemplo, IgG, IgM, IgE, IgA, o IgD) y la subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4) de anticuerpos IL-6 se pueden determinar por cualquier método adecuado. En general, la clase y la subclase de un anticuerpo se puede determinar mediante el uso de anticuerpos que son específicos para una clase y una subclase específica de anticuerpo. Dichos anticuerpos están disponibles en el comercio. La clase y la subclase se pueden determinar por ELISA, o Western Blot, así como otras técnicas.

[0162] Alternativamente, la clase y la subclase se pueden determinar mediante la determinación de secuencia de la totalidad o una porción de los dominios constantes de las cadenas pesadas y/o livianas de los anticuerpos, comparar sus secuencias de aminoácidos con las secuencias de aminoácidos conocidas de diversas clases y subclases de inmunoglobulinas, y determinar la clase y la subclase de los anticuerpos. Los anticuerpos IL-6 pueden ser una molécula de IgG, de IgM, de IgE, de IgA, o de IgD. Por ejemplo, los anticuerpos IL-6 pueden ser una IgG que es una subclase de IgG1, IgG2, IgG3, o IgG4. En un ejemplo, los anticuerpos IL-6 son de subclase IgG2. En otro ejemplo, los anticuerpos IL-6 son de subclase IgG1.

[0163] En un aspecto, se proveen métodos para convertir la clase o subclase de un anticuerpo IL-6 en otra clase o subclase. En algunos casos, se aísla una molécula de ácido nucleico que codifica una V_L o V_H que no incluye secuencias que codifican C_L o C_H mediante el uso de cualquier método adecuado. La molécula de ácido nucleico luego está ligada operativamente a una secuencia de ácido

nucleico que codifica una C_L o C_H a partir de una clase o subclase de inmunoglobulina deseada. Esto se puede lograr mediante el uso de un vector o una molécula de ácido nucleico que comprende una cadena C_L o C_H , tal como se describió con anterioridad. Por ejemplo, un anticuerpo IL-6 que originalmente era IgM se puede cambiar de clase a una IgG. Además, se puede usar el cambio de clase para convertir una subclase de IgG en otra, por ejemplo, de IgG1 a IgG2. Otro método para producir un anticuerpo que comprende un isotipo deseado comprende las etapas de aislar un ácido nucleico que codifica una cadena pesada de un anticuerpo IL-6 y un ácido nucleico que codifica una cadena liviana de un anticuerpo IL-6, el aislamiento de la secuencia que codifica la región V_H , la ligadura de la secuencia V_H a una secuencia que codifica un dominio constante de una cadena pesada del isotipo deseado, la expresión del gen de la cadena liviana y la construcción de la cadena pesada en una célula, y recolectar el anticuerpo IL-6 con el isotipo deseado.

Afinidad de unión de los anticuerpos IL-6 a IL-6

[0164] La afinidad de unión y la tasa de disociación de un anticuerpo anti-IL-6 a IL-6 se pueden determinar por cualquier método adecuado. La afinidad de unión se puede medir por ELISA, RIA, citometría de flujo, y resonancia de plasmón de superficie, tales como BIACORE™. La tasa de disociación se puede medir por resonancia de plasmón de superficie. Se puede determinar si un anticuerpo tiene sustancialmente la misma K_D como anticuerpo anti-IL-6 mediante el uso de cualquier método adecuado. El Ejemplo 7

ejemplifica un método para determinar las constantes de afinidad de los anticuerpos monoclonales anti-IL-6.

Identificación de epitopos IL-6 reconocidos por los anticuerpos anti-IL-6

[0165] Se puede determinar si un anticuerpo se fija al mismo epitopo o compete en forma cruzada por la unión con un anticuerpo IL-6 mediante el uso de cualquier método adecuado. En un ejemplo, se permite que un anticuerpo IL-6 se fije a IL-6 en condiciones de saturación y luego se mide la capacidad para estudiar el anticuerpo que se fija a IL-6. Si el anticuerpo de prueba se puede fijar a IL-6 al mismo tiempo que el anticuerpo IL-6, entonces el anticuerpo de prueba se fija a un epitopo diferente al anticuerpo IL-6. Sin embargo, si el anticuerpo de prueba no es capaz de fijarse a IL-6 al mismo tiempo, entonces el anticuerpo de prueba se fija al mismo epitopo, un epitopo superpuesto, o un epitopo que está en estrecha proximidad con el epitopo fijado por el anticuerpo IL-6 humano. Este experimento se puede realizar mediante el uso de ELISA, RIA, BIACORE™, o citometría de flujo (FACS).

[0166] A fin de analizar si un anticuerpo IL-6 compete en forma cruzada con otro anticuerpo IL-6, se puede usar el método de competencia descrito en la presente en dos direcciones, es decir, determinar si el anticuerpo de referencia bloquea el anticuerpo de prueba y viceversa. En un ejemplo, el experimento se realiza mediante ELISA.

Métodos para producir anticuerpos

[0167] Los anticuerpos IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes se pueden producir por diversas técnicas, incluso por metodología convencional de anticuerpos monoclonales, por ejemplo la técnica estándar de hibridación de células somáticas de Kohler y Milstein (1975) *Nature* 256: 495. También se pueden emplear otras técnicas para producir anticuerpos monoclonales tales como transformación viral u oncogénica de los linfocitos B.

[0168] Un ejemplo de sistema animal para preparar hibridomas es un sistema murino. Los protocolos de inmunización y las técnicas para el aislamiento de los esplenocitos inmunizados para la fusión se conocen en la técnica. También se conocen los compañeros de fusión (por ejemplo, células de mieloma murino) y los procedimientos de fusión.

[0169] Los anticuerpos quiméricos y humanizados se pueden preparar sobre la base de la secuencia de un anticuerpo monoclonal murino preparado tal como se describió con anterioridad. Los ADN que codifican las cadenas pesadas y livianas de las inmunoglobulinas se pueden obtener a partir del hibridoma murino de interés y se preparan por ingeniería para contener secuencias de inmunoglobulina no murinas (por ejemplo, humanas) que utilizan técnicas estándar de biología molecular. Por ejemplo, para crear un anticuerpo quimérico, las regiones variables murinas se pueden ligar a regiones constantes humanas mediante el uso de métodos conocidos en la técnica (ver por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N.º 4.816.567 de Cabilly et al.). Para crear un anticuerpo humanizado, las regiones CDR murinas se pueden insertar en un marco humano mediante los métodos conocidos en la técnica (ver por ejemplo, la patente de los Estados Unidos

Nros. 5.225.539, y las patentes de los Estados Unidos Nros. 5.530.101; 5.585.089; 5.693.762; y 6.180.370).

[0170] En un caso, los anticuerpos anti-IL-6 son anticuerpos monoclonales humanos. Dichos anticuerpos monoclonales humanos dirigidos contra IL-6 se pueden generar mediante el uso de ratones transgénicos o transcromosómicos portadores de partes de un sistema inmune humano más que en sistema de ratón. Estos ratones transgénicos y transcromosómicos incluyen ratones referidos en la presente como HuMAb Mouse[®] y KM Mouse[®], respectivamente, y en conjunto se refieren en la presente como "ratones Ig humanos".

[0171] El HuMAb Mouse[®] (Medarex[®], Inc.) contiene los miniloci de genes de inmunoglobulina humana que codifican las secuencias de inmunoglobulinas de cadenas pesadas (μ y γ) y κ de cadena liviana no organizadas, junto con mutaciones dirigidas que inactivan los loci de cadenas μ y κ endógenos (ver por ejemplo, Lonberg, et al. (1994) *Nature* 368(6474): 856-859). En consecuencia, los ratones exhiben la expresión reducida de IgM o κ murino, y en response a la inmunización, los transgenes de cadena pesada y de cadena liviana humana introducidas sufren variación de clase y mutación somática a fin de generar IgG κ monoclonal humano de alta afinidad (Lonberg, N. et al. (1994); revisado por Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101; Lonberg, N. y Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93, y Harding, F. y Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764:536-546). La preparación y el uso de HuMAb Mouse[®], y las modificaciones genómicas portadas por dichos ratones también se describen en Tailor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuailon et al.

(1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:3720-3724; Choi et al. (1993) *Nature Genetics* 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) *EMBO J.* 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) *J. Immunol.* 152:2912-2920; Tailor, L. et al. (1994) *International Immunology* 6: 579-591; y Fishwild, D. et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851, cuyos contenidos se incorporan específicamente por referencia en su totalidad. Ver también, las patentes de los Estados Unidos Nros. 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; 5.789.650; 5.877.397; 5.661.016; 5.814.318; 5.874.299; y 5.770.429; patente de los Estados Unidos Nros. 5.545.807; Publicaciones de PCT Nros. WO 92/03918, WO 93/12227, WO 94/25585, WO 97/13852, WO 98/24884 y WO 99/45962; y publicación de PCT N.º WO 01/14424.

[0172] En otro aspecto, se pueden generar anticuerpos anti-IL-6 humanos mediante el uso de un ratón que porta las secuencias de inmunoglobulinas humanas sobre los transgenes y los transcromosomas, tales como un ratón que porta un transgén de cadena pesada humana y un transcromosoma de cadena liviana humana. Dichos ratones, referidos en la presente como "KM miceTM", se describen en detalle en la publicación de PCT N.º WO 02/43478.

[0173] Más aún, los sistemas alternativos de animales transgénicos que expresan genes de inmunoglobulina humanos están disponibles en la técnica y se pueden usar para generar anticuerpos IL-6. Por ejemplo, se puede usar un sistema transgénico alternativo referido como XenomouseTM (Abgenix, Inc.); dichos ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nros. 5.939.598; 6.075.181; 6.114.598; 6.150.584; y 6.162.963.

[0174] Más aún, están disponibles en la técnica sistemas alternativos de animales transcromosómicos que

expresan genes de inmunoglobulina humana y se pueden usar para generar anticuerpos IL-6. Por ejemplo, se pueden usar los ratones portadores de una cadena pesada transcromosómica humana y una cadena liviana transcromosómica humana, referidos como "ratones TC"; dichos ratones se describen en Tomizuka et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:722-727. Además, se han descrito en la técnica vacas portadoras de transcromosomas de cadenas pesada y liviana humanas (Kuroiwa et al. (2002) *Nature Biotechnology* 20:889-894) y se pueden usar para generar anticuerpos IL-6.

[0175] Los anticuerpos monoclonales también se pueden preparar mediante el uso de ratones SCID en los cuales se han reconstituido células inmunes humanas tales como una respuesta de anticuerpo humano que se puede generar luego de la inmunización. Dichos ratones se describen, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos Nros. 5.476.996; y 5.698.767.

Inmunización de ratones Ig humanos

[0176] Producción de anticuerpos y líneas celulares productoras de anticuerpo

[0177] Después de la inmunización de un animal con un antígeno IL-6, se pueden obtener anticuerpos y/o células productoras de anticuerpo del animal. En algunos casos, se obtiene el suero que contiene anticuerpo IL-6 del animal por sangrado o sacrificio del animal. El suero se puede usar tal como se obtiene del animal, una fracción de inmunoglobulina se puede obtener del suero, o los anticuerpos IL-6 se pueden purificar del suero.

[0178] En algunos casos, las líneas celulares inmortalizadas productoras de anticuerpo se preparan de células aisladas del animal inmunizado. Después de la inmunización, el animal se sacrifica y las células B de los ganglios linfáticos y/o esplénicas se immortalizan por cualquier medio conocido en la técnica. Los métodos para immortalizar las células incluyen, sin limitaciones, su transfección con oncogenes, su infección con un virus oncogénico y cultivarlas en condiciones que seleccionan las células inmortalizadas, someterlas a compuestos carcinogénicos o mutantes, fusionarlas con una célula inmortalizada, por ejemplo, una célula de mieloma, e inactivar un gen supresor de tumor. Si se usa la fusión con células de mieloma, las células de mieloma con preferencia no secretan polipéptidos de inmunoglobulina (una línea celular no secretora). Las células inmortalizadas se analizan mediante el uso de IL-6, una de sus porciones, o una célula que expresa IL-6. En algunos casos, el análisis inicial se realiza mediante el uso de un inmunoensayo ligado a enzima (ELISA) o un radioinmunoensayo. Un ejemplo de análisis por ELISA se provee en la publicación de PCT N.º WO 00/37504, incorporada en la presente por referencia.

[0179] Las células productoras de anticuerpo IL-6, por ejemplo, hibridomas, se seleccionan, clonan y luego se analizan respecto de las características deseables, incluso crecimiento fuerte, elevada producción de anticuerpo y características de anticuerpo deseables. Los hibridomas se pueden expandir in vivo en animales singeneicos, en animales carentes de un sistema inmune, por ejemplo, ratones desnudos, o en cultivos celulares in vitro. Los métodos de selección, clonación y expansión de hibridomas son bien conocidos por los expertos en la técnica.

[0180] En un ejemplo, el animal inmunizado es un animal no humano que expresa los genes de inmunoglobulina humana y las células B esplénicas se fusionan a una línea de células de mieloma proveniente de la misma especie como animal no humano. Uno de dichos animales inmunizados es un ratón Kirin TC MouseTM y la línea celular de mieloma es un mieloma murino no secretor. En otro ejemplo, la línea celular de mieloma es Sp2/O-Ag14 (American Type Culture Collection (ATCC) CRL-1581).

[0181] También se proveen métodos para producir una línea celular que produce un anticuerpo monoclonal humano o sus porciones fijadoras de antígeno dirigidas a la IL-6 que comprenden: (a) inmunizar un animal transgénico humano descrito en la presente con IL-6, una porción de IL-6 o una células o tejido que expresa IL-6; (b) permitir que el animal transgénico monte una respuesta inmune a IL-6; (c) aislar las células productoras de anticuerpo provenientes del animal transgénico; (d) immortalizar las células productoras de anticuerpo; (e) crear poblaciones monoclonales individuales de las células productoras de anticuerpo immortalizadas; y (f) analizar las células productoras de anticuerpo immortalizadas a fin de identificar un anticuerpo dirigido a IL-6.

[0182] En otro aspecto, se proveen hibridomas que producen un anticuerpo IL-6 humano. El anticuerpo IL-6 humano producido por el hibridoma puede ser un antagonista de IL-6. Los hibridomas pueden ser producidos en una especie no humana, no murina tal como, por ejemplo, ratas, ovejas, cerdos, cabras, vacunos o caballos.

[0183] En un caso, las células productoras de anticuerpo se aíslan y expresan en una célula huésped, por ejemplo células de mieloma. En aún otro ejemplo, un animal

transgénico se inmuniza con IL-6, se aíslan las células primarias (por ejemplo, células de bazo o de sangre periférica) de un animal transgénico inmunizado y se identifican las células individuales productoras de anticuerpos específicos para el antígeno deseado. El mRNA poliadenilado de cada célula individual se aísla y se realiza la reacción de cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) mediante el uso de cebadores con sentido que se unen a las secuencias de región variable, por ejemplo, cebadores degenerados que reconocen la mayoría o la totalidad de las regiones FR1 de los genes de la región variable de las cadenas pesadas y livianas humanas y los cebadores antisentido que se unen a las secuencias de la región constante o de unión. Luego se clonan los cADN de los dominios variables de cadena pesada y liviana y se expresan en cualquier célula huésped adecuada, por ejemplo, una célula de mieloma, como anticuerpos quiméricos con regiones constantes de las respectivas inmunoglobulinas, tales como los dominios constantes de cadena pesada y κ o λ . Ver Babcook, J. S. et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 7843-48, incorporadas en la presente por referencia. Luego los anticuerpos IL-6 se pueden identificar y aislar.

Métodos recombinantes para producir anticuerpos

[0184] Los anticuerpos IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes se pueden preparar por la expresión recombinante de los genes de las cadenas pesada y liviana de inmunoglobulina en una célula huésped. Por ejemplo, para expresar un anticuerpo en forma recombinante, una célula huésped se transfecta con uno o más vectores de expresión recombinantes portadores de fragmentos de ADN que

codifican las cadenas pesadas y livianas de la inmunoglobulina del anticuerpo de manera tal que las cadenas pesadas y livianas se expresan en la célula huésped y, con preferencia, son secretadas al medio en el cual se cultivan las células huésped, a partir de los cuales se pueden recuperar los anticuerpos. Se usan diversas metodologías de ADN recombinante para obtener genes de las cadenas pesadas y livianas del anticuerpo, a fin de incorporar estos genes en vectores de expresión recombinantes y para introducir los vectores en células huésped, tales como las descritas en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds), *Molecular Cloning; A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F. M. et al. (eds.) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates, (1989) y en la patente de los Estados Unidos N.º 4.816.397, cuyas descripciones se incorporan en la presente por referencia.

[0185] Mutaciones y Modificaciones

[0186] Para expresar los anticuerpos IL-6, se pueden obtener primero los fragmentos de ADN que codifican las regiones V_H y V_L mediante el uso de cualquiera de los métodos analizados en la presente. También se pueden introducir diversas mutaciones, deleciones, y/o adiciones can en las secuencias de ADN que utilizan diversos métodos adecuados. Por ejemplo, la mutagénesis se puede realizar mediante el uso de métodos estándar, tales como mutagénesis mediada por PCR, en los cuales los nucleótidos mutados se incorporan en los cebadores de PCR tales como el producto PCR contienen las mutaciones deseadas o la mutagénesis dirigida a sitio. Un tipo de sustitución, por ejemplo, que se puede hacer es el cambio de una o más cisteínas en el

anticuerpo, el cual puede ser químicamente reactivo, por otro residuo, tal como, sin limitación, alanina o serina. Por ejemplo, puede haber una sustitución de una cisteína no canónica o canónica. La sustitución se puede hacer en una región CDR o de marco de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. Los anticuerpos también se pueden mutar en los dominios variables de las cadenas pesadas y/o livianas, por ejemplo, con el fin de alterar una propiedad de unión del anticuerpo. Por ejemplo, se puede hacer una mutación en una o más de las regiones CDR para incrementar o disminuir la K_D del anticuerpo para IL-6, a fin de incrementar o disminuir k_{off} , o para alterar la especificidad de unión del anticuerpo. Las técnicas en la mutagénesis dirigida a sitio incluyen, por ejemplo, Sambrook et al. y Ausubel et al., las cuales se incorporan en la presente por referencia.

[0187] También se puede hacer una mutación en una región de marco o dominio constante para incrementar la vida media de un anticuerpo IL-6. Ver, por ejemplo, la publicación de PCT N.º WO 00/09560, incorporada en la presente por referencia. También se puede hacer una mutación en una región marco o dominio constante para alterara la inmunogenicidad del anticuerpo, a fin de proveer un sitio para la unión covalente o no covalente a otra molécula, o para alterar propiedades tales como fijación de complemento, fijación de FcR y citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC). Un único anticuerpo puede tener mutaciones en uno cualquiera o más de las regions CDR o de marco del dominio variable o en el dominio constante.

[0188] En un proceso denominado "revestimiento germinal", ciertos aminoácidos de las secuencias V_H y V_L se

pueden mutar para coincidir con los hallados naturalmente en las secuencias V_H y V_L de la línea germinal. En particular, las secuencias de aminoácidos de las regiones marco de las secuencias V_H y V_L se pueden mutar para coincidir con las secuencias de líneas germinales fin de reducir el riesgo de inmunogenicidad cuando se administra el anticuerpo. Las secuencias de ADN de línea germinal para los genes de V_H y V_L humano se conocen en la técnica (ver por ejemplo, la base de datos de la secuencia de línea germinal "Vbase" humana; ver también Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación de NIH N.º 91-3242; Tomlinson et al. (1992) *J. Mol. Biol.* 227:776-798; y Cox et al. *Eur. J. Immunol.* 24:827-836 (1994); cuyos contenidos se incorporan en la presente por referencia).

[0189] Otro tipo de sustitución de aminoácido que se puede hacer consiste en extraer posibles sitios proteolíticos en el anticuerpo. Dichos sitios pueden aparecer en una región de CDR o marco de un dominio variable o en el dominio constante de un anticuerpo. La sustitución de residuos de cisteína y la remoción de sitios proteolíticos puede reducir el riesgo de heterogeneidad en el producto de anticuerpo y en consecuencia incrementar su homogeneidad. Otro tipo de sustitución de aminoácido consiste en eliminar los pares de asparagina-glicina, los cuales forman posibles sitios de desamidación, al alterar uno o ambos residuos. En otro ejemplo, la lisina C-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo IL-6 puede ser escindida. En diversos ejemplos, las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos IL-6 pueden incluir opcionalmente una secuencia señal. En algunos casos, la

lisina C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo anti-IL-6 puede ser escindida proteolíticamente.

[0190] Una vez obtenidos los fragmentos de ADN que codifican los segmentos V_H y V_L , estos fragmentos de ADN también se pueden manipular mediante técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo para convertir los genes de la región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud total, en genes de fragmento Fab, o a un gen scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica V_L o V_H está ligado operativamente a otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tales como una región de anticuerpo constante o un ligador flexible. La expresión "ligado operativamente", tal como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen de manera tal que las secuencias de aminoácidos codificados por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco.

[0191] El ADN aislado que codifica la región V_H se puede convertir en un gen de cadena pesada de longitud total al ligar operativamente los ADN que codifican V_H con otras moléculas de ADN que codifican regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de los genes de la región constante de la cadena pesada se conocen en la técnica (ver por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación de NIH N.º 91-3242) y fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación estándar por PCR. La región constante de la cadena pesada puede ser una región constante de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero con máxima preferencia es una región constante de IgG1 o IgG2. La secuencia de región constante de IgG1 puede ser

cualquiera de diversos alelos o alotipos de los cuales se sabe que ocurren entre diferentes individuales, tales como Gm(1), Gm(2), Gm(3), y Gm(17). Estos alotipos representan la sustitución de aminoácidos naturales en las regiones constantes de IgG1. Para un gen de cadena pesada de fragmento Fab, el ADN que codifica V_H puede estar ligado operativamente a otra molécula de ADN que codifica sólo la región constante de la cadena pesada CH1. La región constante de la cadena pesada CH1 se puede derivar de cualquiera de los genes de la cadena pesada.

[0192] El ADN aislado que codifica la región V_L se puede convertir en un gen de cadena liviana de longitud total (así como un gen de cadena liviana de Fab) a través de la unión operativa del ADN que codifica el V_L con otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena liviana, C_L . Las secuencias de genes de región constante de la cadena liviana humana se conocen en la técnica (ver por ejemplo, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta Edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Publicación de NIH N.º 91-3242) y los fragmentos de ADN que abarcan estas regiones se pueden obtener mediante amplificación estándar por PCR. La región constante de la cadena liviana puede ser una región constante kappa o lambda. La región constante kappa puede ser cualquiera de los diversos alelos conocidos por aparecer entre diferentes individuos, tales como Inv(1), Inv(2), y Inv(3). La región constante lambda puede ser derivada a partir de cualquiera de los tres genes lambda.

[0193] Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican V_H y V_L están ligados operativamente a otro fragmento que codifica un ligador flexible, por ejemplo,

que codifica la secuencia de aminoácidos (Glu₄-Ser)₃, de manera tal que las secuencias V_H y V_L se pueden expresar como proteína de cadena única continua, con las regiones V_L y V_H unidas por el ligador flexible (ver por ejemplo, Bird et al. *Science* 242:423-426 (1988); Huston et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990)). El anticuerpo de cadena única puede ser monovalente, si solo se usa una única V_H y V_L, bivalente, si se usan dos V_H y V_L, o polivalente, si se usan más de dos V_H y V_L. Se pueden generar anticuerpos biespecíficos o polivalentes que se fijan específicamente a IL-6 y a otra molécula.

[0194] En otro caso, se puede preparar un anticuerpo de fusión que comprende la totalidad o una porción de un anticuerpo IL-6 ligado a otro polipéptido. En otro caso, solo los dominios variables del anticuerpo IL-6 están ligados al polipéptido. En otros caso, el dominio V_H de un anticuerpo IL-6 está ligado a un primer polipéptido, mientras que el dominio V_L de un anticuerpo IL-6 está ligado a un segundo polipéptido que se asocia con el primer polipéptido en una forma tal que los dominios V_H y V_L pueden interactuar entre sí para formar un sitio de fijación de un antígeno. En otro caso, el dominio V_H está separado del dominio V_L por un ligador de manera tal que los dominios V_H y V_L pueden interactuar entre sí. El anticuerpo V_L ligador de V_H luego se liga al polipéptido de interés. Además, se pueden crear anticuerpos de fusión en los cuales dos (o más) anticuerpos de cadena única están ligados entre sí. Es útil si se desea crear un anticuerpo divalente o polivalente en una cadena de polipéptido único, o si se desea crear un anticuerpo biespecífico.

[0195] En otros casos, se pueden preparar otros anticuerpos modificados mediante el uso del anticuerpo IL-6 que codifica moléculas de ácido nucleico. Por ejemplo, se pueden preparar los "cuerpos Kappa" (Ill et al., *Protein Eng.* 10: 949-57 (1997)), "minicuerpos" (Martin et al., *EMBO J.* 13: 5303-9 (1994)), "Diacuerpos" (Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)), o "Janusinas" (Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991) y Traunecker et al., *Int. J. Cancer* (Supl.) 7:51-52 (1992)) mediante el uso de técnicas biológicas moleculares adecuadas según las técnicas analizadas en la presente.

[0196] Los anticuerpos biespecíficos o los fragmentos fijadores de antígeno se pueden producir por diversos métodos que incluyen la fusión de hibridomas o ligar los fragmentos Fab. Ver, por ejemplo, Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990), Kostelny et al., *J. Immunol.* 148:1547-1553 (1992). Además, se pueden formar anticuerpos biespecíficos como "diacuerpos" o "Janusinas." En algunos casos, el anticuerpo biespecífico se fija a dos epitopos diferentes de IL-6. En algunos casos, los anticuerpos modificados descritos en la presente se preparan mediante el uso de uno o más de los dominios variables o las regiones CDR de un anticuerpo IL-6 humano.

Vectores y células huésped

[0197] Para expresar los anticuerpos IL-6 y sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes, los ADN que codifican cadena pesadas y livianas de longitud parcial o total, obtenidas tal como se describe en la presente, se insertan en vectores de expresión tales como los genes ligados operativamente a las secuencias control de la transcripción y la traducción. En este contexto, el término

“ligado operativamente” pretende significar que un gen de anticuerpo está ligado a un vector tal que las secuencias control de transcripción y traducción dentro del vector cumplen con su función pretendida de regular la transcripción y la traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para ser compatibles con la expresión de la célula huésped usada. Los vectores de expresión incluyen, por ejemplo, plásmidos, retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus vegetales tales como virus mosaico de coliflor, virus mosaico de tabaco, cósmidos, YAC, y episómeros derivados de EBV. El gen de anticuerpo está ligado a un vector de manera tal que las secuencias control de la transcripción y la traducción dentro del vector cumplen su función pretendida de regular la transcripción y la traducción del gen del anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para ser compatibles con la expresión de la célula huésped usada. El gen de la cadena liviana de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo se pueden insertar en distintos vectores o ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes del anticuerpo se insertan en el vector de expresión por diversos métodos (por ejemplo, ligadura de sitios de restricción complementaria en el fragmento de gen de anticuerpo gene y vector, o ligadura de extremo romo ante la ausencia de sitios de restricción).

[0198] Un vector conveniente es el que codifica una secuencia funcionalmente completa C_H o C_L de inmunoglobulina completa, con sitios de restricción adecuados obtenidos por ingeniería de manera tal que cualquier secuencia V_H o V_L se puede insertar o expresar

con facilidad, tal como se describió con anterioridad. En dichos vectores, usualmente ocurre empalme entre el sitio donante del empalme en la región J insertada y el sitio aceptor del empalme que precede el dominio C humano, y también en las regiones de corte y empalme que se encuentran dentro de los exones C_H humanos. Ocurre poliadenilación y terminación de la transcripción en los sitios cromosómicos nativos corriente abajo respecto de las regiones codificadoras. El vector de expresión recombinante también puede codificar un péptido señal que facilita la secreción de la cadena del anticuerpo de una célula huésped. El gen de la cadena del anticuerpo se puede clonar en el vector de manera tal que el péptido señal se liga dentro del marco al terminal amino de la cadena de la inmunoglobulina. El péptido señal heterólogo puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal (es decir, un péptido señal proveniente de una proteína no inmunoglobulina).

[0199] Además de los genes de la cadena del anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes portan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de la cadena del anticuerpo en una célula huésped. El diseño del vector de expresión, incluso la selección de las secuencias reguladoras puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que se transforma, el nivel de expresión de la proteína deseada. Las secuencias reguladoras para la expresión de la célula huésped de mamífero incluye elementos virales que dirigen los niveles elevados de la expresión de proteínas en las células de mamífero, tales como los promotores y/o mejoradores derivados de LTR retrovirales, citomegalovirus (CMV) (tales como el promotor/mejorador de CMV), el virus simiano 40

(SV40) (tales como el promotor/mejorador de SV40), adenovirus, (por ejemplo, el promotor tardío principal de adenovirus (AdMLP)), promotores de poliovirus y de mamífero fuertes tales como los promotores nativos de inmunoglobulina y de actina. Para la ulterior descripción de los elementos reguladores virales, y sus secuencias, ver por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N.º 5.168.062, la patente de los Estados Unidos N.º 4.510.245 y la patente de los Estados Unidos N.º 4.968.615, incorporadas en la presente por referencia. Los métodos para expresar los anticuerpos en plantas, incluso una descripción de los promotores y vectores, así como la transformación de plantas son conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N.º 6.517.529, incorporada en la presente por referencia.

[0200] Además de los genes de la cadena del anticuerpo y las secuencias reguladoras, los vectores de expresión recombinantes pueden portar secuencias adicionales, tales como las secuencias que regulan la replicación del vector en las células huésped (por ejemplo, orígenes de la replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la selección de las células huésped en las cuales se ha introducido el vector (ver por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nros. 4.399.216, 4.634.665 y 5.179.017, incorporadas en la presente por referencia). Por ejemplo, generalmente el gen del marcador seleccionable confiere resistencia a los fármacos tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la cual se ha introducido el vector. Los genes marcadores seleccionables incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para usar en células huésped dhfr con selección/amplificación de metotrexato), el gen de

neomicinafosfotransferasa (para la selección de G418), y el gen de glutamatosintetasa.

[0201] Las moléculas de ácido nucleico que codifican los anticuerpos IL-6 y los vectores que comprenden estas moléculas de ácido nucleico se pueden usar para la transfección de una célula huésped de un mamífero, planta, bacteria o levadura adecuada. La transformación puede ser cualquier método adecuado para introducir polinucleótidos en una célula huésped. Los métodos para la introducción de los polinucleótidos heterólogos en células de mamífero incluyen transfección mediada por dextrano, precipitación con fosfato de calcio, transfección mediada por polibreno, fusión de protoplasto, electroporación, encapsulación de los polinucleótidos en liposomas, y microinyección directa del ADN en los núcleos. Además, se pueden introducir moléculas de ácido nucleico en las células de mamífero mediante vectores virales. Los métodos para transformar las células son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, las patentes de los Estados Unidos Nros. 4.399.216, 4.912.040, 4.740.461 y 4.959.455, incorporadas en la presente por referencia). Los métodos para transformar las células vegetales son bien conocidos en la técnica, incluso, por ejemplo, transformación mediada por *Agrobacterium*, transformación biolística, inyección directa, electroporación y transformación viral. Los métodos de transformación de células bacterianas y de levaduras también son bien conocidos en la técnica.

[0202] Las líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión son bien conocidas en la técnica e incluyen muchas líneas celulares inmortalizadas disponibles de American Type Culture Collection (ATCC). Estas incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster

chino (CHO), células NSO, células SP2, células HEK-293T, células NIH-3T3, células HeLa, células de riñón de hámster bebé (BHK), células de riñón de mono verde africano (COS), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células A549, y numerosas otras líneas celulares. Las líneas celulares de particular preferencia se seleccionan por determinación de cuáles líneas celulares tienen mayores niveles de expresión. Otras líneas celulares que se pueden usar son líneas celulares de insectos, tales como células Sf9 o Sf21. Cuando los vectores de expresión recombinante que codifican los genes de anticuerpo son introducidos en las células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen por cultivo de las células huésped durante un periodo suficiente para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped o, con mayor preferencia, la secreción del anticuerpo al medio de cultivo en el cual se cultivan las células huésped. Los anticuerpos se pueden recuperar del medio de cultivo mediante el uso de diversos métodos de purificación de proteínas. Las células huésped bacterianas incluyen *E. coli* y especies de *Streptomyces*. Las células huésped de levaduras incluyen *Schizosaccharomyces pombe*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Pichia pastoris*.

[0203] Además, la expresión de los anticuerpos por parte de las líneas celulares de producción se puede mejorar mediante el uso de cualquier técnica adecuada. Por ejemplo, los sistemas de expresión de los genes de glutaminasintetasa (el sistema GS) y de DHFR son enfoques comunes para mejorar la expresión en ciertas condiciones. Los clones de las células de alta expresión se pueden identificar mediante el uso de técnicas convencionales, tales como clonación de dilución limitada y tecnología de

microgotas. El sistema GS se analiza en las patentes europeas Nros. 0 216 846, 0 256 055, 0 323 997 y 0 338 841.

[0204] Es probable que los anticuerpos expresados por diferentes líneas celulares o en animales transgénicos tengan diferente glucosilación entre sí. Sin embargo, todos los anticuerpos codificados por las moléculas de ácido nucleico provistas en la presente, o que comprenden las secuencias de aminoácidos provistas en la presente son parte de la presente descripción, con independencia de la glucosilación de los anticuerpos.

Bibliotecas de presentación de fagos

[0205] También se proveen métodos para producir un anticuerpo IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno que comprenden las etapas de síntesis de una biblioteca de anticuerpos humanos en fagos, el análisis de la biblioteca con IL-6 o una de sus porciones, el aislamiento del fago que se fija a IL-6, y la obtención del anticuerpo a partir del fago. A modo de ejemplo, un método para preparar la biblioteca de anticuerpos para el uso en las técnicas de presentación de fagos comprenden las etapas de inmunizar un animal no humano que comprenden los loci de inmunoglobulina humana con IL-6 o una de sus porciones antigénica para crear una respuesta inmune, extraer las células productoras de anticuerpo del animal inmunizado; aislar el ARN que codifica las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos provenientes de las células extraídas, transcripción inversa del ARN para producir cADN, amplificar el cADN mediante el uso de cebadores, e inserción del cADN en un vector de presentación de un fago de manera tal que los

anticuerpos se expresen en el fago. Los anticuerpos IL-6 recombinantes se pueden obtener de esta manera.

[0206] Los anticuerpos IL-6 recombinantes humanos se pueden aislar por análisis de la biblioteca de anticuerpos combinatorios recombinantes. Con preferencia la biblioteca es una biblioteca de presentación del fago scFv, generado mediante el uso de cADN V_L y V_H humanos preparados a partir de mRNA aislado de células B. Los métodos para preparar y analizar dichas bibliotecas son conocidos en la técnica. Los kits para generar las bibliotecas de presentación de fagos están disponibles en el comercio (por ejemplo, el Pharmacy Recombinant Fage Antibody System, catálogo N.º. 27-9400-01; y el kit de presentación de fago Stratagene SurfZAP™, catálogo N.º 240612). También hay otros métodos y reactivos que se pueden usar en la generación y el análisis de bibliotecas de presentación de anticuerpo (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos N.º 5.223.409; publicaciones de PCT Nros. WO 92/18619, WO 91/17271, WO 92/20791, WO 92/15679, WO 93/01288, WO 92/01047, WO 92/09690; Fuchs et al., *Bio/Technology* 9:1370-1372 (1991); Hay et al., *Hum. Antibod. Hybridomas* 3:81-85 (1992); Huse et al., *Science* 246:1275-1281 (1989); McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993); Hawkins et al., *J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992); Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991); Gram et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3576-3580 (1992); Garrad et al., *Bio/Technology* 9:1373-1377 (1991); Hoogenboom et al., *Nuc. Acid Res.* 19:4133-4137 (1991); y Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-7982 (1991), todos incorporados en la presente por referencia.

[0207] Para aislar y producir anticuerpos IL-6 humanos con las características deseadas, primero se usa un

anticuerpo IL-6 humano para seleccionar secuencias de cadenas pesadas y livianas humanas que tienen similar actividad de unión para IL-6, mediante el uso de los métodos de impronta de epitopo descritos en la publicación de PCT N.º WO 93/06213, incorporada en la presente por referencia. Las bibliotecas de anticuerpo usadas en este método con preferencia son bibliotecas de scFv preparadas y analizadas tal como se describe en la publicación de PCT N.º WO 92/01047, McCafferty et al., *Nature* 348:552-554 (1990); y Griffiths et al., *EMBO J.* 12:725-734 (1993), todas incorporadas en la presente por referencia.

[0208] Una vez que se han seleccionado los V_L y V_H humanos iniciales, se realizan experimentos de “mezclar y hacer coincidir”, en los cuales diferentes pares de los segmentos inicialmente seleccionados V_L y V_H son analizados respecto de la fijación de IL-6 a fin de seleccionar las combinaciones preferidas del par V_L/V_H . Además, para mejorar aún más la calidad del anticuerpo, los segmentos V_L y V_H de los pares V_L/V_H preferidos se pueden mutar al azar, con preferencia dentro de la región de CDR3 de V_H y/o V_L , en un proceso análogo al proceso de mutación somático in vivo responsable de la maduración por afinidad de los anticuerpos durante una respuesta inmune natural. Esta maduración por afinidad in vitro se puede lograr al amplificar los dominios V_H y V_L mediante cebadores de PCR complementarios a las V_H CDR3 o V_L CDR3, respectivamente, en donde los cebadores se han “incentivado” con una mezcla aleatoria de las cuatro bases de nucleótidos en ciertas posiciones de manera tal que los productos obtenidos por PCR codifican los segmentos V_H y V_L en los cuales se han introducido mutaciones aleatorias en las regiones V_H y/o V_L .

CDR3. Estos segmentos mutados aleatoriamente V_H y V_L se pueden volver a analizar respecto de la fijación a IL-6.

[0209] Después del análisis y el aislamiento de un anticuerpo IL-6 proveniente de una biblioteca de presentación de inmunoglobulina recombinante, se pueden recuperar los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo seleccionado del paquete de presentación (por ejemplo, del genoma del fago) y subclonarlo en otros vectores de expresión mediante técnicas estándar de ADN recombinante. Si se desea, el ácido nucleico también se puede manipular a fin de crear otras formas de anticuerpo, tal como se describe en la presente. A fin de expresar un anticuerpo recombinante humano aislado por análisis de una biblioteca combinatoria, el ADN que codifica el anticuerpo se clona en un vector de expresión recombinante y se introduce en células huésped de mamífero, tal como se describió con anterioridad.

Anticuerpos desinmunizados

[0210] En otro aspecto, los anticuerpos IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes se pueden desinmunizar a fin de reducir su inmunogenicidad mediante el uso de las técnicas descritas, por ejemplo, en las publicaciones de PCT Nros. WO98/52976 y WO00/34317 (incorporadas en la presente por referencia).

Anticuerpos derivados y rotulados

[0211] Un anticuerpo IL-6 o sus porciones fijadoras de antígeno se pueden derivar o ligar a otras moléculas (por ejemplo, otro péptido o proteína). En general, los anticuerpos o sus porciones fijadoras de antígeno se derivan de manera tal que la fijación a IL-6 no es afectada

adversamente por la derivación o el rotulado. En consecuencia, los anticuerpos y las porciones fijadoras de antígeno pretenden incluir formas intactas y modificadas de los anticuerpos IL-6 humanos descritos en la presente. Por ejemplo, un anticuerpo o las porciones fijadoras de antígeno pueden estar ligadas funcionalmente (por acoplamiento químico, fusión genética, asociación no covalente o de otro tipo) a una o más de otras entidades moleculares, tales como otro anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico o un diacuerpo), un agente de detección, un rótulo, un agente citotóxico, un agente farmacéutico, y/o una proteína o péptido que puede mediar la asociación del anticuerpo o las porciones fijadoras de antígeno con otra molécula (tal como una región nuclear de estreptavidina o un rótulo de una polihistidina).

[0212] Un tipo de anticuerpo derivado se produce por entrecruzamiento de dos o más anticuerpos (del mismo tipo o de diferentes tipos, por ejemplo, para crear anticuerpos biespecíficos). Los formadores de enlaces cruzados adecuados incluyen los que son heterobifuncionales, que tienen dos grupos reactivos diferenciados separados por un espaciador adecuado (por ejemplo, éster m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida) o homobifuncional (por ejemplo, suberato de disuccinimidilo). Dichos ligadores están disponibles de Chemical Company, Rockford, IL.

[0213] Otro tipo de anticuerpo derivado es un anticuerpo rotulado. Los agentes de detección útiles con los cuales se puede derivar un anticuerpo o las porciones fijadoras de antígeno incluyen compuestos fluorescentes, incluso, por ejemplo, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, cloruro de 5-dimetilamin-1-naftalen-sulfonilo, ficoeritrina, fósforos de lantánido. Un

anticuerpo también se puede rotular con enzimas que son útiles para la detección, tales como, por ejemplo, peroxidasa de rábano, β -galactosidasa, luciferasa, fosfatasa alcalina, o glucosoxidasa. Cuando un anticuerpo se rotula con una enzima detectable, se la detecta al agregar reactivos adicionales que la enzima utiliza para producir un producto de reacción que se puede discernir. Por ejemplo, cuando el agente de peroxidasa de rábano está presente, la adición de peróxido de hidrógeno y diaminobencidina conduce a la formación de un producto de reacción coloreado, el cual puede ser detectado. Un anticuerpo también se puede rotular con biotina, y se detecta a través de la medición indirecta de la fijación de avidina o estreptavidina. Un anticuerpo también se puede rotular con un epitopo de polipéptido predeterminado que es reconocido por un informador secundario (por ejemplo, secuencias de par de cierre de leucina, sitios de unión para anticuerpos secundarios, dominios fijadores de metal, rótulos de epitopo). En algunos casos, los rótulos están adosados mediante brazos espaciadores de diversas longitudes con el fin de reducir los posibles impedimentos estéricos. Un anticuerpo IL-6 también se puede derivar mediante un grupo químico tal como polietilenglicol (PEG), un grupo metilo o etilo, o un grupo de hidratos de carbono. Estos grupos son útiles para mejorar las características biológicas del anticuerpo, por ejemplo, para incrementar la vida media sérica.

[0214] Los Ejemplos específicos establecidos en la presente pretenden ilustrar aspectos particulares de la descripción y no pretenden limitar el alcance de las reivindicaciones.

EJEMPLO 1Generación de hibridomas productores de anticuerpo anti-IL-6

[0215] Los ejemplos de anticuerpos de acuerdo con la descripción se preparan, seleccionan, y analizan como sigue:

Cepas de ratones

[0216] Se prepararon anticuerpos monoclonales humanos completos contra IL-6 humano mediante el uso de las cepas de ratón transgénicas de Ig humana HCo7 y HCo12, así como la cepa de transcromosoma/transgénica humana, KM (Medarex, Inc.). Todas estas cepas expresan anticuerpos humanos completos que no se pueden distinguir de los anticuerpos aislados de los humanos.

[0217] Las tres cepas, tanto el gen de cadena liviana kappa endógena de ratón como el gen de cadena pesada endógena de ratón se alteraron en forma homocigoto tal como se describe en Chen et al. (1993) *EMBO J.* 12:811-820 y en el Ejemplo 1 de la publicación de PCT WO 01/09187, respectivamente. Además, los tres portan un transgén de cadena liviana kappa humano, KCo5, tal como se describe en Fishwild et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14:845-851. En contraste, las tres cepas se diferencian con respecto de los genes de cadena pesada humana. La cepa HCo7 porta el transgén de cadena pesada HCo7 humano tal como se describe en las patentes de los Estados Unidos Nros. 5.545.806, 5.625.825, y 5.545.807; la cepa HCo12 porta el transgén de cadena pesada HCo12 humano tal como se describe en el Ejemplo 2 de la publicación de PCT WO 01/09187; y la cepa

KM porta un minicromosoma humano tal como se describe en Ishida et al., (2002), *Cloning and Stem Cells*, 4: 91-102.

Inmunización con antígeno IL-6 y selección de ratones HuMab que producen anticuerpos monoclonales anti-IL-6

[0218] Los esquemas generales de inmunización para ratones HuMab se describen en Lonberg et al (1994) *Nature* 368(6474): 856-859; Fishwild et al. (1996) *Nature Biotechnology* 14: 845-851 y la publicación de PCT WO 98/24884. En el presente caso, un total de 81 ratones HuMab de las cepas HCo7, HCo12 y KM se inmunizaron a partir de las 6-16 semanas de edad con 5-25 µg de IL-6 humano purificado en coadyuvante de Ribi. El IL-6 humano se aisló de una célula del estroma derivado de médula ósea humana, HS-5 (ATCC CRL-11882, Roecklein B. A. & Torok-Storb B., *Blood* 85: 997-1005, 1995), las cuales secretan en forma endógena IL-6 al medio. Los IL-6 humanos se purificaron a partir de IL-6 que expresa medio HS-5, el cual se concentró por ultrafiltración seguido de la etapa de cromatografía por intercambio aniónico de Q Sefarosa y una etapa de cromatografía por afinidad mediante el uso de un anti-hIL-6 MAb antinmurino (R&D Systems, número de catálogo MAB2061, clon 1936). La IL-6 purificada humana tenía una pureza de aproximadamente 90% por SDS-PAGE. Las principales bandas se extrajeron del gel de SDS-PAGE, se digirieron con tripsina y los péptidos de tripsina extraídos del gel purificado se analizaron por MALDI/MS en 4700 TOF/TOF Proteomics Analyzer y se confirmaron como IL-6 humano. Alternativamente, se pueden usar fuentes comerciales de IL-6 recombinante humano (por ejemplo, Recombinant Human IL-6, catálogo número 206-IL-6/CF. R&D System Inc. 614 Mckinley Place NE,

Minneapolis, MN 55413). La administración fue por inyección intraperitoneal, subcutánea o en la almohadilla de la pata con intervalos de 3-14 días, hasta un total de 8 inmunizaciones. La respuesta inmune se monitoreó por análisis por ELISA, tal como se describe más adelante.

Selección de ratones HuMab que producen anticuerpos anti-IL-6

[0219] La sangre de los ratones transgénicos antes descritos se obtuvo por sangrado retroorbital y se analizó por ELISA para determinar la unión específica a la proteína IL-6 recombinante humana purificada, tal como se describe en Fishwild et al. (1996), *Nature Biotechnology* 14: 845-851.

[0220] Brevemente, se recubrieron placas de microtitulación mediante el uso de 50 µl/cavidad de una solución de IL-6 recombinante purificado que contiene 1 µg/ml en PBS, y se incubó durante la noche a 4 °C. Las cavidades luego se bloquearon mediante el uso de 200 µl/cavidad de 5% de suero de pollo en PBS/Tween (0,05%). Diluciones de plasma proveniente de ratones inmunizados para IL-6 se añadieron a cada cavidad y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Las placas se lavaron con PBS/Tween y luego se incubaron con un anticuerpo policlonal de cabra antihumano de IgG Fc conjugado con peroxidasa de rábano (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, las placas se desarrollaron con sustrato ABTS (Moss Inc, producto #: ABTS-1000 mg/ml) y se analizaron mediante espectrofotómetro a DO 415-495. Los ratones que desarrollaron los mayores títulos de anticuerpos anti-IL-6 (22 animales en total) se usaron para las fusiones.

Generación de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales human contra IL-6:

[0221] Los ratones seleccionados con anterioridad se reforzaron por vía intravenosa con IL-6 a los 3 días y luego nuevamente a los 2 días antes del sacrificio y la extracción del bazo y/o los ganglios linfáticos. Se realizó un total de 17 fusiones.

[0222] Los esplenocitos murinos y/o los linfocitos de los ganglios linfáticos aislados de los ratones HuMab o KM inmunizados, se fusionaron a células de mieloma murino SP2/0 no secretoras (ATCC, CRL-1581, ATCC American Type Culture Collection, 1080 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 EE.UU.) mediante electrofusión (E-fusion, tecnología Cito PulseTM, Cito PulseTM Sciences, Inc., Glen Burnie, MD), de acuerdo con los protocolos estándar o recomendados por los fabricantes.

[0223] Brevemente, se prepararon suspensiones células únicas de esplenocitos y/o linfocitos de ganglios linfáticos a partir de ratones inmunizados y luego se combinaron con una cantidad igual de células de mieloma murino Sp2/0 no secretoras; luego se efectuó la fusión E.

[0224] Las células se plaquearon entonces a 2×10^4 células /cavidad en una placa de titulación de fondo plano, y se incubaron durante 10-14 días en medio selectivo que contiene 10% de suero fetal bovino, 10% de medio acondicionado P388D1 (ATCC, CRL-TIB-63), 3-5% de (IGEN) en DMEM (Mediatech, Herndon, VA, Cat. N.º CRL 10013, con elevado contenido de glucosa, L-glutamina y piruvato de sodio), 5 mM de HEPES, 0,055 mM de 2-mercaptoetanol, 50 mg/ml de gentamicina y 1x HAT (Sigma, Cat. N.º CRL -P-7185).

[0225] Después de 1-2 semanas, se cultivaron las células en medio en el cual HAT fue reemplazado por HT. Aproximadamente 10-14 días después del plaqueo de las células, se analizó el sobrenadante proveniente de cavidades individuales respecto de la presencia de anticuerpos gamma, kappa humanos. Los sobrenadantes que calificaron positivos para gamma, kappa human luego se analizaron por ELISA (mediante el uso del protocolo descrito con anterioridad) para determinar anticuerpos IgG monoclonales anti-IL-6 humanos. Los hibridomas secretores de anticuerpo se transfirieron a placas de 24 cavidades, se volvieron a analizar y en caso de confirmar positividad para anticuerpos monoclonales IgG de anti-IL-6 humano, se subclonaron al menos dos veces por dilución limitante. Los subclones estables luego se cultivaron in vitro con el fin de generar pequeñas cantidades de anticuerpo en medio de cultivo de tejido para su ulterior caracterización.

Ejemplo 2

Determinación de la secuencia de anticuerpos IL-6

[0226] Los anticuerpos anti-IL-6 de longitud total se clonaron y se verificó la secuencia respecto de los hibridomas como sigue: se aisló mRNA Poli(A)⁺ mediante el uso de un RNeasy Mini Kit (Qiagen) y se amplificó el cADN sintetizado a partir de mRNA con el kit Advantage RT-for-PCR (BD Biosciences) mediante imprimación por oligo(dT). El cADN oligo(dT) cebado para el clon 9C8 se amplificó mediante el uso de los cebadores degenerados listados en la Tabla 1 respectivamente.

Tabla 1: Cebadores degenerados (5' a 3') para 9C8

VH4_5UTR_F	CTTCTGAGASTCMTGGAKCTCMTG SEQ ID NO:49
------------	---------------------------------------

G_3UTR_R	TACGTGCCAAGCATCCTCGC SEQ ID NO:50
VK1a_5UTR_F	GSARTCAGWCICWVYCAGGACACAGC SEQ ID NO:51
K_3UTR_F	AGGCTGGAAGTGGAGGAGCAGGTG SEQ ID NO:52

[0227] Se logró la amplificación mediante el uso de High Fidelity Polymerase (Roche) y un PTC-200 ADN Engine (MJ Research) para el siguiente ciclado: 2' @ 95 °C; 25x (20" @ 95 °C, 30" @ 52 °C, 2' @ 72 °C); 10' @ 72 °C. Se clonaron amplicones por PCR en el pCR2.1 TOPO y se transformó en células químicamente competentes TOP10 (Invitrogen) mediante el uso del protocolo estándar. Los clones se verificaron respecto de la secuencia mediante los compuestos químicos de Grills 16th BDTv3.1/dGTP (Applied Biosystems Inc) y un 3730xl ADN Analyzer (Applied Biosystems Inc). Todas las secuencias se analizaron respecto de los alineamientos con el 'directorio de secuencias de V BASE' (Tomlinson, et al, *J. Mol. Biol.*, 227, 776-798 (1992); *Hum. Mol. Genet.*, 3, 853-860 (1994); *EMBO J.*, 14, 4628-4638 (1995). Los usos de segmento génico de línea germinal de los ejemplos de antianticuerpos IL-6 se enumeran en la Tabla 2.

Tabla 2:

Clon	Cadena pesada			Cadena liviana		Subtipo
	V _H	D	J _H	V _K	J _K	
9C8	4-34	-	3b	L15	JK1	IgG1
22B5	4-34	-	3b	L15	JK1	IgG1

Secuencias de longitud total del anticuerpo anti-IL-6 derivado de hibridomas

9C8

Secuencia de ADN de cadena pesada proveniente de células de hibridoma 9C8 (dominio variable en mayúscula)

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT
CACCTGCGCTATCTATGGTGGGTCCTTCAGGGAGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGC
CCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCTTTCATAGTGGAAGCACCAACTAC
AACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCAACATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTC
CCTGAAGCTGACCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGG
AATTAGATGATTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAgcctcc
accaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcac
agcgccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtgga
actcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttcccggtgtcctacagtcctcagga
ctctactccctcagcagcggtggtgacggtgccctccagcagcttgggcacccagaccta
catctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagagagttgagccca
aatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggga
ccgtcagtcctcctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccgacccc
tgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaact
ggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggaggagcagtac
aacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcacgctcctgcaccaggactggctgaatgg
caaggagtacaagtgaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaacca
tctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccg
gatgagctgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccag
cgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagc
ctcccggtgctggactccgacggctccttcttctctacagcaagctcacggtggacaag
agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaa
ccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa SEQ ID NO:1

Secuencia de proteína derivada (por traducción) de cadena pesada proveniente de células de hibridoma 9C8 (dominio variable en mayúsculas)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIYGGSFREYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIFHSGSTNY
NPSLKS RVNISVDTSKNQFSLKLT SVTAADTAVYYCAREELDDFDIWGQGMVTVSSas

tkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavllqssg
 luslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtcppcpapellgg
 psvflfpkpkdtlmsrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqy
 nstyrvvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqpprepqvytlppsr
 deltnqvsiltclvkgfypsdiavewesngqpennykttpvldsdsfflyskltvdk
 srwqqgnvfscsvmhleahnhytqkslspsgk SEQ ID NO:3

Secuencia de ADN de cadena liviana proveniente de células
 de hibridoma 9C8 (dominio variable en mayúsculas)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
 CATCACTTGTCTGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC
 CAGAGAAAGCCCCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA
 TCAAGGTTCAAGCGGAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGCCTGCA
 GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAAAAGTTACCCTCGGACGTTG
 GCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAcgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttc
 ccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttgtgtgctgctgaataa
 cttctatcccagagaggccaaagtacagtggagggtggataacgccctccaatcgggta
 actcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagc
 accctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcac
 ccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtggt SEQ ID
 NO:12

Secuencia de proteína derivada (por traducción) de cadena
 liviana proveniente de células de hibridoma 9C8 (dominio
 variable en mayúsculas)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVP
 SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYKSYPRTFGQGTKVEIKrtvaapsvfif
 ppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsdstyslss
 tltlskadyekkhkvyacevthqglsspvtksfnrgec SEQ ID NO:14

**Los dominios variables de los anticuerpos anti-IL-6 se
 clonaron en vectores de expresión como sigue:**

[0228] Los dominios variables se amplificaron a partir de cADN clonado por pCR2.1 mediante el uso de los cebadores listados en la Tabla 3. Se realizó la amplificación mediante el uso de la *Pfx* Platinumpolimerasa (Invitrogen) y un PTC-200 ADN Engine (MJ Research) con ciclado como sigue: 2' @ 94 °C; 20 x (30" @ 94 °C, 45" @ 55 °C, 1' @ 68 °C); 5' @ 68 °C. Luego se clonaron los dominios variables en vectores de expresión que contienen los dominios constantes del isotipo adecuado. Estos clones se verificaron en sus secuencias mediante el uso de los compuestos químicos de Grills 16th BDTv3.1/dGTP (Applied Biosystems Inc) y un 3730xl ADN Analyzer (Applied Biosystems Inc).

Tabla 3: Cebadores de dominio variable (5' a 3') para 9C8

H4_34	ttacagtGCGCGCACTCCCAGGTGCAGCTACAGCAGTGG SEQ ID NO:53
K_O12	ttacagtGTGCACTCCGACATCCAGATGACCCAGTCTCC SEQ ID NO:54
G1/2_ch1(ApaI)_R	GAAGACCGATGGGCCCTTGG SEQ ID NO:55
JK1_R	tatattccttaattaagttattctactcacGTTGATTCCACCTTGGTCC CT SEQ ID NO:56

**Secuencias de longitud total de anticuerpos anti-IL-6
recombinantes de 9C8**

Secuencia de ADN de cadena pesada de IgG2 recombinante de 9C8 (dominio variable en mayúsculas)

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT
CACCTGCGCTATCTATGGTGGGTCCTTCAGGGAGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGC
CCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCTTTCATAGTGGGAAGCACCAACTAC
AACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCAACATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTC
CCTGAAGCTGACCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGG
AATTAGATGATTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCagcctcc
accaagggcccatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcac
agcggccctgggctgctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtgga
actcaggcgctctgaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcagga
ctctactccctcagcagcgtagtacgctgcccctccagcaacttcggcaccagaccta
cacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgca
aatgttggtgctcgagtgccaccgtgccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtcctc
ctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacgtg
cgtgggtggtagcgtgagccacgaagaccccgaggtccagttcaactggtacgtggacg
gcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttc
cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaa
gtgcaaggtctccaacaaaggcctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaaacca
aagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgacc

aagaaccagggtcagcctgacctgcctgggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgt
 ggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctcccatgctgg
 actccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcagggtggcag
 caggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacaca
 gaagagcctctccctgtctccgggtaaa SEQ ID NO:23

Secuencia de proteína derivada (por traducción) de cadena
 pesada de IgG2 recombinante de 9C8 (dominio variable en
 mayúsculas)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIYGGSFREYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIFHSGSTNY
 NPSLKSRVNISVDTSKNQFSLKLTSVTAADTAVYYCAREELDDFDIWGQGMVTVSSas
 tkgpsvfplapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssg
 luslssvvtvpssnfgtqtytcnvdhkpsntkvdktkverkccecpappvagsvf
 lfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstf
 rvvsvltvvhqdwlngkeykckvsnkglpapiektisktkgpprepqvytlppsreemt
 knqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttppmlsdsgsflyskltvdksrwq
 qgnvfscsvmhealhnhytqkslsislspgk SEQ ID NO:24

Secuencia de ADN de cadena liviana Kappa recombinante de
 9C8 (dominio variable en mayúsculas)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCACTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCAC
 CATCACTTGTCGGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAAC
 CAGAGAAAGCCCCTAAGTCCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCA
 TCAAGGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGCCTGCA
 GCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAAAAGTTACCCTCGGACGTTTCG
 GCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAAcgaactgtggctgcaccatctgtcttcatcttc
 ccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctctgttggtgcctgctgaataa
 cttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggta
 actcccaggagagtggtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagc
 accctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcac
 ccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtggt SEQ ID
 NO:25

Secuencia de proteína derivada (por traducción) de cadena liviana Kappa recombinante de 9C8 (dominio variable en mayúsculas)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYKSYPRTFGQGTKVEIKrtvaapsvfif
ppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsdstyslss
tltlskadyekkhkvyacevthqglsspvtksfnrgec SEQ ID NO:26

Ejemplo 3

Mutagénesis de anticuerpo anti-IL-6:

[0229] Se efectuaron las variantes de sustituciones de aminoácidos del anticuerpo anti-IL-6 9C8 en el dominio variable de la cadena pesada en las posiciones 24 (I24V), 30 (R30S), 31 (E31G), 52 (F52N), 68 (N68T), 83 (T83S) en forma única o en combinación en el contexto de un formato de IgG1 o de IgG2. Las variantes de sustitución de aminoácido del anticuerpo anti-IL-6 9C8 en el dominio variable de la cadena liviana se realizaron a 92 (K92N) en formato de IgG1 o de IgG2. Se prepararon variantes de anticuerpos que tenían un dominio variable de la cadena pesada y un dominio variable de la cadena liviana. Algunas de las diversas combinaciones de mutación se muestran en la Tabla 6a y 6b. La mutagénesis en las regiones V_H (I24V), V_H (E31G), V_H (N68T), y V_H (T83S) del clon 9C8 se realizaron con los cebadores presentados en la Tabla 4 (se muestran las cadenas con sentido; el residuo objetivo se muestra en negrita) y el kit QuickChange (Stratagene) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las variantes mutadas se verificaron en su secuencia y se clonaron en vectores de expresión mediante procedimientos estándar.

Tabla 4: Cebadores mutagénicos (5' a 3') para 9C8

9C8_H_I24V	CCTCACCTGCGCT G TCTATGGTGGGTCC SEQ ID NO:57
9C8_H_E31G	GGGTCCTTCAGGG G GTACTACTGGAGCTG SEQ ID NO:58
9C8_H_N68T	CCTCAAGAGTCGAGTCA C CATATCAGTAGACACG SEQ ID NO:59
9C8_H_T83S	CTCCCTGAAGCTGAG G CTCTGTGACCGCC SEQ ID NO:60

Secuencia de ADN de cadena pesada de IgG2 recombinante de 9C8 (N68T, T83S)

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCTT
CACCTGCGCTATCTATGGTGGGTCCTTCAGGGAGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGC
CCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCTTTCATAGTGGAAGCACCAACTAC
AACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTC
CCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGG
AATTAGATGATTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCAGcctcc
accaagggcccatcggtcttccccctggcgccctgctccaggagcacctccgagagcac
agcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtgga
actcaggcgctctgaccagcggcggtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcagga
ctctactccctcagcagcgtagtgaccgtgccctccagcaacttcggcaccagaccta
cacctgcaacgtagatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagacagttgagcgca
aatgttgtgtcgagtgcccaccgtgcccagcaccacctgtggcaggaccgtcagtcctc
ctcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccctgaggtcacgtg
cgtggtggtggacgtgagccacgaagacccccgaggtccagttcaactggtacgtggacg
gcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccacgggaggagcagttcaacagcacgttc
cgtgtggtcagcgtcctcaccgtcgtgcaccaggactggctgaacggcaaggagtacaa
gtgcaaggtctccaacaaaggcctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaaacca
aagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgggaggagatgacc
aagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctaccccagcgacatcgccgt
ggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacacctcccatgctgg
actccgacggctccttcttctctacagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcag
caggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacacgca
gaagagcctctccctgtctccgggtaaa SEQ ID NO:27

Secuencia de proteína derivada (por traducción) de cadena pesada de IgG2 recombinante de 9C8 (N68T, T83S)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIYGGSFREYYWSWIRQPPGKLEWIGEIFHSGSTNY
NPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREELDDFDIWGQGTMTVSSas
tkgpsvfplapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavllqssg
luslssvvtvpssnfgtqtytcnvdhkpsntkvdktkverkcvecppcpappvagpsvf

lfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstf
 rvvsvltvvhqdwlngkeykckvsnkglpapiektisktkgqprepqvylppsreemt
 knqvsltclvkgyfypsdiavewesngqpennykttppmlsdsgsflyskltvdksrwq
 qgnvfscsvmhealhnhytqkslslspgk SEQ ID NO:28

Secuencia de ADN de cadena pesada de IgG1 recombinante de
 9C8 (N68T, T83S)

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT
 CACCTGCGCTATCTATGGTGGGTCCTTCAGGGAGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGC
 CCCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCTTTCATAGTGGAAGCACCAACTAC
 AACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTC
 CCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGG
 AATTAGATGATTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCAgcctcc
 accaagggcccatcggtcttccccctggcacccctcctccaagagcacctctggggggcac
 agcggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtgga
 actcaggcgccctgaccagcggtgcacaccttccccggtgtcctacagtcctcagga
 ctctactccctcagcagcgtagtgaccgtgccctccagcagcttgggcacccagaccta
 catctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagccca
 aatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagcacctgaactcctgggggga
 ccgtcagtccttcttccccccaaaacccaaggacaccctcatgatctcccggacccc
 tgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaact
 ggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaagacaaagccgcgggaggagcagtac
 aacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatgg
 caaggagtacaagtgcaaggtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaacca
 tctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacaccctgcccccatcccgg
 gaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctgcctggtcaaaggcttctatcccag
 cgacatcgccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgc
 ctcccgtgctggactccgacggctccttcttctctatagcaagctcaccgtggacaag
 agcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaa
 ccactacacgcagaagagcctctccctgtctccgggtaaa SEQ ID NO:31

Secuencia de proteína de cadena pesada de IgG1 recombinante de 9C8 (N68T, T83S)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIYGGSFREYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIFHSGSTNY
 NPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREELDDFDIWGQGMVTVSSas
 tkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavllqssg
 luslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkkvepkscdkthtccppcpapellgg
 psvflfpkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpreeqy
 nstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakgqprepqvylppsr
 eemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgsfflyskltvdk
 srwqqgnvfscsvmhleahnhytqkslsislspgk SEQ ID NO:32

Secuencia de ADN de dominio variable de cadena pesada recombinante de 9C8 (E31G, N68T, T83S)

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT
 CACCTGCGCTATCTATGGTGGGTCCTTCAGGGGTTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGC
 CCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCTTTCATAGTGGAAGCACCAACTAC
 AACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTC
 CCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGG
 AATTAGATGATTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCA SEQ
 ID NO:33

Secuencia de proteína de dominio variable traducida de cadena pesada recombinante de 9C8 (E31G, N68T, T83S)

QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAIYGGSFRRGYWSWIRQPPGKGLEWIGEIFHSGSTNY
 NPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREELDDFDIWGQGMVTVSS
 SEQ ID NO:34

Secuencia de ADN de dominio variable de cadena pesada recombinante de 9C8 (I24V, N68T, T83S)

CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCT
 CACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGGGAGTACTACTGGAGCTGGATCCGCCAGC
 CCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATTGGGGAAATCTTTCATAGTGGAAGCACCAACTAC

AACCCGTCCCTCAAGAGTCGAGTCACCATATCAGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCTC
 CCTGAAGCTGAGCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGAGG
 AATTAGATGATTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCCTCA SEQ
 ID NO:36

Secuencia de proteína de dominio variable traducida de
 cadena pesada recombinante de 9C8 (I24V, N68T, T83S)
 QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFREYYWSWIRQPPGKGLEWIGEIFHSGSTNY
 NPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAREELDDFDIWGQGMVTVSS
 SEQ ID NO:37

[0230] El promotor CMV que contiene los vectores de expresión se transfectó en células 293 Freestyle (Invitrogen) de acuerdo con el protocolo del vendedor. Los sobrenadantes de estas células se juntaron por centrifugación y se purificaron por cromatografía estándar de afinidad con proteína A, a fin de aislar las inmunoglobulinas recombinantes. Estas proteínas luego fueron caracterizadas por SDS-PAGE, por dispersión de la luz, y por espectrofotometría.

[0231] Las cadenas pesadas y livianas de los anticuerpos anti-IL-6 indicadas en la Tabla 5 fueron depositadas según los términos de conformidad con el Tratado de Budapest en el American Type Culture Collection (ATCC), 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209. Se asignaron a las cadenas pesadas y livianas los siguientes números de acceso:

Tabla 5

Anticuerpo	Designación de clon	Designación de ATCC	Designación de depósito de patente	Fecha de depósito
Cadena pesada de IgG1 de 9C8	<i>E. coli</i> ; pCR2.1 TOPO 9C8H(WT)	UC25510	PTA-8013	Nov. 21, 2006
Cadena liviana de IgG1 de 9C8	<i>E. coli</i> ; pCR2.1 TOPO 9C8L(WT)	UC25511	PTA-8014	Nov. 21, 2006
Cadena pesada de N68T, T83S de IgG2 de 9C8	<i>E. coli</i> ; pCR2.1 TOPO 9C8H(NT)hG2	UC25512	PTA-8015	Nov. 21, 2006
Cadena liviana de N68T, de T83S de IgG2 de 9C8	<i>E. coli</i> ; pCR2.1 TOPO 9C8L(wt)hk	UC25513	PTA-8016	Nov. 21, 2006
región variable de E31G, N68T, T83S de 9C8	<i>E. coli</i> ; pCR2.1 TOPO 9C8H(ENT)	UC25514	PTA-8017	Nov. 21, 2006

región variable de I24V, N68T, T83S de 9C8	<i>E. coli</i> ; pCR2.1 TOPO 9C8H(INT)	UC25515	PTA-8018	Nov. 21, 2006
Cadena pesada de N68T, T83S de IgG1 de 9C8	<i>E. coli</i> ; pCR2.1 TOPO 9C8H(NT)hG1	UC25526	PTA-8019	Nov. 21, 2006

Ejemplo 4

Proliferación de TF-1

[0232] Se obtuvieron células humanas, células TF-1, de American Type Culture Collection (ATCC) (Manassas, Va.), y se mantuvieron en medio RPMI-1640 que contiene 10% de suero fetal bovino inactivado por calor (FBS) (Invitrogen, Carlsbad, Ca.), con 2 ng/ml de GM-CSF recombinante humano. Las células TF-1 se dividieron en $1-2 \times 10^5$ para el uso el día siguiente. Antes del plaqueado, las células se lavaron tres veces con RPMI-1640, se contaron, y el volumen se ajustó con medio de ensayo para obtener 2×10^5 células/ml. A cada cavidad se agregó 50 μ l de las células lavadas y se incubó durante la noche a 37 °C con 5% de CO₂. Todas las condiciones se condujeron por triplicado en placas de 96 cavidades tratadas con cultivos de tejido (Corning, Corning, NY). A cada cavidad se agregó 25 ng/ml o 2,5 ng/ml de IL-6 en un volumen de 25 μ l y se añadió anticuerpo de prueba o control en diversas concentraciones en un volumen de 25 μ l en buffer fosfato de sodio (10 mM de fosfato de sodio y 150 mM de cloruro de sodio, pH 7,4) hasta un

volumen final de 100 μ l. Los anticuerpos se analizaron solos y con IL-6 humano. Las placas se incubaron durante 48 horas (h) a 37 °C con 5% de CO₂. Después de 48 horas, se añadió 10 μ l/cavidad de 0,5 μ Ci de ³H-timidina (Amersham Biosciences, Piscataway, N.J.) y se pulsó con las células durante 3 h. A fin de detectar la cantidad de timidita de incorporada, se cosecharon las células en placas de filtrado de filtro único prehumedecidas GF/C (Packard, Meriden, Ct.) y se lavaron 10 veces con agua. Las placas se dejaron secar durante la noche. Se agregaron sellos de fondo a las placas de filtrado. A continuación se añadieron, 45 μ l de Microscint 20 (Packard, Meriden, Ct.) por cavidad. Después de agregar un sello superior, se contaron las placas en un contador de microbeta Trilux (Wallac, Norton, Oh.) y los datos se informaron como CPM (cuentas por minuto). Las Tablas 6a y 6b muestran IC50 en el ensayo de proliferación de TF-1 del anticuerpo de 9C8 y los diversos anticuerpos que tienen sustituciones de aminoácidos. Los resultados mostrados en la Tabla 6a y la Tabla 6b son de ensayos efectuados en dos distintas ocasiones.

Tabla 6a

Hc	Lc	IC50 promedio (μ g/ml)	Veces de diferencia
9C8	9C8	0,0022	1,0
9C8 I24V	9C8	0,0071	3,3
9C8 R30S	9C8	0,0260	12,1
9C8 N68T	9C8	0,0028	1,3
9C8 T83S	9C8	0,0026	1,2
9C8 I24V, N68T, T83S	9C8	0,0145	6,7

9C8 I24V, R30S, N68T, T83S	9C8	0,2040	94,9
9C8 E31G	9C8	0,0051	2,4
9C8 F52N	9C8	1,3850	644,2
9C8	9C8 K92N	0,0120	5,6

Tabla 6b

Hc	Lc	IC50 promedio (µg/ml)	Veces de diferen cia
9C8	9C8	0,0031	1,4
9C8 N68T, T83S	9C8	0,0030	1,4
9C8 E31G, N68T, T83S	9C8	0,0083	3,9
9C8 I24V, E31G, N68T, T83S	9C8	0,0528	24,5
9C8 N68T, T83S	9C8 9C8 K92N	0,0186	8,6
9C8 E31G, N68T T83S	9C8 K92N	0,1015	47,2
9C8 I24V, E31G N68T, T83S	9C8 K92N	0,9670	449,9

Hc = cadena pesada, Lc = cadena liviana

Ejemplo 5

Proteína C reactiva proveniente de un estudio de monos LPS

[0233] La porción in vivo de este estudio fue conducida por Charles River Laboratories Preclinical Services en sus instalaciones de prueba de Worcester, MA. Brevemente, el estudio consistió de 15 monos cinomolgus

machos (cinco grupos; 3 monos/grupo). El día 1 los animales del grupo 1 recibieron vehículo; los animales de los grupos 2 y 3 recibieron en anticuerpo IgG₁ N68T T83S de 9C8 en dosis de 0,5 y 5 mg/kg, respectivamente; y los animales de los grupos 4 y 5 recibieron IgG₂ N68T T83S de 9C8 en dosis de 0,5 y 5 mg/kg, respectivamente. Todos los tratamientos se administraron por inyección IV en bolo con volúmenes de dosis de 1 mL/kg cada uno. Aproximadamente 2 horas después del tratamiento, todos los animales fueron expuestos a 10 µg/kg de lipopolisacárido bacteriano (LPS) en un volumen de 1 mL/kg mediante inyección IV lenta de bolo. El día 1 se obtuvo sangre de un vaso periférico en la línea de base (antes del tratamiento); inmediatamente después del tratamiento; 2 horas postratamiento (inmediatamente antes de la administración de LPS); y a los 30 minutos y 1, 2, 3, 4, 6, 8, y 22 horas después de la exposición a LPS. Las muestras de sangre también se extrajeron los días 3, 4, 5, 6 y 7. Las muestras de sangre entera fueron procesadas para obtener el suero, y las muestras de los sueros se conservaron por congelamiento. Se midió la proteína C reactiva (CRP) mediante el kit de ensayo de panel de lesión vascular humana II Multi-Spot[®] de Meso Scale Discovery (MSD[®]), Gaithersburg, MD. Los ensayos se realizaron tal como se reseña en las instrucciones del kit publicadas de MSD. La Figura 2 muestra la CRP sérica total para el anticuerpo IgG₂ N68T T83S de 9C8.

Ejemplo 6

Ensayo de pSTAT3 por citometría de flujo

[0234] Se condujeron ensayos in vitro en sangre entera humana y células mononucleares de sangre periférica humana

(PBMC) estimuladas con IL-6 recombinante humano (rhIL-6) a fin de medir los niveles de STAT3 fosforilado (pSTAT3) en presencia de anticuerpos anti-IL-6.

Ensayo en sangre entera

[0235] Se incubó sangre entera humana heparinizada recién extraída con anticuerpo anti-IL-6 o vehículo control (volumen final 300 μ L en tubos de polipropileno de 15 mL) durante 15 minutos a 37 °C. Las muestras fueron estimuladas con IL-6 recombinante human (rh) hasta una concentración final de 25 ng/mL y se incubaron durante 10 minutos a 37 °C. Luego se lisaron los glóbulos rojos (RBC) con 4 mL de buffer de lisado de RBC (Sigma), y las muestras se mezclaron suavemente durante 10 minutos a 37 °C. Las muestras se giraron a 400 $\times$ g durante 5 min para sedimentar las células. Se extrajeron los sobrenadantes. Se añadieron dos mililitros de buffer de lavado (4% de BSA en PBS, Gibco) a cada tubo, y luego se giraron las muestras a 400 $\times$ g durante 5 min para sedimentar las células. Se extrajeron los sobrenadantes, y los sedimentos celulares se resuspendieron en 200 μ L de buffer precalentado (37 °C) de permeabilización (2% de formaldehído en PBS, Polysciences, Inc.) y se incubaron a 37 °C durante 10 minutos. Se añadieron tres mililitros de MeOH helado a cada muestra para fijar las células. Las muestras se mezclaron y se colocaron sobre hielo durante al menos 30 min. Las muestras se giraron (400 $\times$ g durante 5 min.) y se extrajeron los sobrenadantes. Los sedimentos se lavaron una vez con buffer de lavado. Luego se tiñeron los sedimentos celulares con anticuerpo anti- STAT3 fosforilado (Y705) conjugado Alexa

Fluor 488 (BD Pharmingen) diluido en buffer de lavado, hasta un volumen final de 100 μ L. Las muestras se incubaron sobre hielo durante 30 minutos y luego se lavaron 2X en buffer de lavado. Los sedimentos celulares finales se resuspendieron en 400 μ L de Buffer IF (solución fisiológica con buffer de Hank, 2% de suero fetal bovino, 10 mM de Hepes, 0,2% de azida sódica, Gibco). Se usó un instrumento FACSCalibur con software CellQuest (BD Biosciences) para obtener y analizar los datos. La Tabla 7 muestra los niveles de pSTAT3 en presencia de anticuerpos anti-IL-6 medidos en sangre entera humana.

Tabla 7

Anticuerpo anti IL-6	Conc de IL-6 ng/ml	IC50 de GB μ g/ml	Ensayo #
9C8	25	0.487	1
	25	0,432	2
	25	0,482	3
I24V,N68T,T83S	25	0,420	1
	25	0,527	2
	25	0,749	3
E31G,N68T,T83S	25	0,626	1
	25	0,714	2
	25	0,968	3
I24V,E31G,N68T,T83S	25	0,364	1
	25	0,603	2
	25	0,821	3

Ensayo de PBMC

[0236] Se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de sangre entera human heparinizada

recién extraída mediante columnas de Accuspin System-Histopaque 1077 de acuerdo con el protocolo del fabricante (Sigma-Aldrich A7054) y se colocaron en 0,1 % de penicilina estreptomycin (medio Macrophage SFM, Gibco). Se incubaron aproximadamente 2×10^6 PBMC con anticuerpo anti-IL-6 o vehículo control (vol. final 300 μ L) d 15 min. a 37 °C. Las PBMC se estimularon con rhIL-6 hasta una concentración final de 25 ng/mL y se incubaron durante 10 min. a 37 °C. Las muestras se giraron a 400 x g durante 5 min para sedimentar las células. Se extrajeron los sobrenadantes. Se añadieron 2 mL de buffer de lavado (4% de BSA en PBS) a cada muestra. Las muestras se giraron a 400 x g 5 min para sedimentar las células. Los sobrenadantes se extrajeron y las células sedimentadas se resuspendieron en 200 μ L de buffer precalentado (37 °C) de permeabilización (2% de formaldehído en PBS, Polisciences, Inc.) y se incubaron a 37 °C durante 10 min. Se añadieron 2 mililitros de MeOH helado a cada muestra a fin de fijar las células. Las muestras se mezclaron y se mantuvieron sobre hielo durante al menos 30 min. Las muestras se giraron a 400 x g durante 5 min y se extrajeron los sobrenadantes. Los sedimentos celulares se lavaron una vez con buffer de lavado, luego se tiñeron y se analizaron tal como se describe en el ensayo en sangre entera. La Tabla 8 muestra los niveles de pSTAT3 en presencia de anticuerpos anti-IL-6 medidos en células mononucleares de sangre periférica humana.

Tabla 8

Anticuerpo anti IL-6	Conc. IL-6 ng/ml	PBMC IC50 μ g/ml
9C8	25	0,210

R&D MAB2061	25	0,580
-------------	----	-------

Ejemplo 7

Afinidad de unión

Preparación de Chips BIAcore

[0237] El anticuerpo anti-IL-6 IgG2 N68T T83S de 9C8 fue inmovilizado sobre chips de BIAcore CM5 (GE Biosciences - antes BIAcore Inc, Piscataway, NJ) mediante acoplamiento de amina a carboximetilcelulosa (CM) adosada a la matriz de dextrano del chip tal como se describe en Löfås & Johnsson (*J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1990); 21:pp1526-1528). El chip se trató previamente con 1 M de NaCl y 50 mM de NaOH antes del acoplamiento. El acoplamiento de amina se logró al combinar EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida y NHS (N-hidoxisuccinimida) y pasarlo a través del chip a fin de activar los grupos CM. El ligando en 10 mM de buffer acetato pH 5 se pasó a través de la superficie del chip y se unió covalentemente al grupo activado CM. Los grupos activos CM remanentes en la superficie del chip se atemperaron por pasaje de 1M de etanolamina pH 8,5 a través del chip. Se obtuvieron EDC, NHS, y etanolamina como parte del kit de acoplamiento de amina de GE Biosciences. El acoplamiento se llevó a cabo mediante el uso de Wizard de preparación de superficie incluido en el Software BiaControl V3.2.

Determinación de afinidad de unión

[0238] Todas las mediciones de SPR se realizaron en un instrumento BIAcore 3000 (GE Biosciences, Piscataway, NJ).

Se usó software BIAcore -Software de Control BIAcore 3000 V3.2 para la operación y el control del instrumento BIAcore 3000. Se usó Software BiaEvaluation V4.1 para el análisis de los datos de SPR provenientes del instrumento BIAcore 3000 y los datos se graficaron mediante el software Graf Pad Prism Versión 5. La afinidad de unión de IL-6 a los anticuerpos monoclonales (mAb) se midió en buffer HBS-EP (10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 3,4 mM de EDTA, 0,005% de P20) a 25 °C. La tasa de flujo para el estudio de afinidad era de 40 uL/minuto a fin de minimizar los efectos del transporte de masa (Myszka, D. G., et al., *Biophysical chemistry*. 64, 127-137, 1997). Se usó IgG_κ humano como ligando para la construcción del canal de referencia del chip. Se midió la fijación del analito (rhIL-6; R&D Systems, Minneapolis, MN, 206-IL) al ligando inmovilizado (IgG₂N68T T83S de 9C8) por duplicado y la concentración de la IL-6 varió desde 0 a 25 nM. El tiempo de inyección para IL-6 fue de 6 minutos y el tiempo de disociación fue de 25 minutos. La superficie se regeneró entre los ciclos mediante 10 mM de glicina pH 1,7 durante 30 segundos con una velocidad de flujo de 30 uL/min. Las condiciones de regeneración se establecieron como óptimas después de un estudio de regeneración (datos no mostrados). Los datos se analizaron mediante el uso de Kinetics Wizard y los programas de ajuste manual que se incluyen en el software BiaEvaluation V4.1 mediante el uso del modelo 1:1 Langmuir (Karlson R & Fält A., *J. Immunol. Methods*. 200: pp121-133, 1997). Se demostró que la IgG₂ antianticuerpo IL-6 de 9C8 N68T T83S tenía $k_a = 9,95E+05 \text{ (Ms)}^{-1}$, $k_d = 1,34E-04 \text{ s}^{-1}$, y $K_D = 1,35E-10 \text{ M}$ o 135 pM.

SÍNTESIS DE LISTADO DE SECUENCIAS (las secuencias son secuencias de aminoácidos excepto las indicadas con 'n.a.' por ácido nucleico)

SEQ ID NO:	SECUENCIA		SEQ ID NO:	SECUENCIA
1	pesada IgG1 9C8 n.a.		23	pesada IgG2 9C8 n.a.
2	V _H 9C8 n.a.		24	pesada IgG2 9C8
3	pesada IgG1 9C8		25	liviana IgG2 9C8 n.a.
4	V _H 9C8		26	liviana IgG2 9C8
5	V _H CDR1 9C8		27	pesada IgG2 9C8 N68T T83S n.a.
6	V _H CDR2 9C8		28	pesada IgG2 9C8 N68T T83S
7	V _H CDR3 9C8		29	V _H 9C8 N68T T83S
8	V _H FR1 9C8		30	V _H FR3 9C8 N68T T83S
9	V _H FR2 9C8		31	pesada IgG1 9C8 N68T T83S n.a.
10	V _H FR3 9C8		32	pesada IgG1 9C8 N68T T83S
11	V _H FR4 9C8		33	V _H 9C8 E31G N68T T83S n.a.
12	liviana IgG1 9C8 n.a.		34	V _H 9C8 E31G N68T T83S
13	V _L 9C8 n.a.		35	V _H CDR1 9C8 E31G N68T T83S
14	liviana IgG1 9C8		36	V _H 9C8 I24V N68T T83S n.a.

15	V _L 9C8		37	V _H 9C8 I24V N68T T83S
16	V _L CDR1 9C8		38	V _H FR1 9C8 I24V N68T T83S
17	V _L CDR2 9C8		39	V _H 22B5 n.a.
18	V _L CDR3 9C8		40	V _H 22B5
19	V _L FR1 9C8		41	V _H CDR3 22B5
20	V _L FR2 9C8		42	V _L 22B5 n.a.
21	V _L FR3 9C8		43	V _L 22B5
22	V _L FR4 9C8		44	Consenso 1 CDR3
			45	Consenso 2 CDR3

RESUMEN

Se proveen anticuerpos y sus porciones fijadoras de antígeno correspondientes que se fijan a IL-6 humana. También se proveen ácidos nucleicos que codifican dichos anticuerpos y porciones fijadoras de antígeno, métodos para preparar dichos anticuerpos y porciones fijadoras de antígeno, composiciones que comprenden dichos anticuerpos o porciones fijadoras de antígeno, y los usos de dichos anticuerpos o porciones fijadoras de antígeno.

LISTADO DE SECUENCIA

<110> Pfizer Inc
Medarex, Inc

<120> ANTICUERPOS CONTRA IL-6 Y SU USO

<130> PC030394

<160> 60

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1338

<212> ADN

<213> homo sapien

<400> 1

caggtgcagc tacagcagtg gggcgagga ctgttgaagc cttcgagac cctgtccctc	60
acctgcgcta tctatggtag gtccttcagg gactactact ggagctggat ccgccagccc	120
ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atctttcata gtggaagcac caactacaac	180
ccgtccctca agagtcgagt caacatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg	240
aagctgacct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agaggaatta	300
gatgatattg atatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcttcagc ctccaccaag	360
ggcccatcgg tcttccccct ggcaccctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc	420
ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggtga cgggtgctgtg gaactcaggc	480
gccttgacca gggcgctgca cacttcccg gctgtcctac agtctcagg actctaactcc	540
ctcagcagcg tggtagccgt gccctccagc agcttgggca cccagaccta catctgcaac	600
gtgaatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagagag ttgagcccaa atcttctgac	660
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaaactcc tggggggacc gtcagtcttc	720
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc	780
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	840
gtggaggtgc ataagccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt	900
gtggtcagcg tcttcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc	960
aaggtctcca acaaagccct ccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg	1020
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac	1080
caggtcagcc tgacctgctt ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg	1140

```

gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct ggactccgac      1200
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac      1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc      1320
-----
tccctgtctc cgggtaaa                                          1338

```

```

<210> 2
<211> 348
<212> ADN
<213> homo sapien

```

```

<400> 2
caggtgcagc tacagcagtg gggcgagga ctgtgaagc ctcggagac cctgtccctc      60
acctgcgcta tctatggtgg gtccttcagg gagtactact ggagctggat ccgccagccc      120
ccaggggaagg ggcaggagtg gattggggaa atctttcata gtggaagcac caactacaac      180
ccgtccctca agagtcgagt caacatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg      240
aagctgacct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agaggaatta      300
gatgattttg atatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcttca                    348

```

```

<210> 3
<211> 446
<212> PRT
<213> homo sapien

```

```

<400> 3

```

```

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

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

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

Gly Glu Ile Phe His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
          50          55          60

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

Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
          85          90          95

```

Arg Glu Glu Leu Asp Asp Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 4

<211> 116

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 4

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

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

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

Gly Glu Ile Phe His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

Ser Arg Val Asn Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala

85 90 95

Arg Glu Glu Leu Asp Asp Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 5

Glu Tyr Tyr Trp Ser

1 5

<210> 6

<211> 16

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 6

Glu Ile Phe His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Ser

1 5 10 15

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 7

Glu Glu Leu Asp Asp Phe Asp Ile

1 5

<210> 8

<211> 30

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

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

<210> 9
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<400> 9

Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 1 5 10

<210> 10
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<400> 10

Arg Val Asn Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 20 25 30

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<400> 11

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

<210> 12
 <211> 642
 <212> ADN
 <213> homo sapien

<400> 12
 gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtc gggattagc agctggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gagaaagccc ctaagtcct gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagtag cctgcagcct 240

```

gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataaaagtt accctcggac gttcgggcaa      300
gggaccaagg tggaaatcaa acgaactgtg gctgcaccat ctgtcttcat cttcccgcca      360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgtttgtgt gcttctgtaa taactttctat    420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt                          642

```

```

<210> 13
<211> 321
<212> ADN
<213> homo sapien

```

```

<400> 13
gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc      60
atcacttgtc gggcgagtca gggatttagc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca    120
gagaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcattcagtt tgcaaagtgg ggtcccatca    180
aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagtag cctgcagcct     240
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataaaagtt accctcggac gttcgggcaa      300
gggaccaagg tggaaatcaa a                          321

```

```

<210> 14
<211> 214
<212> PRT
<213> homo sapien

```

```

<400> 14

```

```

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

```

```

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

```

```

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
          35           40           45

```

```

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

```

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 15
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 15

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 16
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<400> 16

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

<210> 17
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<400> 17

Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
 1 5

<210> 18
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<400> 18

Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Pro Arg Thr
 1 5

<210> 19
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<400> 19

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 20
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<400> 20

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<400> 21

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15

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

<210> 22
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<400> 22

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 1 5 10

<210> 23
 <211> 1326
 <212> ADN
 <213> homo sapien

<400> 23
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgcta tctatggtgg gtccttcagg gactactact ggagctggat ccgccagccc 120
 ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atctttcata gtggaagcac caactacaac 180

```

ccgtccctca agagtcgagt caacatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg      240
aagctgacct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agaggaatta      300
gatgattttg atatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcttcagc ctccaccaag      360
ggcccatcgg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc      420
ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgctg gaactcaggc      480
gctctgacca gggcgctgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc      540
ctcagcagcg tagtgaccgt gccctccagc aacttcggca cccagaccta cacctgcaac      600
gtagatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc      660
gagtgtccac cgtgtcccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttcct cttcccccca      720
aaaccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac      780
gtgagccacg aagaccccga ggtccagttc aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat      840
aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc      900
ctcaccgtcg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac      960
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa     1020
ccacagggtg acaccctgcc cccatcccg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg     1080
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg     1140
cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctctctcttc     1200
ctctacagca agctcacctg ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc     1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacacaga agagcctctc cctgtctccg     1320
ggtaaa                                           1326

```

```

<210> 24
<211> 442
<212> PRT
<213> homo sapien

```

```

<400> 24

```

```

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

```

```

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

```

Gly Glu Ile Phe His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

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

Lys Leu Thr Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Glu Glu Leu Asp Asp Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125

Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe
180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp

260	265	270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
275	280	285
Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val		
290	295	300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
305	310	315
Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly		
	325	330
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
	340	345
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
	355	360
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
	370	375
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
385	390	395
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
	405	410
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
	420	425
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	435	440
<210> 25		
<211> 642		
<212> ADN		
<213> homo sapien		
<400> 25		
gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc		60
atcacttgtc gggcgagtca ggggtattagc agctgggttag cctgggtatca gcagaaacca		120

```

gagaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca      180
aggttcagcg gcagtggtatc tgggacagat ttactcttca ccatcagtag cctgcagcct      240
gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataaaagtt accctcggac gttoggccaa      300
gggaccaagg tggaaatcaa acgaactgtg gctgcacat ctgtcttcat ctccccgcca      360
tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gt                          642

```

```

<210> 26
<211> 214
<212> PRT
<213> homo sapien

<400> 26

```

```

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

```

```

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

```

```

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35           40           45

```

```

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

```

```

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

```

```

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Pro Arg
85           90           95

```

```

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

```

```

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115          120          125

```

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 27
 <211> 1326
 <212> ADN
 <213> homo sapien

<400> 27
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc ctcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgcta tctatggtgg gtccttcagg gactactact ggagctggat ccgccagccc 120
 ccagggaaagg ggctggagtg gattggggaa atctttcata gtggaagcac caactacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agaggaatta 300
 gatgattttg atatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcctcagc ctccaccaag 360
 ggcccatcgg tcttccccct ggcgccctgc tccaggagca cctccgagag cacagcggcc 420
 ctgggctgcc tggtaagga ctacttcccc gaaccggtga cgggtgcgtg gaactcaggc 480
 gctctgacca gcggcgtgca caccttcccg gctgtcctac agtcctcagg actctactcc 540
 ctacgcagcg tagtgaccgt gccctccagc aacttcggca ccagaccta cacctgcaac 600
 gtagatcaca agcccagcaa caccaaggtg gacaagacag ttgagcgcaa atgttgtgtc 660
 gagtgccac cgtgccagc accacctgtg gcaggaccgt cagtcttctt cttcccccca 720
 aaacccaagg acaccctcat gatctcccg acccctgagg tcacgtgcgt ggtggtggac 780

```

gtgagccacg aagaccccgga ggtccagttc aactggtagc tggacggcgt ggaggtgcat      840
aatgccaaga caaagccacg ggaggagcag ttcaacagca cgttccgtgt ggtcagcgtc      900
ctcaccgtcg tgcaccagga ctggctgaac ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac      960
aaaggcctcc cagcccccat cgagaaaacc atctccaaaa ccaaagggca gccccgagaa     1020
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gaggagatga ccaagaacca ggtcagcctg     1080
acctgcctgg tcaaaggctt ctaccccagc gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg     1140
cagccggaga acaactacaa gaccacacct cccatgctgg actccgacgg ctcttctctc     1200
ctctacagca agtcaccgt ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc     1260
tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg     1320
ggtaaa                                           1326

```

```

<210> 28
<211> 442
<212> PRT
<213> homo sapien

```

```

<400> 28

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Gly Glu Ile Phe His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
          50              55              60

```

```

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

```

```

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
          85              90              95

```

```

Arg Glu Glu Leu Asp Asp Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
          100             105             110

```

```

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala

```


Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 355 360 365

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 370 375 380

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 385 390 395 400

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 405 410 415

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 420 425 430

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 29
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<400> 29

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

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

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

Gly Glu Ile Phe His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Glu Glu Leu Asp Asp Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 30
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<400> 30

Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys
 1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 31
 <211> 1338
 <212> ADN
 <213> homo sapien

<400> 31

caggtgcagc tacagcagtg gggcgcagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc	60
acctgcgcta tctatggtag gtccttcagg gagtactact ggagctggat ccgccagccc	120
ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atctttcata gtggaagcac caactacaac	180
ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg	240
aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agaggaatta	300
gatgattttg atatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcttcagc ctccaccaag	360
ggcccatcgg tcttccccct ggcacctcc tccaagagca cctctggggg cacagcggcc	420
ctgggctgcc tgggtcaagga ctacttcccc gaaccgggta cgggtgcgtg gaactcaggc	480
gccctgacca gcggcgtgca caccttcccc gctgtcctac agtcctcagg actctactcc	540
ctcagcagcg tagtgaccgt gccctccagc agcttgggca cccagacctc catctgcaac	600
gtgaatcaca agcccagcaa caccaagggt gacaagaaaag ttgagcccaa atcttgtgac	660
aaaactcaca catgcccacc gtgcccagca cctgaactcc tgggggggacc gtcagtcttc	720
ctcttcccc caaaacccaa ggacacctc atgatctccc ggacctctga ggtcacatgc	780
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc	840

```

gtggagggtgc ataatgccaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt      900
gtggtcagcg tcctcacctg cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc      960
aagggtctcca acaaagccct ccagagcccc atcgagaaaa ccatctccaa agccaaaggg    1020
cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac    1080
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca ggcacatcgc cgtggagtgg    1140
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgctgct ggactccgac    1200
ggctctctct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcagggtggca gcaggggaac    1260
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc    1320
tcctgtctc cggtataa                                     1338

```

```

<210> 32
<211> 446
<212> PRT
<213> homo sapien

```

```

<400> 32

```

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Gly Glu Ile Phe His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
          50              55              60

```

```

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

```

```

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
          85              90              95

```

```

Arg Glu Glu Leu Asp Asp Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
          100              105              110

```

```

Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
          115              120              125

```

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 33
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> homo sapien

<400> 33
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgcta tctatggtgg gtccttcagg ggggtactact ggagctggat ccgccagccc 120
 ccagggaagg ggctggagtg gattggggaa atctttcata gtggaagcac caactacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agaggaatta 300
 gatgattttg atatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctctctca 348

<210> 34
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<400> 34

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

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

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

Gly Glu Ile Phe His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Glu Glu Leu Asp Asp Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 35
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<400> 35

Gly Tyr Tyr Trp Ser
 1 5

<210> 36
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> homo sapien

<400> 36
 cagggtgcagc tacagcagtg gggcgacagga ctgttgaagc ctcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctatgggtgg gtccttcagg gagtactact ggagctggat ccgccagccc 120
 ccaggggaagg ggctggagtg gattggggaa atctttcata gtggaagcac caactacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacacgt ccaagaacca gttctccctg 240
 aagctgagct ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agaggaatta 300
 gatgattttg atatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctctctca 348

<210> 37
 <211> 116

<212> PRT
 <213> homo sapien
 <400> 37

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Arg Glu Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Glu Glu Leu Asp Asp Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 38
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> homo sapien
 <400> 38

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Arg
 20 25 30

<210> 39
 <211> 348
 <212> ADN
 <213> homo sapien

<400> 39
 caggtgcagc tacagcagtg gggcgagga ctgttgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcgctg tctatggtgg gtcattcaga ggttactact ggagctggat ccgccagccc 120
 ccaggaaagg ggctggagtg gattggggaa atctttcata gtggaagcac caactacaac 180
 ccgtccctca agagtcgagt caccatatca gtagacagct ccaagaacca gttctccctg 240
 aaactgaggt ctgtgaccgc cgcggacacg gctgtgtatt actgtgcgag agaagatatt 300
 gatgattttg atatctgggg ccaagggaca atggtcaccg tctcttca 348

<210> 40
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<400> 40

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Arg Gly Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Phe His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

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

Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Glu Asp Ile Asp Asp Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 41
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<400> 41

Glu Asp Ile Asp Asp Phe Asp Ile
 1 5

<210> 42

<211> 321

<212> ADN

<213> homo sapien

<400> 42

gacatccaga tgaccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60
 atcacttgtc gggcgagtc gggattagc agctggtag cctgggtatca gcagaaacca 120
 gagaaagccc ctaagtcctt gatctatgct gcatccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca ccatcagcag cctgcagcct 240
 gaagactttg caacttatta ttgccaacag tataagagtt accctcggac gttcggccaa 300
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 43

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Lys Ser Tyr Pro Arg
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 44
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..()
 <223> X = D, E, N, o Q

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X = D, E, N, o Q

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X = I, L, V, o M

<400> 44

Glu Xaa Xaa Leu Asp Asp Phe Asp Ile
 1 5

<210> 45
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (2)..(2)
 <223> X = D o E

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (3)..(3)
 <223> X = I o L

<400> 45

Glu Xaa Xaa Leu Asp Asp Phe Asp Ile
 1 5

<210> 46
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> homo sapien

<400> 46

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

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

Gly Glu Ile Asn His Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys
 50 55 60

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

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> homo sapien

<400> 47

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

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

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
 35 40 45

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 48
 <211> 212
 <212> PRT
 <213> homo sapien
 <400> 48

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Asp Ala Ile Thr Thr Pro Asp Pro Thr Thr Asn Ala Ser Leu Leu

	165		170		175										
Thr	Lys	Leu	Gln	Ala	Gln	Asn	Gln	Trp	Leu	Gln	Asp	Met	Thr	Thr	His
		180					185						190		
Leu	Ile	Leu	Arg	Ser	Phe	Lys	Glu	Phe	Leu	Gln	Ser	Ser	Leu	Arg	Ala
		195					200					205			
Leu	Arg	Gln	Met												
	210														

<210> 49
 <211> 25
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de secuencia

<400> 49
 ctttctgaga stcmtggakc tcmtg 25

<210> 50
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de secuencia

<400> 50
 tacgtgccaa gcatcctcgc 20

<210> 51
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Cebador de secuencia

<400> 51
 gsartcagwc ycwvycagga cacagc 26

<210> 52
 <211> 23
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de secuencia

<400> 52

aggctggaac tgaggagcag gtg

23

<210> 53

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de clonación

<400> 53

ttacagtgcg cgactccca ggtgcagcta cagcagtgg

39

<210> 54

<211> 39

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de clonación

<400> 54

ttacagtgtg cactccgaca tccagatgac ccagtctcc

39

<210> 55

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de clonación

<400> 55

gaagaccgat gggcccttgg

20

<210> 56

<211> 51

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador de clonación

<400> 56

tatattcctt aattaagtta ttctactcac gtttgatttc caccttggtc c

51

<210> 57

<211> 28

<212> ADN

<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Cebador de mutagénesis	
<400>	57	
	cctcacctgc gctgtctatg gtgggtcc	28
<210>	58	
<211>	29	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Cebador de mutagénesis	
<400>	58	
	gggtccttca ggggtacta ctggagctg	29
<210>	59	
<211>	34	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Cebador de mutagénesis	
<400>	59	
	cctcaagagt cgagtcacca tatcagtaga cacg	34
<210>	60	
<211>	28	
<212>	ADN	
<213>	Secuencia artificial	
<220>		
<223>	Cebador de mutagénesis	
<400>	60	
	ctcctgaag ctgagctctg tgaccgcc	28

Figura 1a

Región VH 22B5 de anti-IL6

Línea germinal Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G S F S G Y Y W S W I R Q P P
 22B5 VH - - - - - R - - - - -

Línea germinal G K G L E W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q P S L K L
 22B5 VH - - - - - F - - - - -

Línea germinal S S V T A A D T A V Y Y C A R ###A F D I W G Q G T M V T V S S SEQ ID NO:46
 22B5 VH R - - - - E D I D D - - - - -

Figura 1b

Región VK 22B5 de Anti-IL6

Línea germinal D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K

22B5 VK2 - - - - -

Línea germinal P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L

22B5 VK2 - - - - -

Línea germinal Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S Y P W T F G Q G T K V E I K SEQ ID NO:47

22B5 VK2 - - - - - K - - - R - - - - -

Figura 1cAnti- IL-6 9C8 V_HLínea germinal Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G S F S G Y Y W S W I R Q P

9C8 - - - - - I - - - - - R E - - - - -

Línea germinal P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q F S L

9C8 - - - - - F - - - - - N - - - - -

Línea germinal K L S S V T A A D T A V Y Y C A R ###A F D I W G Q G T M V T V S S
SEQ ID NO:46

9C8 - - T - - - - - E E L D D - - - - -

Figura 1dAnti- IL-6 9C8 V_HLínea germinal D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K P

9C8 - - - - -

Línea germinal E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P

9C8 - - - - -

Línea germinal E D F A T Y Y C Q Q Y N S Y P W T F G Q G T K V E I K SEQ ID NO:47

9C8 - - - - - K - - - R - - - - -

Figura 1eAnti-IL-6 9C8 N68T, T83S V_HLínea germinal Q V Q L Q Q W G A G L L K P S E T L S L T C A V Y G G S F S G Y Y W S W I R Q P

9C8N68TT83S - - - - - I - - - - - R E - - - - -

Línea germinal P G K G L E W I G E I N H S G S T N Y N P S L K S R V T I S V D T S K N Q P S L

9C8N68TT83S - - - - - F - - - - -

Línea germinal K L S S V T A A D T A V Y Y C A R ###A F D I W G Q G T M V T V S S

SEQ ID NO:46

9C8N68TT83S - - - - - E E L D D - - - - -

Figura 1fAnti-IL-6 9C8 N68T, T83S V_HLínea germinal D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y Q Q K P

9C8N68TT83S - - - - -

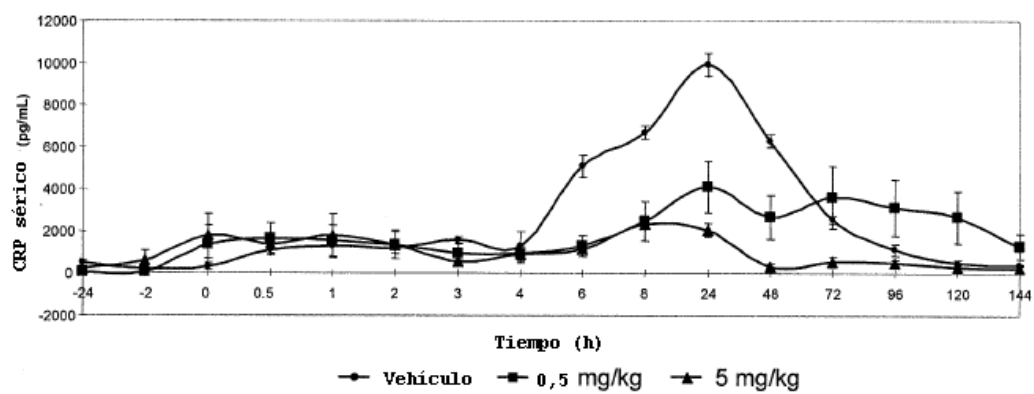
Línea germinal E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P

9C8N68TT83S - - - - -

Línea germinal E D F A T Y Y C Q Q Y N S Y P W T F G Q G T K V E I K SEQ ID NO:47

9C8N68TT83S - - - - - K - - - R - - - - -

Figura 2



CAPÍTULO REIVINDICATORIO

(Solicitud Divisional A)

1. Un anticuerpo monoclonal o una porción fijadora de antígeno del mismo, que comprende un dominio variable de cadena pesada (V_H) y un dominio variable de cadena liviana (V_L), donde las secuencias de aminoácidos V_H CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos V_H CDR1, CDR2, y CDR3 de la SEQ ID NO: 40 y las secuencias de aminoácidos V_L CDR1, CDR2, y CDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos V_L CDR1, CDR2, y CDR3 de la SEQ ID NO: 43, y donde dicho anticuerpo se une específicamente a IL-6 humana.
2. El anticuerpo monoclonal o una porción fijadora de antígeno de acuerdo con la Reivindicación 1, donde las secuencias de aminoácidos V_H FR1, FR2, FR3 y FR4, comprenden las secuencias de aminoácidos V_H FR1, FR2, FR3 y FR4 de la SEQ ID NO: 40 y las secuencias de aminoácidos V_L FR1, FR2, FR3 y FR4 comprenden las secuencias de aminoácidos V_L FR1, FR2, FR3 y FR4 de la SEQ ID NO: 43.
3. El anticuerpo monoclonal o una porción fijadora de antígeno de acuerdo con la Reivindicación 1, donde los dominios V_H y V_L del anticuerpo comprenden las SEQ ID NOs: 40 y 43, respectivamente, y donde dicho anticuerpo se une específicamente a IL-6 humana.
4. El anticuerpo monoclonal o una porción fijadora de antígeno de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, donde el anticuerpo monoclonal es una molécula IgG, IgM, IgE, IgA, o IgD.
5. El anticuerpo monoclonal o una porción fijadora de antígeno de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 3, donde el anticuerpo monoclonal es una molécula IgG1, IgG2, IgG3, ó IgG4.
6. Una composición farmacéutica que comprende el anticuerpo o una porción fijadora de antígeno de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
7. Una línea celular aislada que produce el anticuerpo o una porción fijadora de antígeno de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5 o la cadena pesada o la cadena liviana de dicho anticuerpo o dichas porciones fijadoras de antígeno.

8. Una molécula aislada de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la cadena pesada o una porción fijadora de antígeno de la misma, ó la cadena liviana o una porción fijadora de antígeno de la misma, o ambas, de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5.
9. La molécula de ácido nucleico de la Reivindicación 8, donde la secuencia del nucleótido es al menos una de las SEQ ID NO: 39 ó 42.
10. Un vector que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 8, en donde el vector opcionalmente comprende una secuencia de control de expresión ligada operativamente a la molécula de ácido nucleico.
11. Una célula hospedera que comprende el vector de acuerdo con la Reivindicación 10 ó la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la Reivindicación 8.
12. Una célula hospedera que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada o una porción fijadora de antígeno de la misma, y una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena liviana o una porción fijadora de antígeno de la misma, de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5.
13. Una célula hospedera que comprende una molécula de ácido nucleico que codifica la cadena pesada o una porción fijadora de antígeno de la misma y la cadena liviana o una porción fijadora de antígeno de la misma, de un anticuerpo de acuerdo con cualquiera de las Reivindicaciones 1 a 5.
14. Un método para producir un anticuerpo monoclonal humano o su porción fijadora de antígeno que se une específicamente a IL-6 humana, que comprende cultivar la línea celular de acuerdo con la Reivindicación 7 o la célula hospedera de acuerdo con las Reivindicaciones 12 ó 13 y recuperar el anticuerpo o su porción fijadora de antígeno.
